

#### 2.1.4.2 Indicaciones complementarias

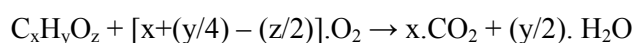
2.1.4.2.1 Las propiedades explosivas se asocian con la presencia en una molécula de determinados grupos químicos que pueden reaccionar produciendo rapidísimos aumentos de temperatura o presión. El procedimiento de detección sirve para identificar la presencia de esos grupos reactivos y las posibilidades que ofrecen de una rápida liberación de energía. Si esto permite averiguar que la sustancia o mezcla es un posible explosivo, deberá aplicarse el procedimiento de aceptación (véase, Parte I, sub-sección 10.3 de las *Recomendaciones relativas al transporte de mercancías peligrosas, Manual de Pruebas y Criterios*.)

**NOTA:** Cuando la energía exotérmica de descomposición de los compuestos orgánicos sea inferior a 800 J/g no será necesario realizar la prueba de propagación de la detonación de la serie 1, tipo a), ni tampoco la prueba de sensibilidad a la onda de choque de la detonación de la serie 2, tipo a). En el caso de las sustancias orgánicas y mezclas de sustancias orgánicas con una energía de descomposición de 800 J/g o más, no será necesario realizar las pruebas 1 a) y 2 a) si el resultado de la prueba del mortero balístico Mk.III d (F.1), o de la prueba del mortero balístico (F.2) o de la prueba Trauzl (BAM) (F.3) con cebado mediante un detonador normalizado N° 8 (véase el apéndice 1 del *Manual de Pruebas y Criterios*) es "no". En este caso, se considerará que el resultado de las pruebas 1 a) y 2 a) es "-".

2.1.4.2.2 Una sustancia o mezcla no se clasificará como explosiva:

- a) Cuando la molécula no contenga ninguno de los grupos químicos con propiedades explosivas. En la tabla A6.1 del apéndice 6 de las *Recomendaciones relativas al transporte de mercancías peligrosas, Manual de Pruebas y Criterios*, se exponen ejemplos de grupos que podrían tener propiedades explosivas; o
- b) Cuando la sustancia en cuestión contenga grupos químicos asociados a propiedades explosivas y oxígeno, pero el balance calculado de éste sea inferior a -200.

El balance de oxígeno se calcula con la reacción química siguiente:



mediante la fórmula:

balance de oxígeno = - 1600. [2.x + (y/2) - z]/peso molecular;

- c) Cuando el compuesto orgánico o una mezcla homogénea de compuestos orgánicos contengan grupos químicos con propiedades explosivas, pero la energía de descomposición exotérmica sea inferior a 500 J/g y la temperatura inicial de la descomposición exotérmica es inferior a 500 °C. (Este límite de temperatura permite evitar que el ensayo se aplique a un gran número de compuestos orgánicos que no son explosivos pero que se descomponen lentamente por encima de 500 °C liberando más de 500 J/g). La energía de descomposición exotérmica puede determinarse mediante análisis calorimétrico;
- d) En mezclas de sustancias inorgánicas comburentes con materiales orgánicos, si la concentración de sustancia inorgánica comburente es:

inferior al 15%, en masa, en el caso de una sustancia comburente perteneciente a la Categoría 1 o 2;

inferior al 30%, en masa, en el caso de una sustancia comburente perteneciente a la Categoría 3.

2.1.4.2.3 En el caso de mezclas que contienen una sustancia explosiva conocida, deberá aplicarse el procedimiento de aceptación en la clase de explosivos.

## CAPÍTULO 2.2

### GASES INFLAMABLES (INCLUIDOS LOS GASES QUÍMICAMENTE INESTABLES)

#### 2.2.1 Definiciones

2.2.1.1 Un *gas inflamable* es un gas que se inflama con el aire a 20 °C y a una presión de referencia de 101,3 kPa.

2.2.1.2 Un *gas químicamente inestable* es un gas inflamable que puede explotar incluso en ausencia de aire u oxígeno.

#### 2.2.2 Criterios de clasificación

2.2.2.1 Un gas inflamable se clasificará en una de las dos categorías de esta clase con arreglo a la tabla siguiente:

**Tabla 2.2.1: Criterios de clasificación para gases inflamables**

Categoría	Criterios
<b>1</b>	Gases que a 20 °C y a una presión de referencia de 101,3 kPa: a) son inflamables en mezcla de proporción igual o inferior al 13%, en volumen, con el aire; o que b) tienen un rango de inflamabilidad con el aire de al menos el 12%, independientemente del límite inferior de inflamabilidad.
<b>2</b>	Gases distintos de los de la Categoría 1, que a 20 °C y a una presión de referencia de 101,3 kPa, tienen un rango de inflamabilidad al mezclarse con el aire.

**NOTA 1:** El amoníaco y el bromuro de metilo pueden ser considerados como casos particulares en algunas reglamentaciones.

**NOTA 2:** Los aerosoles no se clasificarán como gases inflamables. Véase el capítulo 2.3.

2.2.2.2 Todo gas inflamable que sea también químicamente inestable se clasificará además en una de las dos categorías de gases químicamente inestables con arreglo a los métodos descritos en la Parte III del Manual de Pruebas y Criterios, de acuerdo con la tabla siguiente:

**Tabla 2.2.2: Criterios de clasificación para gases químicamente inestables**

Categoría	Criterios
<b>A</b>	Gases inflamables que son químicamente inestables a 20 °C y una presión de referencia de 101,3 kPa
<b>B</b>	Gases inflamables que son químicamente inestables a una temperatura superior a 20 °C y/o una presión superior a 101,3 kPa

### 2.2.3 Comunicación de peligro

En el capítulo 1.4 (*Comunicación de peligros: Etiquetado*) se hacen consideraciones generales y específicas sobre los requisitos de etiquetado. El anexo 2 contiene tablas resumen sobre clasificación y etiquetado. El anexo 3 contiene ejemplos de consejos de prudencia y pictogramas de precaución que pueden utilizarse con la aprobación de la autoridad competente.

**Tabla 2.2.3: Elementos que deben figurar en las etiquetas para gases inflamables (incluidos los gases químicamente inestables)**

	Gas inflamable		Gas químicamente inestable	
	Categoría 1	Categoría 2	Categoría A	Categoría B
<b>Símbolo</b>	Llama	<i>Sin símbolo</i>	<i>Sin símbolo adicional</i>	<i>Sin símbolo adicional</i>
<b>Palabra de advertencia</b>	Peligro	Atención	<i>Sin palabra de advertencia adicional</i>	<i>Sin palabra de advertencia adicional</i>
<b>Indicación de peligro</b>	Gas extremadamente inflamable	Gas inflamable	Puede explotar incluso en ausencia de aire	Puede explotar incluso en ausencia de aire, a presión y/o temperatura elevadas

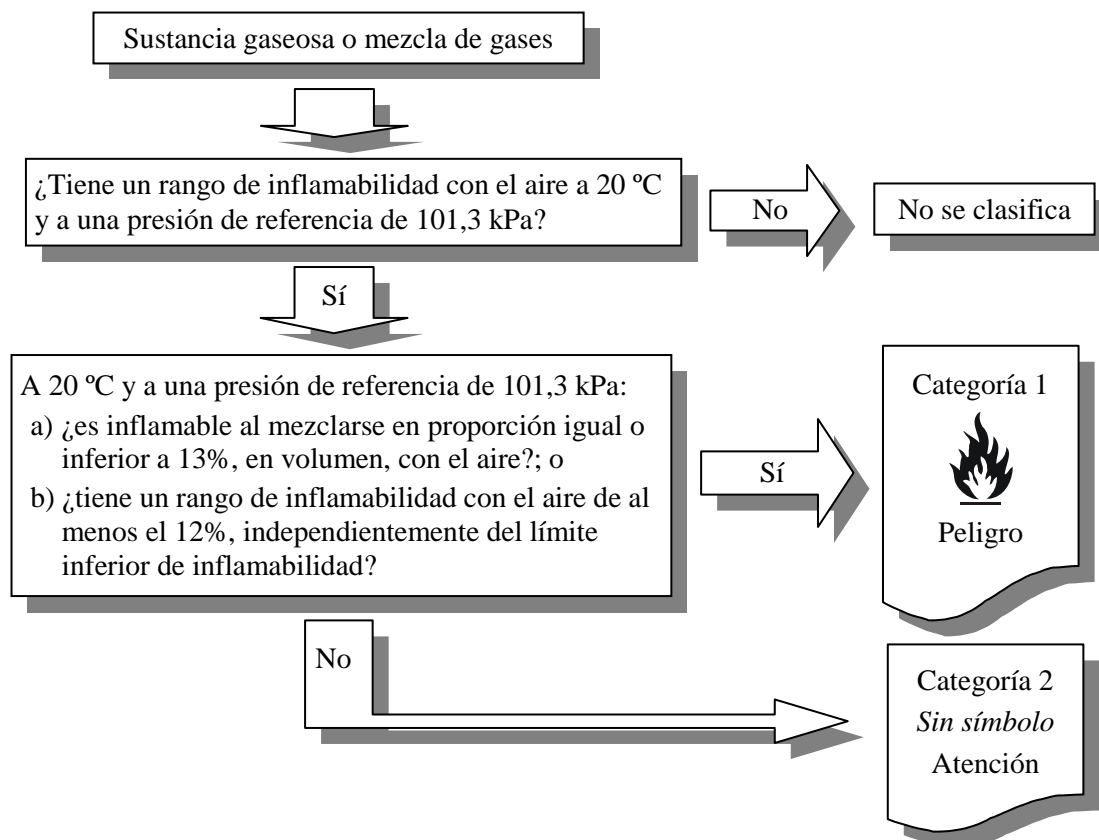
### 2.2.4 Procedimiento de decisión e indicaciones complementarias

El procedimiento de decisión y las indicaciones complementarias siguientes no forman parte del sistema armonizado, pero figuran aquí como orientación adicional. Se recomienda encarecidamente que la persona que se encargue de la clasificación estudie los criterios de clasificación antes y durante la aplicación de este procedimiento de decisión.

#### 2.2.4.1 Procedimiento de decisión para gases inflamables

Para clasificar un gas inflamable, se requieren datos sobre su inflamabilidad. La clasificación se hará con arreglo al procedimiento de decisión siguiente:

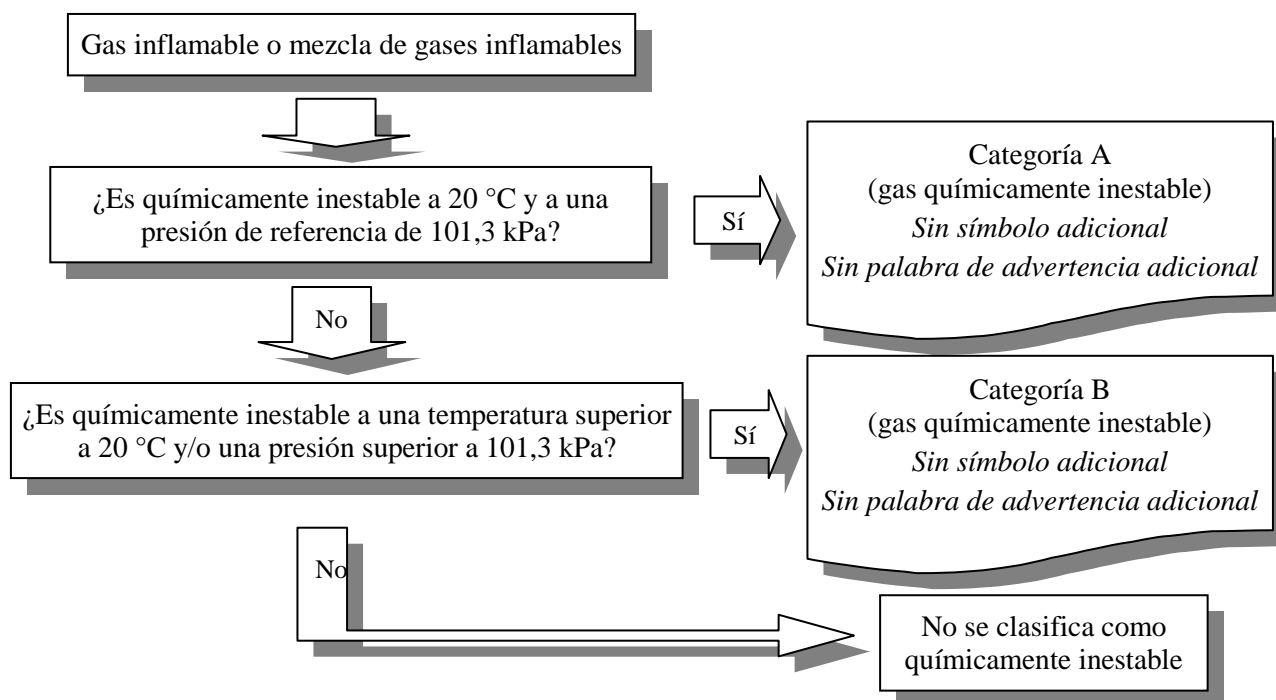
##### *Procedimiento de decisión 2.2 a)*



#### 2.2.4.2 Procedimiento de decisión para gases químicamente inestables

Para clasificar un gas inflamable como químicamente inestable, se requieren datos sobre su inestabilidad química. La clasificación se hará con arreglo al procedimiento de decisión 2.2 b).

##### Procedimiento de decisión 2.2 b)



#### 2.2.4.3 Indicaciones complementarias

La inflamabilidad se determinará mediante ensayos o cálculos, de conformidad con los métodos adoptados por la ISO (véase la norma ISO 10156:2010 Gases y mezclas de gases - Determinación del potencial de inflamabilidad y de oxidación para seleccionar juntas de válvulas de bombonas). Cuando no se disponga de datos suficientes para aplicar dichos métodos, podrá emplearse un método de ensayo equiparable reconocido por la autoridad competente.

La inestabilidad química se determinará con arreglo al método que se describe en la Parte III del Manual de Pruebas y Criterios. Si los cálculos realizados de acuerdo con la norma ISO 10156:2010 muestran que la mezcla de gases no es inflamable, no será necesario efectuar las pruebas para determinar su inestabilidad química con fines de clasificación.

#### 2.2.5 Ejemplo: Clasificación de una mezcla de gas inflamable mediante cálculos de conformidad con la norma ISO 10156: 2010

##### Fórmula

$$\sum_i^n \frac{V_i \%}{T_{ci}}$$

donde:

- $V_i \%$  = contenido equivalente de gas inflamable;
- $T_{ci}$  = concentración máxima de un gas inflamable en nitrógeno en la que la mezcla no se inflama con el aire;
- $I$  = primer gas de la mezcla;
- $n$  = n-ésimo gas de la mezcla;
- $K_i$  = factor de equivalencia para un gas inerte con respecto al nitrógeno.

Etapas 2:

Calcúlese el poder comburente de la mezcla de gases

$$PC = \frac{\sum_{i=1}^n x_i C_i}{\sum_{i=1}^n x_i + \sum_{k=1}^p K_k B_k} = \frac{0,09 \times 1 + 0,16 \times 0,6}{0,09 + 0,16 + 0,75 \times 0,9} = 0,201$$

$$20,1 < 23,5$$

Por lo tanto, la mezcla no se considera un gas comburente.



## CAPÍTULO 2.5

### GASES A PRESIÓN

#### 2.5.1 Definición

Los *gases a presión* son gases que se encuentran en un recipiente a una presión (manométrica) superior o igual a 200 kPa a 20 °C o como gases licuados o licuados refrigerados.

Se incluyen los gases comprimidos, licuados, disueltos y licuados refrigerados.

#### 2.5.2 Criterios de clasificación

2.5.2.1 Los gases a presión se clasificarán, con arreglo a su estado físico cuando se envasan, en uno de los cuatro grupos de la tabla siguiente:

**Tabla 2.5.1: Criterios de clasificación para los gases a presión**

Grupo	Criterios
<b>Gas comprimido</b>	Un gas que, cuando se envasa a presión, es totalmente gaseoso a –50 °C; en este grupo se incluyen todos los gases con una temperatura crítica inferior o igual a –50 °C.
<b>Gas licuado</b>	Un gas que, cuando se envasa a presión, es parcialmente líquido a temperaturas superiores a – 50 °C. Se distingue entre: a) Gas licuado a alta presión: un gas con una temperatura crítica entre –50 °C y +65 °C; y b) Gas licuado a baja presión: un gas con una temperatura crítica superior a +65 °C.
<b>Gas licuado refrigerado</b>	Un gas que, cuando se envasa, se encuentra parcialmente en estado líquido a causa de su baja temperatura.
<b>Gas disuelto</b>	Un gas que, cuando se envasa a presión, está disuelto en un disolvente en fase líquida.

La temperatura crítica es la temperatura por encima de la cual un gas puro no puede licuarse, con independencia del grado de compresión.

**NOTA:** *Los aerosoles no se clasificarán como gases a presión. Véase el capítulo 2.3.*

#### 2.5.3 Comunicación de peligro

En el capítulo 1.4 (*Comunicación de peligros: Etiquetado*) se hacen consideraciones generales y específicas sobre los requisitos de etiquetado. El anexo 2 contiene tablas resumen sobre clasificación y etiquetado. El anexo 3 contiene ejemplos de consejos de prudencia y pictogramas de precaución que pueden ser utilizados con la aprobación de la autoridad competente.

**Tabla 2.5.2 Elementos que deben figurar en las etiquetas para gases a presión**

	Gas comprimido	Gas licuado	Gas licuado refrigerado	Gas disuelto
<b>Símbolo</b>	Botella de gas	Botella de gas	Botella de gas	Botella de gas
<b>Palabra de advertencia</b>	Atención	Atención	Atención	Atención
<b>Indicación de peligro</b>	Contiene gas a presión; puede explotar si se calienta	Contiene gas a presión; puede explotar si se calienta	Contiene gas refrigerado; puede provocar quemaduras o lesiones criogénicas	Contiene gas a presión; puede explotar si se calienta

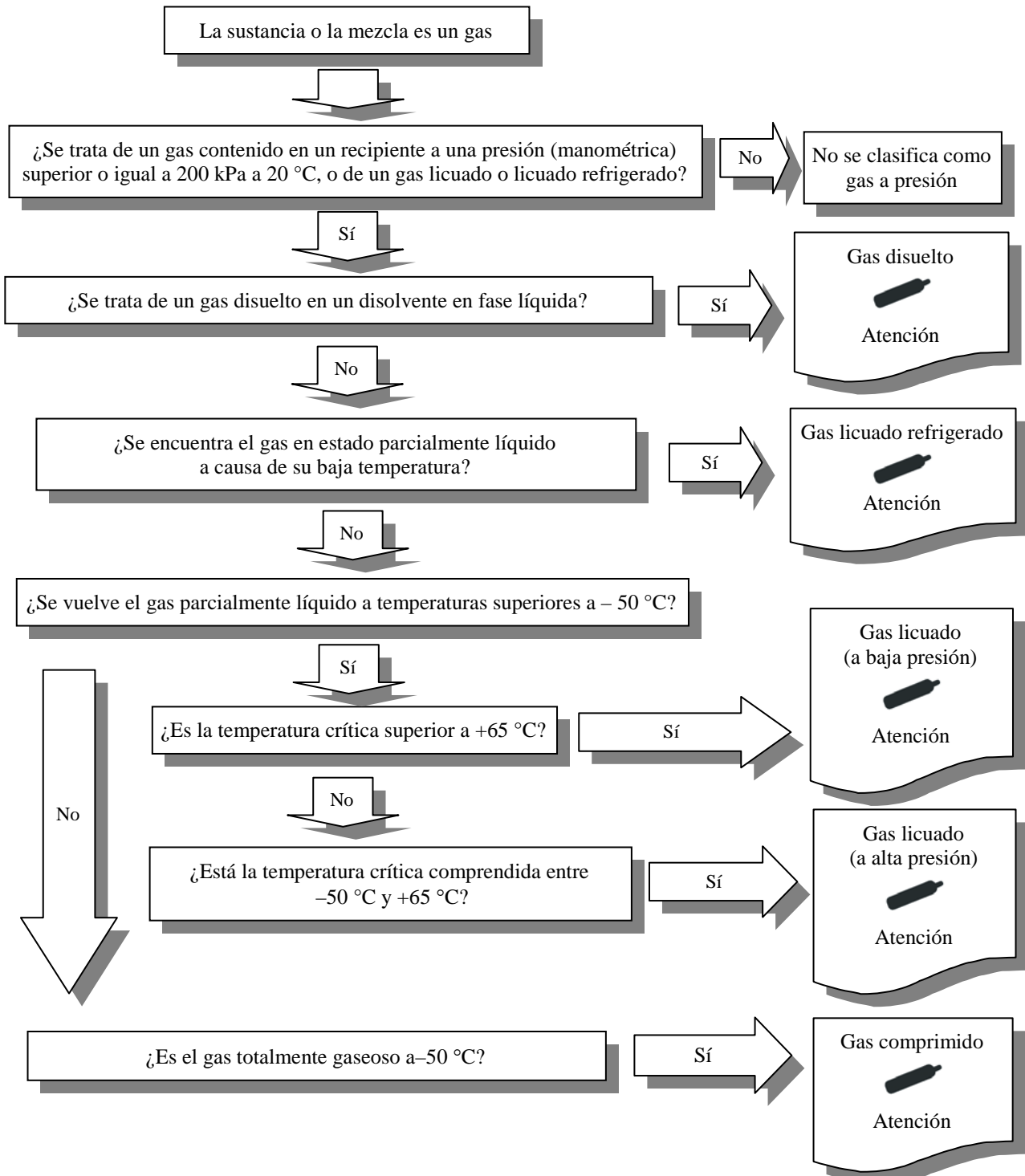
## 2.5.4 Procedimiento de decisión e indicaciones complementarias

El procedimiento de decisión y las indicaciones complementarias siguientes no forman parte del sistema armonizado de clasificación, pero figuran aquí como orientación adicional. Se recomienda encarecidamente que la persona que se encargue de la clasificación estudie los criterios de clasificación antes y durante la aplicación de este procedimiento de decisión.

### 2.5.4.1 Procedimiento de decisión

La clasificación se hará con arreglo al procedimiento de decisión 2.5

#### Procedimiento de decisión 2.5 para gases a presión





#### **2.5.4.2 Indicaciones complementarias**

Para este grupo de gases, se requiere conocer la información siguiente:

- a) La presión de vapor a 50 °C;
- b) El estado físico a 20 °C a presión normal;
- c) La temperatura crítica;

Con el fin de clasificar un gas, se necesitan los datos anteriores. Éstos pueden encontrarse en trabajos sobre el particular, obtenerse mediante cálculos o determinarse mediante ensayos. La mayor parte de los gases puros están ya clasificados en las *Recomendaciones relativas al transporte de mercancías peligrosas, Reglamentación Modelo*. Casi todas las mezclas que se salen de lo corriente requieren cálculos adicionales que pueden resultar muy complejos.

ocular cuando la suma de las concentraciones de esos componentes supere el valor de corte/límite de concentración.

3.3.3.3.3 La tabla 3.3.3 ofrece los valores de corte/límites de concentración que se usarán para determinar si la mezcla se considera como irritante o causante de lesiones oculares graves.

3.3.3.3.4 Se prestará especial atención al clasificar ciertos tipos de productos químicos tales como ácidos y bases, sales inorgánicas, aldehídos, fenoles y tensioactivos. El procedimiento descrito en 3.3.3.3.1 y 3.3.3.3.2 podría no servir, ya que muchas de esas sustancias son corrosivas o irritantes en concentraciones inferiores a 1%. Para mezclas que contengan ácidos o bases fuertes debería usarse el pH como criterio de clasificación (véase 3.3.3.1), ya que será un mejor indicador de lesiones oculares graves que los valores de corte/límites de concentración de la tabla 3.3.3. Una mezcla con componentes corrosivos o irritantes que no pueda clasificarse con el procedimiento de adición aplicado en la tabla 3.3.3 debido a sus características químicas, debería clasificarse en la Categoría 1 si contiene  $\geq 1\%$  de un componente corrosivo y en la Categoría 2 cuando contenga  $\geq 3\%$  de un componente irritante. La clasificación de las mezclas con componentes a los que no se aplica el procedimiento de la tabla 3.3.3 se resume en la tabla 3.3.4.

3.3.3.3.5 A veces, datos fidedignos pueden indicar que unos efectos oculares reversibles/irreversibles de un componente no se harán patentes cuando están presentes en un nivel superior a los valores de corte/límites de concentración genéricos mencionados en las tablas 3.3.3 y 3.3.4. En esos casos, la mezcla podría clasificarse con arreglo a esos datos (véase también 1.3.3.2 – “*Uso de valores de corte/límites de concentración*”). Otras veces, cuando se prevea que no es evidente que la corrosión/irritación cutánea o los efectos oculares reversibles/irreversibles de un componente presente en un nivel superior a los valores límite de concentración genéricos mencionados en las tablas 3.3.3 y 3.3.4, podrá considerarse la necesidad de someter la mezcla a ensayo. En tales casos, debería aplicarse el procedimiento de decisión por etapas a que se hace referencia en 3.3.3 y en la figura 3.3.1 y que se explica en detalle en el presente capítulo.

3.3.3.3.6 Si hay datos que indican que uno o varios componentes pueden ser corrosivos o irritantes en una concentración  $< 1\%$  (para los corrosivos) o  $< 3\%$  (para los irritantes), la mezcla debería clasificarse en consecuencia (véase también el párrafo 1.3.3.2 “*Utilización de valores de corte/límites de concentración*”).

**Tabla 3.3.3: Concentración de componentes de una mezcla, clasificados en la Categoría 1 cutánea y en la Categoría 1 o 2 oculares que determinan la clasificación de las mezclas como peligrosas para los ojos (Categoría 1 o 2)**

Suma de los componentes clasificados en:	Concentración que determina la clasificación de una mezcla como	
	Efectos oculares irreversibles	Efectos oculares reversibles
	Categoría 1	Categoría 2
Categoría 1 ocular o cutánea	$\geq 3\%$	$\geq 1\%$ pero $< 3\%$
Categoría 2/2A ocular		$\geq 10\%$
$(10 \times \text{Categoría 1 ocular}) + \text{Categoría 2/2A ocular}$		$\geq 10\%$
Categoría 1 cutánea + Categoría 1 ocular	$\geq 3\%$	$\geq 1\%$ pero $< 3\%$
$10 \times (\text{Categoría 1 cutánea} + \text{Categoría 1 ocular}) + \text{Categoría 2A/2B ocular}$		$\geq 10\%$

**Tabla 3.3.4: Concentración de componentes de una mezcla a la que no se aplica la regla de adición, que determina la clasificación de la mezcla como peligrosa para los ojos**

<b>Componente</b>	<b>Concentración</b>	<b>Mezcla clasificada en Categoría ocular</b>
Ácido con $\text{pH} \leq 2$	$\geq 1\%$	Categoría 1
Base con $\text{pH} \geq 11,5$	$\geq 1\%$	Categoría 1
Otros componentes corrosivos (Categoría 1) a los que no se aplica la regla de adición	$\geq 1\%$	Categoría 1
Otros componentes irritantes (Categoría 2) a los que no se aplica la regla de adición, incluidos ácidos y bases	$\geq 3\%$	Categoría 2

### 3.3.4 Comunicación de peligro

En el capítulo 1.4 (*Comunicación de peligros: Etiquetado*) se hacen consideraciones generales y específicas sobre los requisitos de etiquetado. El anexo 2 contiene tablas resumen sobre clasificación y etiquetado. El anexo 3 contiene ejemplos de consejos de prudencia y pictogramas de precaución que pueden ser utilizados con la aprobación de la autoridad competente.

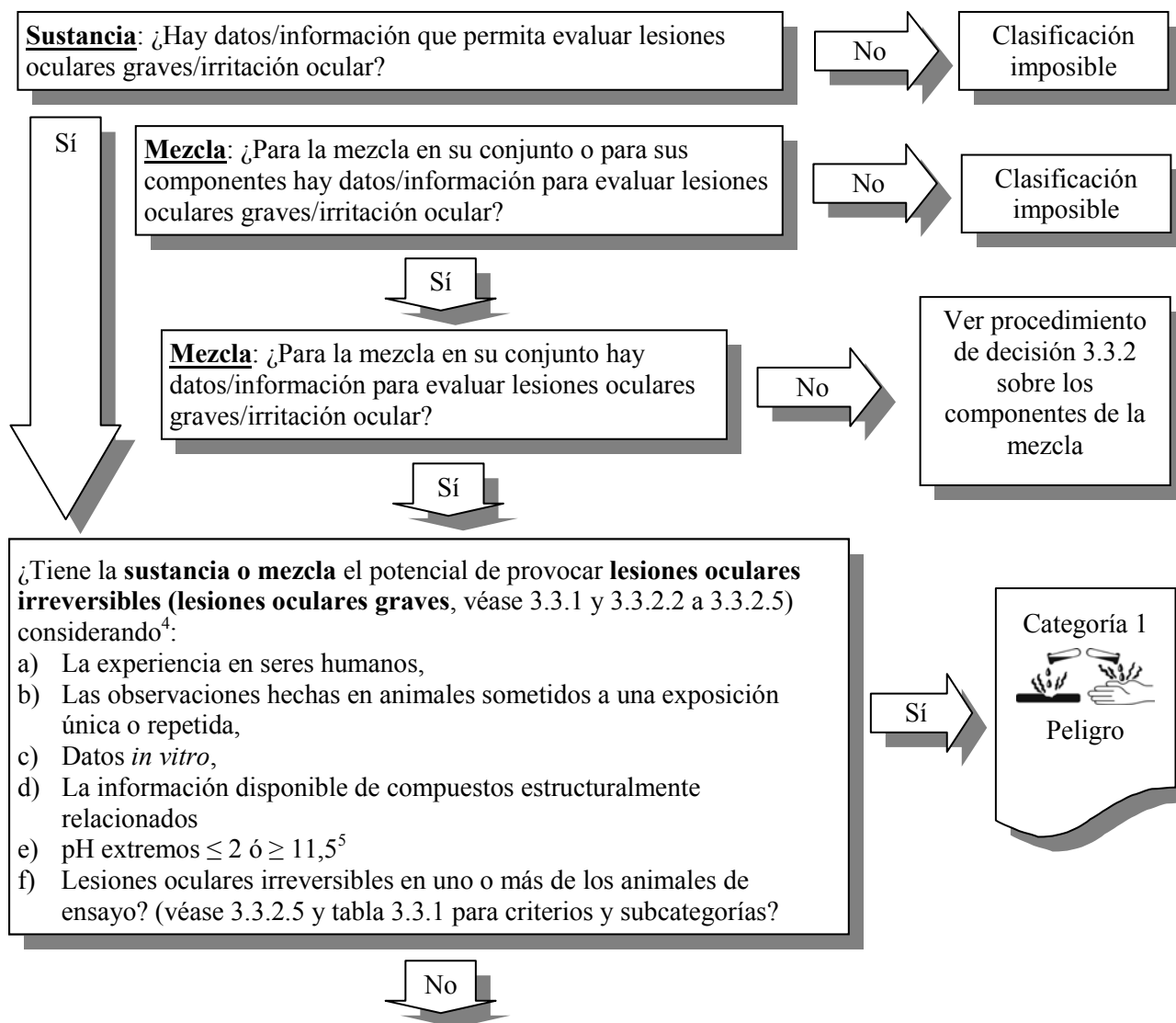
**Tabla 3.3.5: Elementos que deben figurar en la etiqueta para lesiones oculares graves/irritación ocular**

	<b>Categoría 1</b>	<b>Categoría 2A</b>	<b>Categoría 2B</b>
<b>Símbolo</b>	Corrosión	Signo de exclamación	<i>Sin símbolo</i>
<b>Palabra de advertencia</b>	Peligro	Atención	Atención
<b>Indicación de peligro</b>	Provoca lesiones oculares graves	Provoca irritación ocular grave	Provoca irritación ocular

### 3.3.5 Procedimiento de decisión

Los procedimientos de decisión siguientes no forman parte del sistema de clasificación armonizado, pero figuran aquí como orientación adicional. Se recomienda encarecidamente que la persona que se encargue de la clasificación estudie los criterios de clasificación antes y durante la aplicación de estos procedimientos de decisión.

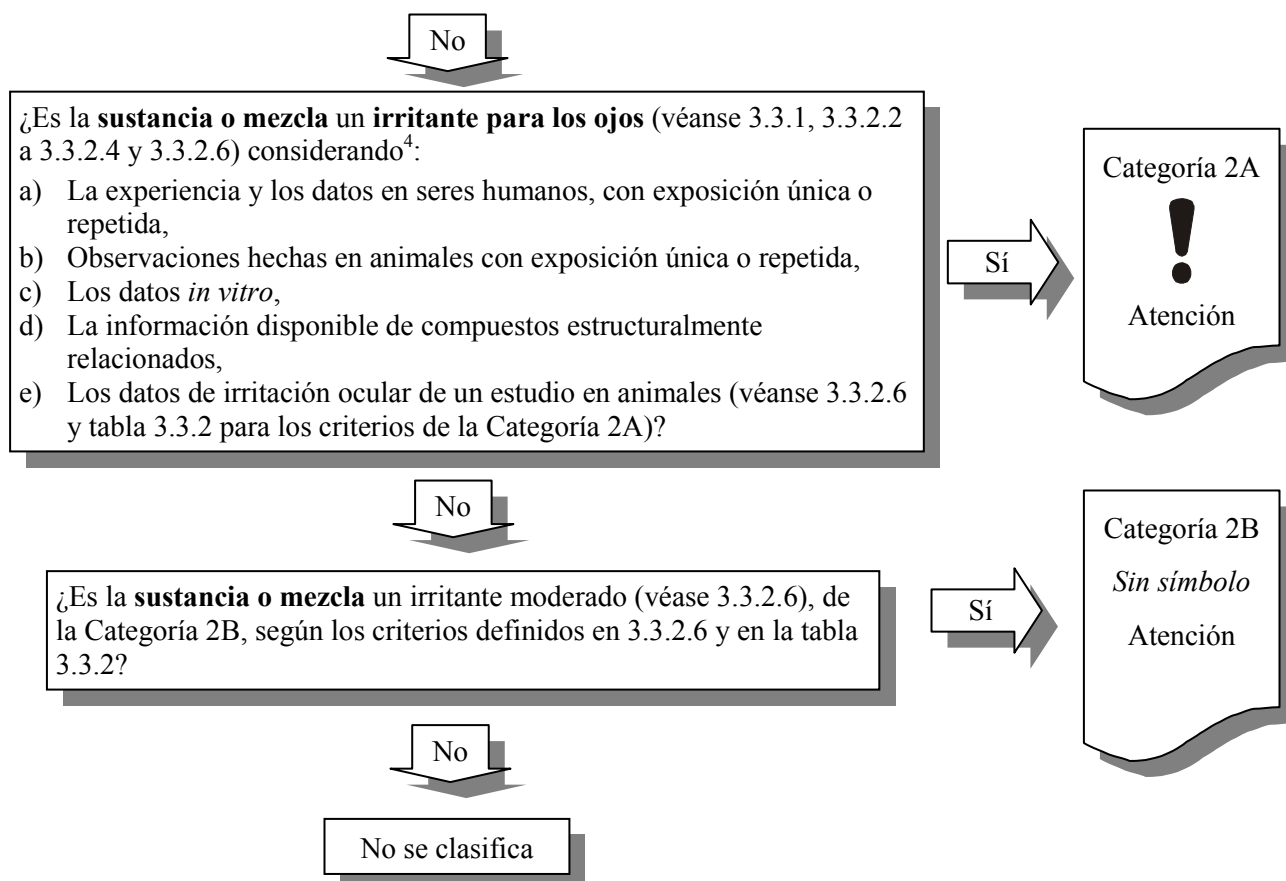
#### 3.3.5.1 Procedimiento de decisión 3.3.1 para lesiones oculares graves/irritación ocular



(Continúa en la página siguiente)

<sup>4</sup> La figura 3.3.1 contiene detalles sobre la estrategia de ensayo y evaluación.

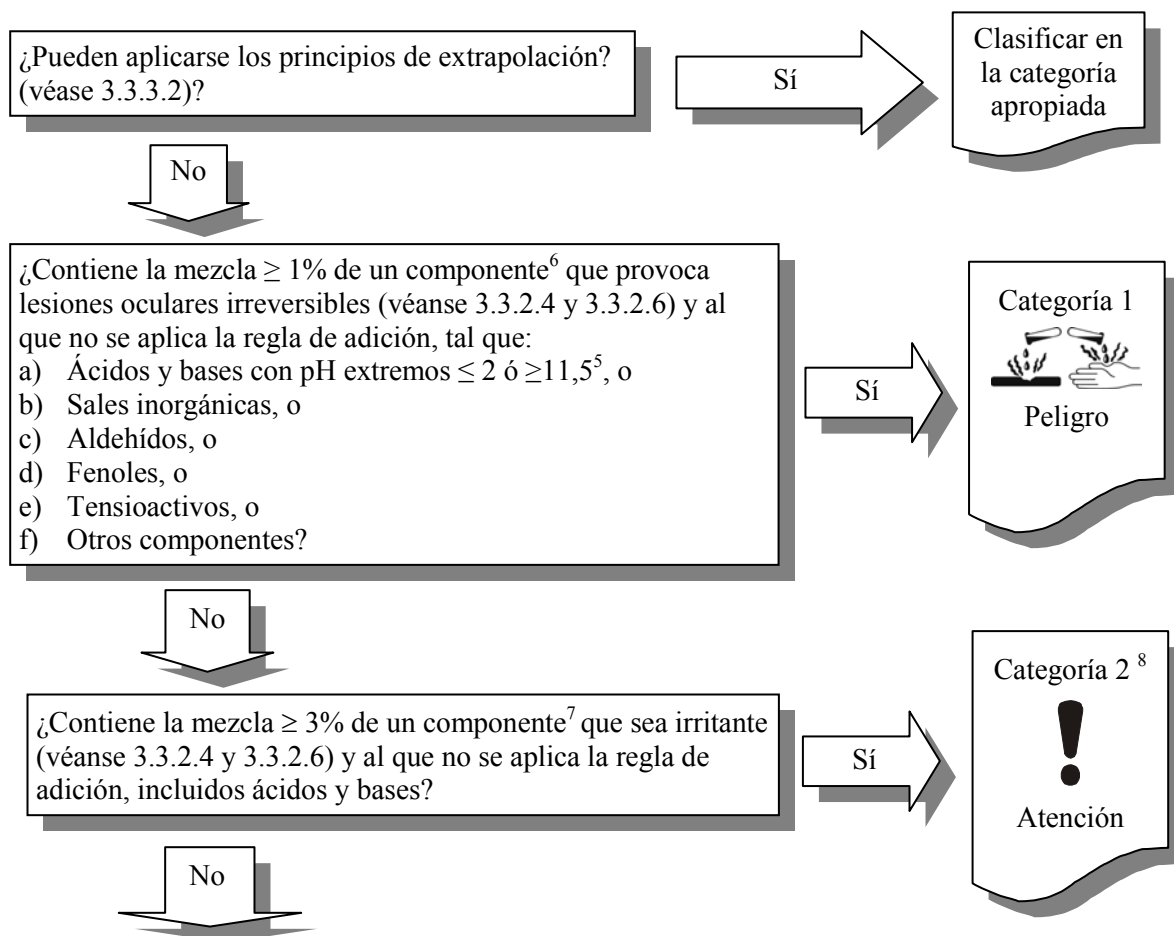
<sup>5</sup> Se tendrá también presente la capacidad de reserva ácida/alcalina, cuando proceda.



<sup>4</sup> La figura 3.3.1 contiene detalles sobre la estrategia de ensayo y evaluación.

### 3.3.5.2 Procedimiento de decisión 3.3.2 para lesiones oculares graves/irritación ocular

#### Clasificación de mezclas sobre la base de información/datos de sus componentes



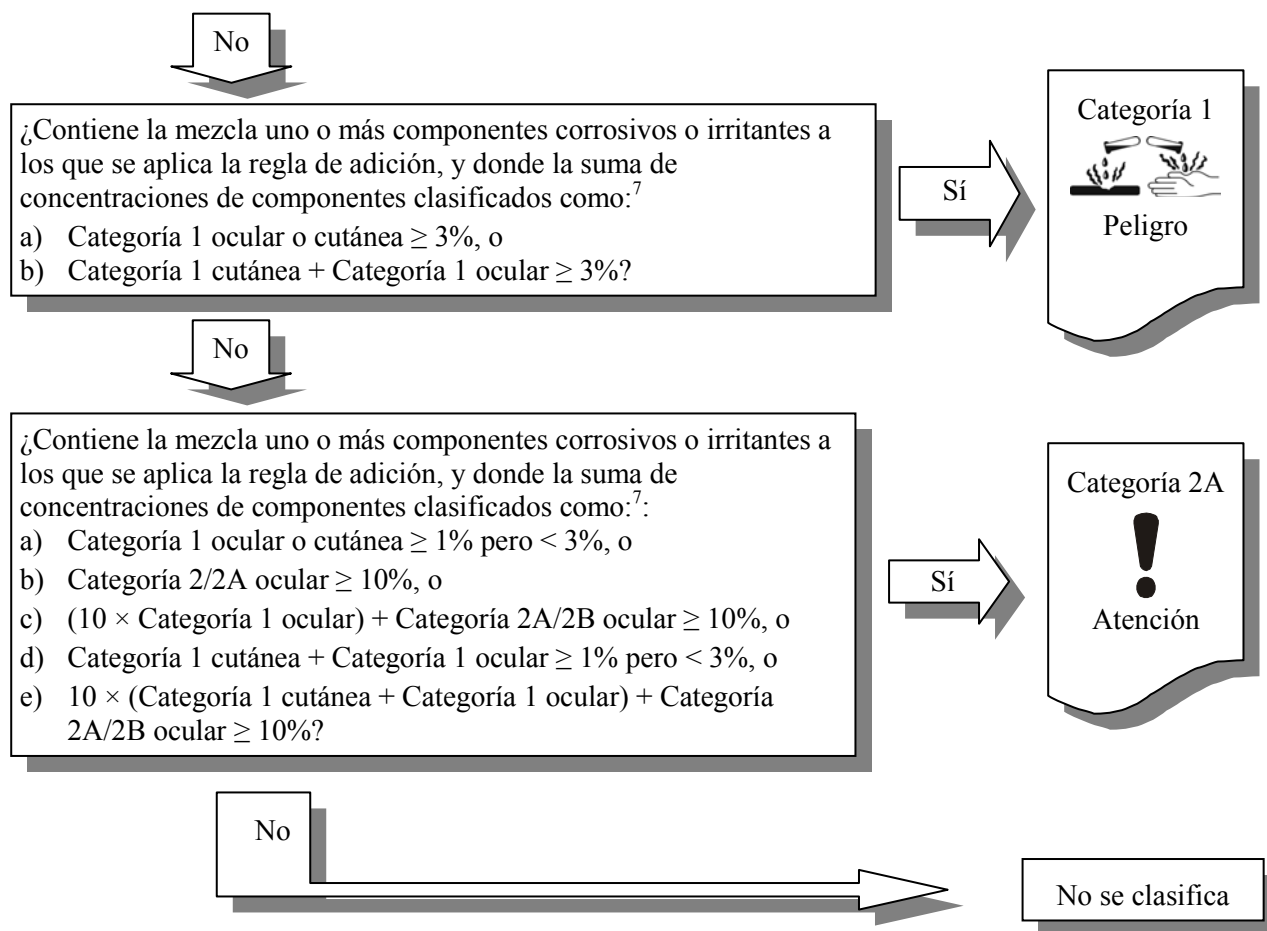
(Continúa en la página siguiente)

<sup>5</sup> Se tendrá también presente la capacidad de reserva ácida/alcalina, cuando proceda.

<sup>6</sup> O cuando sea relevante < 1%, véase 3.3.3.3.1.

<sup>7</sup> Para los límites de concentración específicos, véase 3.3.3.3.4. Véase también 1.3.3.2 en el capítulo 1.3, «Uso de valores de corte/límites de concentración».

<sup>8</sup> Si la mezcla contiene también otros componentes corrosivos o irritantes a los que se aplica la regla de adición, pásese a la etapa siguiente.



<sup>7</sup> Para los límites de concentración específicos, véase 3.3.3.3.4. Véase también 1.3.3.2 en el capítulo 1.3 “Uso de valores de corte/límites de concentración”.

## CAPÍTULO 3.4

### SENSIBILIZACIÓN RESPIRATORIA O CUTÁNEA

#### 3.4.1 Definiciones y consideraciones generales

3.4.1.1 Un *sensibilizante respiratorio* es una sustancia cuya inhalación da lugar a hipersensibilidad en las vías respiratorias<sup>1</sup>.

Un *sensibilizante cutáneo* es una sustancia que da lugar a una respuesta alérgica por contacto con la piel<sup>1</sup>.

3.4.1.2 A los efectos del presente capítulo, la sensibilización tiene dos fases. La primera es la inducción de una memoria inmunológica especializada en una persona cuando ésta se halla expuesta a un alérgeno. La segunda fase es la activación, es decir, la producción de una reacción alérgica por medio de una célula o un anticuerpo a raíz de la exposición de una persona sensibilizada a un alérgeno.

3.4.1.3 El proceso de inducción seguido por una fase de activación se desarrolla de la misma manera en la sensibilización respiratoria y en la sensibilización cutánea. En el caso de esta última, la fase de inducción es necesaria para que el sistema inmunitario aprenda a reaccionar; a continuación pueden aparecer síntomas clínicos cuando la exposición subsecuente es suficiente para activar una reacción cutánea visible (fase de activación). Por consiguiente, suelen realizarse pruebas de predicción después de un proceso en que hay una fase de inducción, y la reacción a esta última se mide por una fase de activación normalizada que, en general, recurre a una prueba epicutánea. La prueba local sobre los ganglios linfáticos es la excepción, en el sentido de que mide directamente la inducción. La sensibilización cutánea en el ser humano generalmente queda revelada por un test epicutáneo diagnóstico.

3.4.1.4 En general, tanto en el caso de la sensibilización cutánea como en el de la sensibilización respiratoria, se requieren niveles inferiores a los que son necesarios para la inducción. Las disposiciones destinadas a alertar a las personas sensibilizadas respecto de la presencia de un sensibilizante determinado en una mezcla se hallan en 3.4.4.2.

3.4.1.5 La clase de peligro “sensibilización respiratoria o cutánea” se divide en:

- a) Sensibilización respiratoria; y
- b) Sensibilización cutánea.

#### 3.4.2 Criterios de clasificación para las sustancias

##### 3.4.2.1 *Sensibilizantes respiratorios*

###### 3.4.2.1.1 *Categorías de peligro*

3.4.2.1.1.1 Los sensibilizantes respiratorios se clasificarán en la Categoría 1 cuando la autoridad competente no exija su clasificación en una subcategoría o cuando los datos no sean suficientes para esa clasificación.

3.4.2.1.1.2 Cuando los datos sean suficientes y cuando lo exija una autoridad competente, una evaluación más precisa con arreglo a lo dispuesto en 3.4.2.1.1.3 permitirá asignar los sensibilizantes respiratorios a la subcategoría 1A, sensibilizantes fuertes, o a la subcategoría 1B, en el caso de otros sensibilizantes respiratorios.

---

<sup>1</sup> Es ésta una definición de trabajo a los efectos del presente documento.



3.4.2.1.1.3 Los efectos observados ya sea en seres humanos o en animales justificarán normalmente la clasificación de los sensibilizantes respiratorios sobre la base del valor probatorio de los datos disponibles. Las sustancias pueden asignarse a una de las dos subcategorías, 1A o 1B, aplicando este enfoque conjuntamente con los criterios consignados en la tabla 3.4.1 y basándose en pruebas fiables y de buena calidad procedentes de la experiencia en seres humanos o en estudios epidemiológicos y/u observaciones recabadas de estudios adecuados en animales de experimentación.

**Tabla 3.4.1: Categoría y subcategorías de peligro para los sensibilizantes respiratorios**

<b>CATEGORÍA 1:</b>	<b>Sensibilizante respiratorio</b>
	Una sustancia se clasificará como sensibilizante respiratorio: a) Si hay pruebas en seres humanos de que puede provocar hipersensibilidad respiratoria específica y/o b) Si un ensayo adecuado en animales arroja resultados positivos <sup>2</sup> .
<b>Sub-categoría 1A:</b>	Sustancias asociadas con una frecuencia elevada de casos de sensibilización en seres humanos; o que, a juzgar por los resultados de ensayos en animales o de otra índole, tienen probabilidades de producir una alta tasa de sensibilización en seres humanos <sup>2</sup> . También puede tomarse en consideración la gravedad de la reacción.
<b>Sub-categoría 1B:</b>	Sustancias asociadas con una frecuencia de baja a moderada de casos de sensibilización en seres humanos; o que, a juzgar por los resultados de ensayos en animales o de otra índole, tienen probabilidades de producir una tasa de sensibilización de baja a moderada en seres humanos <sup>2</sup> . También puede tomarse en consideración la gravedad de la reacción.

#### 3.4.2.1.2 *Datos obtenidos a partir de estudios en humanos*

3.4.2.1.2.1 La información de que una sustancia puede provocar una hipersensibilidad respiratoria específica se basará normalmente en la experiencia en seres humanos. En este contexto, la hipersensibilidad se manifiesta comúnmente como asma, pero también hay otras reacciones de hipersensibilidad tales como rinitis, conjuntivitis y alveolitis. El síntoma deberá tener el carácter clínico de una reacción alérgica. No obstante, no será necesario demostrar la implicación de mecanismos inmunológicos.

3.4.2.1.2.2 Al considerar los datos obtenidos a partir de estudios en humanos, para decidir sobre la clasificación habrá que tener presente además de la información de los casos estudiados:

- a) El tamaño de la población expuesta;
- b) La duración de la exposición.

3.4.2.1.2.3 Estos datos podrían consistir en:

- a) La historia y los datos clínicos de ensayos apropiados de funcionamiento de los pulmones en una exposición a la sustancia, confirmados por otros datos que pueden comprender:
  - i) un ensayo inmunológico *in vivo* (por ejemplo, un ensayo de inyección dérmica);
  - ii) un ensayo inmunológico *in vitro* (por ejemplo, un análisis serológico);
  - iii) estudios que puedan indicar otras reacciones de hipersensibilidad específica cuando no se han probado los mecanismos de acción inmunológica, por

<sup>2</sup> Actualmente no se dispone de modelos reconocidos y validados para el ensayo de la hipersensibilidad respiratoria en animales. En determinadas circunstancias, los datos obtenidos a partir de estudios en animales pueden proporcionar información útil para una evaluación basada en el valor probatorio de los datos disponibles.

ejemplo una irritación ligera recurrente o reacciones inducidas por medicamentos;

iv) una estructura química relacionada con sustancias de las que se sabe que provocan hipersensibilidad respiratoria;

b) Resultados positivos de ensayos de estimulación bronquial efectuados de conformidad con las pautas aceptadas para determinar una reacción de hipersensibilidad específica.

3.4.2.1.2.4 La historia clínica debería comprender los antecedentes tanto médicos como laborales para determinar la relación entre la exposición a una sustancia específica y el desarrollo de hipersensibilidad respiratoria. Entre la información pertinente figuran factores agravantes tanto en el hogar como en el lugar de trabajo, la aparición y la progresión de la enfermedad, los antecedentes familiares y el historial médico del paciente. Esos antecedentes deberían también incluir una nota sobre otros posibles problemas alérgicos o respiratorios desde la infancia, y el historial de tabaquismo del paciente.

3.4.2.1.2.5 Se considera que los resultados positivos de un ensayo de estimulación bronquial proporcionan por sí solos información suficiente para la clasificación. Se reconoce, sin embargo, que en la práctica muchos de los exámenes indicados ya se habrán efectuado.

#### 3.4.2.1.3 *Datos obtenidos a partir de estudios en animales*

Entre los datos de los estudios apropiados en animales<sup>2</sup> que pueden indicar el potencial de una sustancia para provocar sensibilización por inhalación en seres humanos<sup>3</sup> figuran:

a) mediciones de la inmunoglobulina E (IgE) y otros parámetros inmunológicos específicos, por ejemplo en el ratón;

b) reacciones pulmonares específicas en cobayas.

### 3.4.2.2 *Sensibilizantes cutáneos*

#### 3.4.2.2.1 *Categorías de peligro*

3.4.2.2.1.1 Los sensibilizantes cutáneos se clasificarán en la Categoría 1 cuando la autoridad competente no exija su clasificación en una subcategoría o cuando los datos no sean suficientes para esa clasificación.

3.4.2.2.1.2 Cuando los datos sean suficientes y cuando lo exija una autoridad competente, una evaluación más precisa con arreglo a lo dispuesto en 3.4.2.2.1.3 permitirá asignar los sensibilizantes cutáneos a la subcategoría 1A, sensibilizantes fuertes, o a la subcategoría 1B, en el caso de otros sensibilizantes cutáneos.

3.4.2.2.1.3 Los efectos observados ya sea en seres humanos o en animales justificarán normalmente la clasificación de los sensibilizantes cutáneos sobre la base del valor probatorio de los datos disponibles como se describe en 3.4.2.2.2. Las sustancias pueden asignarse a una de las dos subcategorías, 1A o 1B, aplicando este enfoque conjuntamente con los criterios consignados en la tabla 3.4.2 y basándose en pruebas fiables y de buena calidad procedentes de la experiencia en seres humanos o en estudios epidemiológicos y/u observaciones recabadas de estudios adecuados en animales de experimentación, de conformidad con los

---

<sup>2</sup> Actualmente no se dispone de modelos reconocidos y validados para el ensayo de la hipersensibilidad respiratoria en animales. En determinadas circunstancias, los datos obtenidos a partir de estudios en animales pueden proporcionar información útil para una evaluación basada en el valor probatorio de los datos disponibles.

<sup>3</sup> Los mecanismos por los que las sustancias inducen síntomas de asma no se conocen bien. Con carácter preventivo, esas sustancias se consideran sensibilizadores respiratorios. Sin embargo, si sobre la base de la evidencia, puede demostrarse que esas sustancias inducen síntomas de asma por irritación, solamente en personas con hiperreactividad bronquial, no deberían considerarse sensibilizadores respiratorios.

valores de orientación proporcionados en 3.4.2.2.2.1 y 3.4.2.2.3.2 para la subcategoría 1A y en 3.4.2.2.2.2 y 3.4.2.2.3.3 para la subcategoría 1B.

**Tabla 3.4.2: Categoría y subcategorías de peligros para los sensibilizantes cutáneos**

CATEGORÍA 1	Sensibilizante cutáneo
	Una sustancia se clasificará como sensibilizante cutáneo: a) Si hay pruebas en seres humanos de que puede dar lugar a sensibilización por contacto cutáneo en un número elevado de personas, o b) Si un ensayo adecuado en animales arroja resultados positivos.
<b>Sub-categoría 1A</b>	Las sustancias asociadas con una frecuencia elevada de casos de sensibilización en seres humanos y/o una alta potencia en animales pueden considerarse como sustancias capaces de producir una sensibilización importante en seres humanos. También puede tomarse en consideración la gravedad de la reacción.
<b>Sub-categoría 1B</b>	Las sustancias asociadas con una frecuencia de baja a moderada de casos de sensibilización en seres humanos y/o una potencia de baja a moderada en animales pueden considerarse como sustancias capaces de producir sensibilización en seres humanos. También puede tomarse en consideración la gravedad de la reacción.

#### 3.4.2.2.2 *Datos obtenidos en seres humanos*

3.4.2.2.2.1 Los datos obtenidos en seres humanos para la categoría 1A pueden consistir en:

- a) Respuestas positivas a concentraciones  $\leq 500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (HRIPT, ensayos de maximización en seres humanos - umbral de inducción);
- b) Datos diagnósticos de ensayos con parches, cuando exista una incidencia relativamente alta y sustancial de reacciones en una población definida en relación con una exposición relativamente baja;
- c) Otros datos epidemiológicos cuando exista una incidencia relativamente alta y sustancial de dermatitis de contacto alérgica en relación con una exposición relativamente baja.

3.4.2.2.2.2 Los datos obtenidos en seres humanos para la categoría 1B pueden consistir en:

- a) Respuestas positivas a concentraciones  $> 500 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (HRIPT, ensayos de maximización en seres humanos - umbral de inducción);
- b) Datos diagnósticos de ensayos con parches cuando exista una incidencia relativamente baja pero sustancial de reacciones en una población definida en relación con una exposición relativamente alta;
- c) Otros datos epidemiológicos cuando exista una incidencia relativamente baja pero sustancial de dermatitis de contacto alérgica en relación con una exposición relativamente alta.

#### 3.4.2.2.3 *Estudios con animales*

3.4.2.2.3.1 Para la Categoría 1, cuando se use un método de ensayo con adyuvantes para la sensibilización cutánea, una respuesta de al menos el 30% de los animales se considerará positiva. En un método sin adyuvante en cobayas se requerirá una respuesta de al menos el 15%. Para la Categoría 1, un índice de estimulación de tres o más se considera una respuesta positiva en un ensayo local en nódulos linfáticos. Los métodos de ensayo de sensibilización cutánea se describen en las Directrices 406 (Ensayo de maximización en cobaya y ensayo de Buehler también en cobaya) y 429 (ensayo local en nódulos linfáticos) de la OCDE. Podrán usarse otros métodos siempre que estén bien validados y justificados científicamente. El

ensayo de tumefacción de la oreja del ratón (MEST) parece ser una prueba fidedigna de selección para detectar sensibilizantes entre moderados y fuertes, y puede usarse como una primera etapa para evaluar el potencial de sensibilización de la piel.

3.4.2.2.3.2 Los resultados de ensayos en animales para la subcategoría 1A pueden incluir datos con los valores indicados en la tabla 3.4.3:

**Tabla 3.4.3: Resultados de ensayos en animales para la subcategoría 1A**

Ensayo	Criterios
Ensayo local en nódulos linfáticos	Valor de la CE3 $\leq 2\%$
Ensayo de maximización con cobayas	$\geq 30\%$ responde a una dosis de inducción intradérmica $\leq 0,1\%$ o $\geq 60\%$ responde a una dosis de inducción intradérmica $> 0,1\%$ e $\leq 1\%$
Ensayo de Buehler	$\geq 15\%$ responde a una dosis de inducción tópica $\leq 0,2\%$ o $\geq 60\%$ responde a una dosis de inducción tópica $> 0,2\%$ e $\leq 20\%$

3.4.2.2.3.3 Los resultados de ensayos en animales para la subcategoría 1B pueden incluir datos con los valores que se indican en la tabla 3.4.4:

**Tabla 3.4.4: Resultados de ensayos en animales para la subcategoría 1B**

Ensayo	Criterios
Ensayo local en nódulos linfáticos	Valor de la CE3 $> 2\%$
Ensayo de maximización con cobayas	$\geq 30\%$ a $< 60\%$ responde a una dosis de inducción intradérmica $> 0,1\%$ e $\leq 1\%$ o $\geq 30\%$ responde a una dosis de inducción intradérmica $> 1\%$
Ensayo de Buehler	$\geq 15\%$ a $< 60\%$ responde a una dosis de inducción tópica $> 0,2\%$ e $\leq 20\%$ o $\geq 15\%$ responde a una dosis de inducción tópica $> 20\%$

#### 3.4.2.2.4 Consideraciones específicas

3.4.2.2.4.1 La clasificación de una sustancia debe hacerse sobre el análisis de la totalidad o parte de la información siguiente, aplicando un enfoque basado en el valor probatorio de los datos disponibles:

- Datos positivos de ensayos sobre la epidermis, obtenidos normalmente en una o varias clínicas dermatológicas;
- Estudios epidemiológicos que muestren dermatitis alérgica de contacto causada por la sustancia. Las situaciones en las que una elevada proporción de las personas expuestas presentan síntomas característicos se examinarán con especial atención, incluso si el número de casos es pequeño;
- Datos positivos de estudios apropiados en animales;
- Datos positivos de estudios experimentales en seres humanos (Véase 1.3.2.4.7 en el capítulo 1.3);
- Episodios bien documentados de dermatitis alérgica por contacto, normalmente observados en más de una clínica dermatológica;
- También podrá tenerse en cuenta la gravedad de la reacción.

3.4.2.2.4.2 La información de estudios con animales suele ser mucho más fidedigna que la obtenida de la exposición de seres humanos. No obstante, en casos en que se disponga de datos de ambas fuentes, y los resultados sean contradictorios, habrá que evaluar la calidad y fiabilidad de las dos informaciones para resolver la cuestión de la clasificación examinando caso por caso. Normalmente, los datos humanos no proceden de experimentos controlados con voluntarios para fines de clasificación de peligro sino como parte de ensayos para confirmar la falta de efectos observada en los ensayos en animales. Por consiguiente, los resultados positivos sobre sensibilización cutánea en humanos suelen proceder de estudios de confirmación escasos o de otros menos definidos. La evaluación de esos datos ha de hacerse, por tanto, con cautela, ya que su frecuencia reflejará, además de las propiedades intrínsecas de las sustancias, factores tales como las circunstancias de la exposición, la biodisponibilidad, la predisposición individual y las medidas preventivas adoptadas. Datos humanos negativos no deberían normalmente usarse para descartar resultados positivos de estudios en animales. Tanto en el caso de datos humanos como en el de datos de animales, deberá tenerse en cuenta el efecto del vector.

3.4.2.2.4.3 Si no se cumple ninguna de las condiciones indicadas, la sustancia no se clasificará como sensibilizante cutáneo. No obstante, una combinación de dos o más indicadores de sensibilización cutánea, como los que se indican seguidamente, puede alterar la decisión. Ésta tendrá que tomarse caso por caso.

- a) Episodios aislados de dermatitis alérgica de contacto;
- b) Estudios epidemiológicos de alcance limitado, por ejemplo cuando no cabe confiar razonablemente en que se hayan descartado totalmente casualidades, sesgos o factores de confusión;
- c) Datos de ensayos en animales, efectuados con arreglo a las pautas existentes, que no cumplen los criterios sobre resultados positivos descritos en 3.4.2.2.3, pero que son lo bastante cercanos al límite para que se consideren significativos;
- d) Datos positivos de métodos no normalizados;
- e) Resultados positivos de productos análogos de estructura muy parecida.

#### 3.4.2.2.4.4 *Urticaria inmunológica de contacto*

Las sustancias que cumplen los criterios de clasificación como sensibilizantes respiratorios pueden provocar, además, urticarias inmunológicas de contacto. Habrá entonces que clasificarlas también como sensibilizantes cutáneos, al igual que aquéllas que provocan urticarias inmunológicas de contacto sin cumplir los criterios de clasificación como sensibilizantes respiratorios.

No existe un modelo animal reconocido para identificar sustancias que provocan urticarias inmunológicas de contacto. Por tanto, la clasificación normalmente se basará en datos en humanos similares a los de sensibilización cutánea.

### 3.4.3 **Criterios de clasificación para las mezclas**

#### 3.4.3.1 *Clasificación de mezclas cuando se dispone de datos sobre las mismas*

Cuando para la mezcla se disponga de información fiable y de buena calidad procedente de la experiencia humana o de estudios apropiados en animales, tal como se describen en los criterios para las sustancias, ésta podrá clasificarse mediante esos datos. Al evaluar los datos de mezclas habrá que tener cuidado de que la dosis usada no conduzca a que los resultados sean poco concluyentes. (Respecto del etiquetado especial requerido por algunas autoridades competentes, véanse la nota de la tabla 3.4.5 del presente capítulo y el párrafo 3.4.4.2).

### **3.4.3.2 *Clasificación de mezclas cuando no se dispone de datos sobre las mismas: Principios de extrapolación***

Cuando no se hayan realizado ensayos sobre la mezcla como tal para determinar sus propiedades sensibilizantes, pero se disponga de datos suficientes tanto sobre sus componentes individuales como sobre mezclas similares sometidas a ensayo para caracterizar debidamente sus peligros, se usarán esos datos de conformidad con los principios de extrapolación descritos a continuación. De esta manera se asegura la utilización del mayor número de datos disponibles durante el proceso de clasificación con el fin de caracterizar los peligros de la mezcla sin necesidad de efectuar ensayos adicionales en animales.

#### **3.4.3.2.2 *Dilución***

Si una mezcla sometida a ensayo se diluye con un diluyente no sensibilizante y del que no se espera que influya sobre la sensibilización de otros componentes, la nueva mezcla diluida se considerará a efectos de clasificación como equivalente a la mezcla original sometida a ensayo.

#### **3.4.3.2.3 *Variación entre lotes***

Las propiedades sensibilizantes de un lote sometido a ensayo de una mezcla se considerarán esencialmente equivalentes a la de otro lote no sometido a ensayo del mismo producto comercial que haya sido obtenido por el mismo fabricante o bajo su control, a menos que haya motivos para creer que se han producido cambios que pueden provocar modificaciones en el potencial de sensibilización del lote no sometido a ensayo. Cuando esto ocurra será necesaria una nueva clasificación.

#### **3.4.3.2.4 *Concentración de las mezclas de la categoría/subcategoría de sensibilización más alta***

Si una mezcla sometida a ensayo se clasifica en la Categoría 1 o en la sub-categoría 1A, y se aumenta la concentración de los componentes de esa mezcla sometida a ensayo clasificados en la Categoría 1 y la sub-categoría 1A, la mezcla no sometida a ensayo resultante se clasificará en la Categoría 1 o en la Subcategoría 1A sin que sea necesario realizar ensayos adicionales.

#### **3.4.3.2.5 *Interpolación dentro de una categoría/subcategoría***

En el caso de tres mezclas (A, B y C) con componentes idénticos, en que las mezclas A y B hayan sido sometidas a ensayo y clasificadas en la misma categoría/subcategoría, y la mezcla C, no sometida a ensayo, tenga los mismos componentes toxicológicamente activos que las mezclas A y B pero concentraciones de esos componentes intermedias entre las de las mezclas A y B, se considerará que la mezcla C pertenece a la misma categoría/subcategoría que A y B.

#### **3.4.3.2.6 *Mezclas esencialmente similares***

Cuando se tenga lo siguiente:

- a) Dos mezclas:
  - i) A + B;
  - ii) C + B;
- b) La concentración del componente B sea básicamente la misma en ambas mezclas;
- c) La concentración del componente A en la mezcla i) sea igual a la del componente C en la mezcla ii);
- d) El componente B sea un sensibilizante y los componentes A y C no lo sean;
- e) No se espera que A y C afecten a las propiedades sensibilizantes de B.

Si la mezcla i) o ii) está ya clasificada gracias a los ensayos, entonces la otra mezcla podrá asignarse a la misma categoría de peligro.

#### 3.9.3.3.4 *Concentración de mezclas muy tóxicas*

Si en una mezcla de la Categoría 1 sometida a ensayo, se aumenta la concentración de un componente tóxico, la mezcla concentrada resultante se clasificará en la Categoría 1 sin que sea necesario realizar ensayos adicionales.

#### 3.9.3.3.5 *Interpolación dentro de una misma categoría de toxicidad*

En el caso de tres mezclas (A, B y C) con componentes idénticos, en que las mezclas A y B hayan sido sometidas a ensayo y clasificadas en la misma categoría de toxicidad y la mezcla C no sometida a ensayo, tenga los mismos componentes toxicológicamente activos que las mezclas A y B pero concentraciones de esos componentes intermedias entre las de las mezclas A y B, se considerará que la mezcla C pertenece a la misma categoría de toxicidad que A y B.

#### 3.9.3.3.6 *Mezclas esencialmente similares*

Cuando se tenga lo siguiente:

- a) Dos mezclas:    i)    A + B;  
                              ii)    C + B;
- b) La concentración del componente B sea la misma en ambas mezclas;
- c) La concentración del componente A en la mezcla i) es prácticamente igual a la del componente C en la mezcla ii);
- d) Se dispone de datos, esencialmente equivalentes, sobre la toxicidad de A y C, es decir, ambos pertenecen a la misma categoría de peligro y no se espera que afecten a la toxicidad de B.

Si la mezcla i) o ii) está ya clasificada sobre la base de datos experimentales, entonces la otra mezcla podrá clasificarse en la misma categoría de peligro.

#### 3.9.3.3.7 *Aerosoles*

Una mezcla en forma de aerosol podrá clasificarse en la misma categoría de peligro para la toxicidad por vía oral y cutánea que la mezcla no aerosolizada no sometida a ensayo, siempre que el propelente añadido no afecte a la toxicidad de la mezcla durante la vaporización. La clasificación de mezclas en forma de aerosol para la toxicidad por inhalación debería hacerse por separado.

#### **3.9.3.4 *Clasificación de mezclas cuando se dispone de datos para todos los componentes o sólo para algunos***

3.9.3.4.1 Cuando no se disponga de información fiable o de datos de ensayos sobre la mezcla, y no puedan usarse los principios de extrapolación para clasificar, la clasificación de la mezcla se basará en la de sus componentes. En este caso, la mezcla se clasificará como tóxica específica de órganos diana (que debe especificarse), tras una exposición única, repetida o ambas, cuando al menos uno de sus componentes se haya clasificado en la Categoría 1 o 2 y esté presente en una concentración igual o superior a la del valor de corte/límite de concentración apropiado indicado en la tabla 3.9.3 para las Categorías 1 y 2 respectivamente.

**Tabla 3.9.3: Valores de corte/límites de concentración de los componentes de una mezcla clasificados como tóxicos específicos de órganos diana que determinan la clasificación de la mezcla<sup>a</sup>**

Componentes Clasificado como:	Valores de corte/límites de concentración que determinan la clasificación de una mezcla como:	
	Categoría 1	Categoría 2
Categoría 1	$\geq 1,0$ (nota 1)	$1,0 \leq \text{componente} < 10\%$ (nota 3)
Tóxico sistémico específico de órganos diana	$\geq 10\%$ (nota 2)	$1,0 \leq \text{componente} < 10\%$ (nota 3)
Categoría 2	---	$\geq 1,0\%$ (nota 4)
Tóxico sistémico específico de órganos diana		$\geq 10\%$ (nota 5)

<sup>a</sup> Este sistema de clasificación supone un compromiso entre las diferentes prácticas de comunicación de peligros de los sistemas existentes. Se espera que el número de mezclas afectadas sea pequeño; las diferencias se limitarán a las advertencias en la etiqueta y la situación evolucionará con el tiempo hacia un enfoque más armonizado.

**NOTA 1:** Si en la mezcla está presente un componente clasificado como tóxico específico de órganos diana Categoría 1, en una concentración comprendida entre 1,0% y 10%, todas las autoridades reguladoras solicitarán que figure la información en la FDS del producto. No obstante, será facultativo incluir una advertencia en la etiqueta. Algunas autoridades optarán por la etiqueta cuando el componente esté presente en la mezcla entre 1,0% y 10%, mientras que otras no la requerirán.

**NOTA 2:** Si en la mezcla está presente un componente clasificado como tóxico específico de órganos diana Categoría 1 en una concentración  $\geq 10\%$ , generalmente se solicitará tanto la FDS como la etiqueta.

**NOTA 3:** Si en la mezcla está presente un componente clasificado como tóxico específico en órganos diana Categoría 1 en una concentración comprendida entre 1,0% y 10%, algunas autoridades optarán por clasificar la mezcla como tóxica específica de órganos diana Categoría 2.

**NOTA 4:** Si en la mezcla está presente un componente tóxico específico de órganos diana Categoría 2 en una concentración comprendida entre 1,0% y 10%, todas las autoridades reguladoras solicitarán que figure la información sobre la FDS del producto. No obstante, será facultativo incluir una advertencia en la etiqueta. Algunas autoridades optarán por solicitar la etiqueta cuando el componente esté presente en la mezcla entre 1,0% y 10%, mientras que otras no la solicitarán.

**NOTA 5:** Si en la mezcla está presente un componente tóxico específico de órganos diana Categoría 2 en una concentración  $\geq 10\%$ , generalmente se solicitará tanto una FDS como la etiqueta.

3.9.3.4.2 Estos valores de corte/límites de concentración y las consecuentes clasificaciones se aplicarán por igual y de manera apropiada a sustancias tóxicas específicas de órganos diana en dosis tanto únicas como repetidas.

3.9.3.4.3 Las mezclas deberían clasificarse por separado según que su toxicidad se deba a la administración de una dosis única o de dosis repetidas.

3.9.3.4.4 Cuando los tóxicos afectan a más de un órgano y están combinados, habrá que prestar atención a las interacciones sinérgicas, ya que ciertas sustancias pueden ser tóxicas para un órgano diana con una concentración  $< 1\%$  si en la mezcla existen otros componentes conocidos por su capacidad de potenciar ese efecto tóxico.



### 3.9.4 Comunicación de peligro

En el capítulo 1.4 (*Comunicación de peligros: Etiquetado*) figuran las consideraciones generales y específicas sobre los requisitos de etiquetado. El anexo 2 contiene tablas resumen sobre clasificación y etiquetado. El anexo 3 contiene ejemplos de consejos de prudencia y pictogramas de precaución que pueden utilizarse con la aprobación de la autoridad competente.

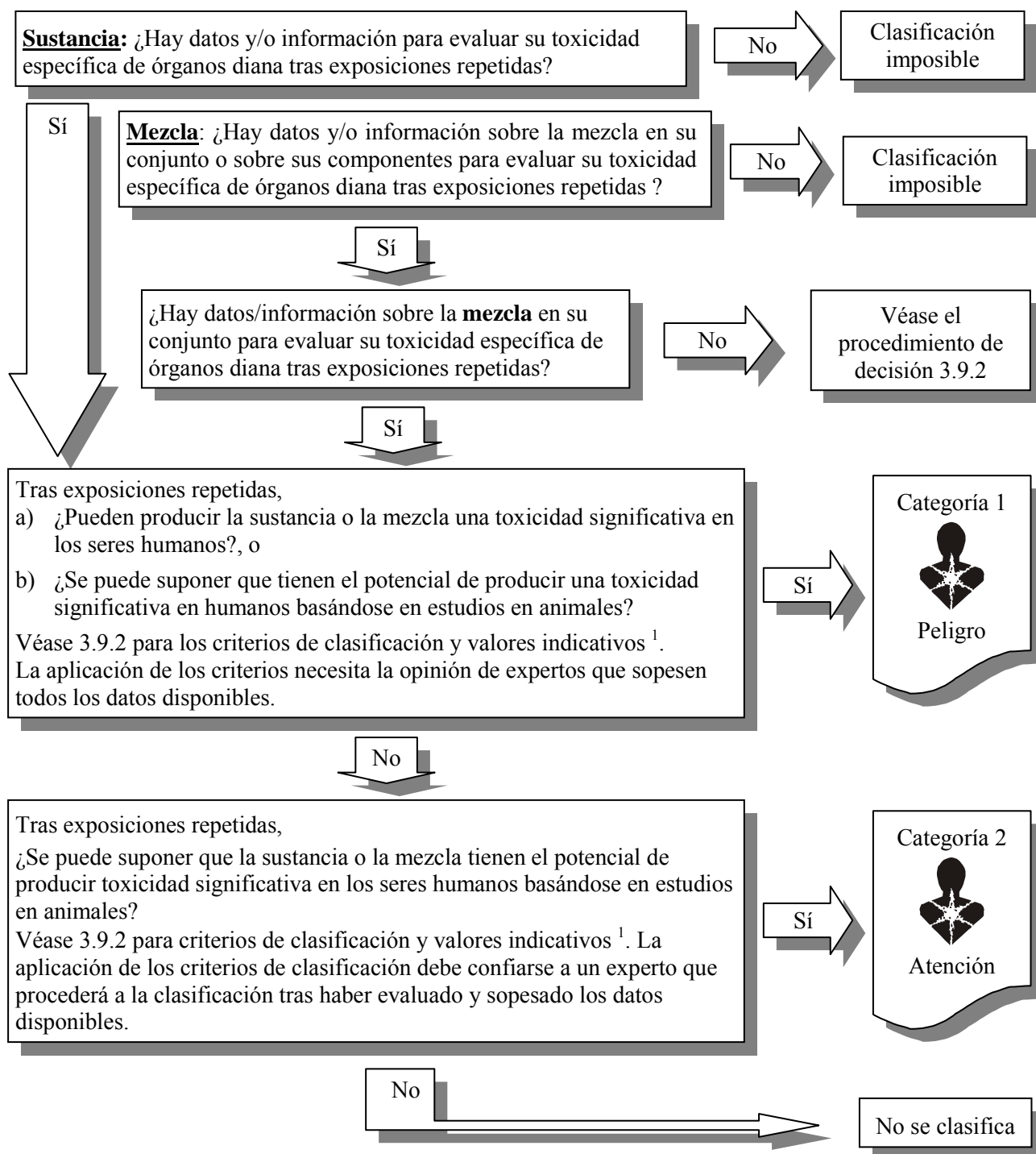
**Tabla 3.9.4: Elementos que deben figurar en las etiquetas de sustancias y mezclas clasificadas por su toxicidad específica de órganos diana tras exposiciones repetidas**

	<b>Categoría 1</b>	<b>Categoría 2</b>
<b>Símbolo</b>	Peligro para la salud	Peligro para la salud
<b>Palabra de advertencia</b>	Peligro	Atención
<b>Indicación de peligro</b>	Provoca daños en los órganos (indíquense todos los órganos afectados si se conocen) tras exposiciones prolongadas o repetidas (indíquese la vía de exposición si se ha demostrado concluyentemente que ninguna otra vía es peligrosa)	Puede provocar daños en los órganos (indíquense todos los órganos afectados si se conocen) tras exposiciones prolongadas o repetidas (indíquese la vía de exposición si se ha demostrado concluyentemente que ninguna otra vía es peligrosa)

### 3.9.5 Procedimiento de decisión para la clasificación basada en la toxicidad específica de órganos diana tras exposiciones repetidas

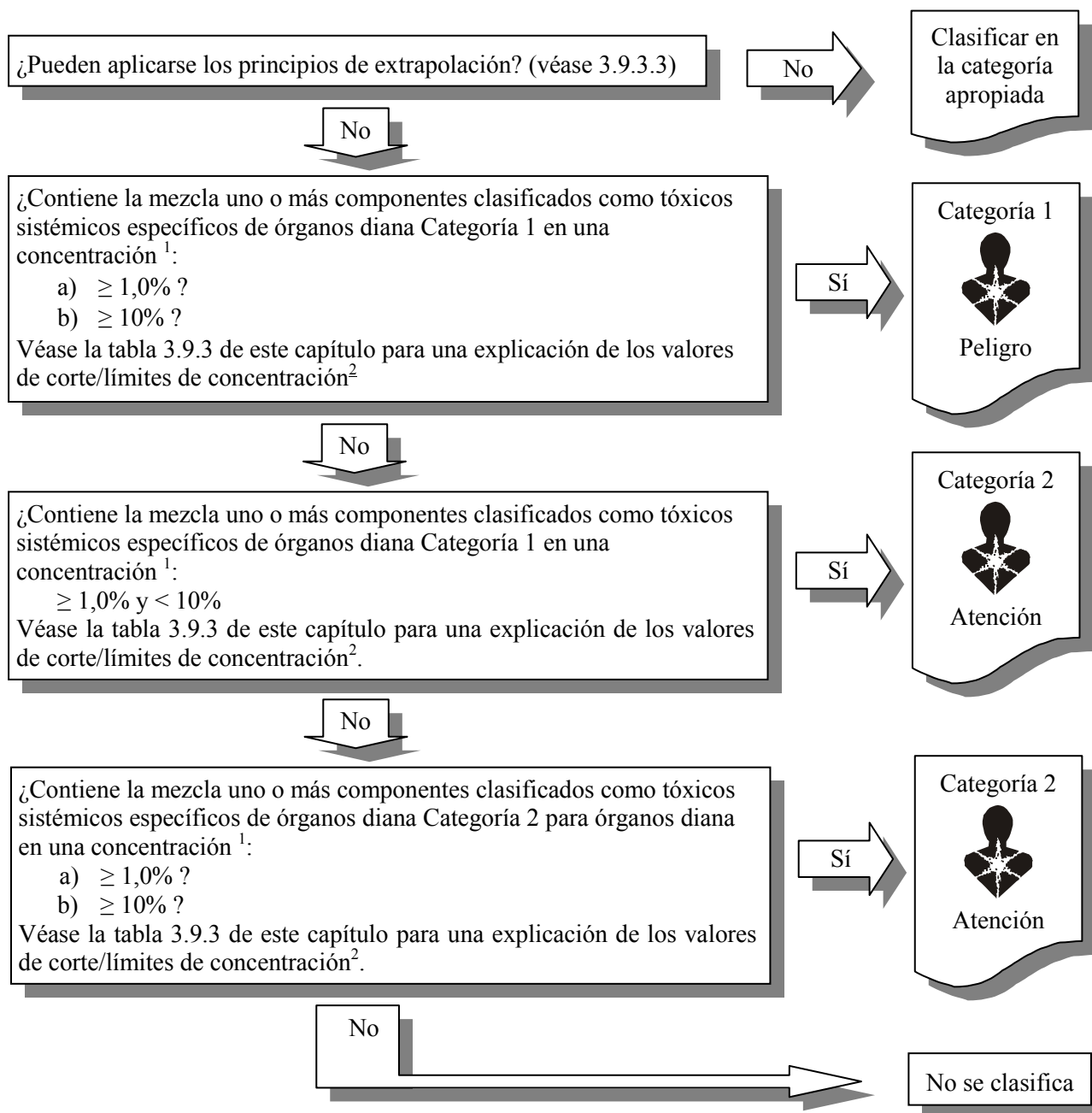
Los procedimientos de decisión siguientes no forman parte del sistema de clasificación armonizado, pero figuran aquí como orientación adicional. Se recomienda encarecidamente que la persona que se encargue de la clasificación estudie los criterios de clasificación antes y durante la aplicación de estos procedimientos de decisión.

### 3.9.5.1 Procedimiento de decisión 3.9.1



<sup>1</sup> Véase 3.9.2 y tablas 3.9.1 y 3.9.2 en este capítulo, y “Uso de valores de corte/límites de concentración” en el párrafo 1.3.3.2 del capítulo 1.3.

### 3.9.5.2 Procedimiento de decisión 3.9.2



<sup>1</sup> Véanse 3.9.2 y tablas 3.9.1 y 3.9.2 en este capítulo, y “Uso de valores de corte/límites de concentración” en el párrafo 1.3.3.2 del capítulo 1.3.

<sup>2</sup> Véanse 3.9.3.4 y 3.9.4 y la tabla 3.9.3 para explicaciones y orientación.



## CAPÍTULO 3.10

### PELIGRO POR ASPIRACIÓN

#### 3.10.1 Definiciones y consideraciones generales

3.10.1.1 El propósito de este capítulo es ofrecer un sistema de clasificación de sustancias o mezclas que pueden presentar un peligro de toxicidad por aspiración para el ser humano.

3.10.1.2 Por *aspiración* se entiende la entrada de un producto químico líquido o sólido directamente por la boca o la nariz, o indirectamente por regurgitación, en la tráquea o en las vías respiratorias inferiores.

3.10.1.3 La toxicidad por aspiración puede entrañar graves efectos agudos tales como neumonía química, lesiones pulmonares más o menos importantes e incluso la muerte después de la aspiración.

3.10.1.4 La aspiración comienza con, y dura todo el tiempo de, la inspiración durante la cual el producto de que se trata se ubica en la conjunción de las vías respiratorias superiores y del tubo digestivo en la región laringofaríngea.

3.10.1.5 La aspiración de una sustancia o mezcla puede producirse por regurgitación después de la ingestión. Esto puede tener consecuencias para el etiquetado, en particular cuando, en casos de toxicidad aguda, se considera la posibilidad de recomendar que se provoque el vómito en caso de ingestión. Si la sustancia o mezcla presenta además un peligro de toxicidad por aspiración, la recomendación de que se provoque el vómito deberá modificarse.

#### 3.10.1.6 Consideraciones particulares

3.10.1.6.1 El estudio de la documentación médica sobre la aspiración de sustancias químicas muestra que ciertos hidrocarburos (destilados del petróleo) y ciertos hidrocarburos clorados presentan un peligro de aspiración para el ser humano. El peligro por aspiración de alcoholes primarios y cetonas, sólo se ha manifestado en los estudios realizados con animales.

3.10.1.6.2 Si bien se ha seguido una metodología para determinar los peligros por aspiración en los animales, ésta no se ha normalizado. Los resultados positivos obtenidos a partir de experimentación animal pueden ser tomados únicamente como una indicación acerca de la eventual toxicidad por aspiración en el ser humano. Los datos sobre peligro por aspiración sobre animales deberán evaluarse con especial cuidado.

3.10.1.6.3 Los criterios de clasificación se basan en la viscosidad cinemática. La fórmula siguiente expresa la relación entre la viscosidad dinámica y la cinemática:

$$\frac{\text{Viscosidad dinámica (mPa} \cdot \text{s)}}{\text{Densidad (g/cm}^3\text{)}} = \text{Viscosidad cinemática (mm}^2\text{/s)}$$

3.10.1.6.4 Aunque la definición de aspiración que figura en 3.10.1.2 incluye la entrada de sólidos en el sistema respiratorio, la clasificación con arreglo al apartado b) en la tabla 3.10.1 para la Categoría 1 o la Categoría 2 se aplica a sustancias y mezclas líquidas únicamente.

#### 3.10.1.6.5 Clasificación de productos en forma de aerosoles y nieblas

Los productos aplicados en forma de aerosoles y nieblas se distribuyen generalmente en recipientes a presión tales como los atomizadores o vaporizadores que funcionan apretando o aflojando un mando. La clave para clasificar esos productos está en determinar si se forma una masa líquida en la boca del recipiente que pueda ser aspirada. Si las gotas de las nieblas o del aerosol que salen del recipiente a presión son pequeñas, no debería formarse una masa líquida. En cambio, si un recipiente a presión dispensa un producto en forma de chorro, puede formarse una masa líquida que puede ser aspirada. Por lo general, las nieblas producidas por los vaporizadores que funcionan apretando o aflojando un mando están formadas por

grandes gotas, con la posibilidad, por tanto, de que se forme una masa líquida y exista aspiración. Cuando el dispositivo de bombeo del recipiente puede desmontarse y existe la posibilidad de que se pueda ingerir su contenido, deberá considerarse la clasificación del mismo.

### 3.10.2 Criterios de clasificación para las sustancias

**Tabla 3.10.1: Categorías de peligro para la toxicidad por aspiración**

Categorías	Criterios
<b>Categoría 1:</b> Productos químicos de los que se sabe que presentan peligro de toxicidad por aspiración en el ser humano o que deben considerarse como si indujeran peligro de toxicidad por aspiración en el ser humano.	Una sustancia se clasificará en la Categoría 1: a) Cuando existan datos viables y de calidad sobre el ser humano (véase nota 1); o b) si se trata de un hidrocarburo, cuando su viscosidad cinemática, medida a 40° C, sea $\leq 20,5 \text{ mm}^2/\text{s}$ .
<b>Categoría 2:</b> Productos químicos que son motivo de preocupación por la posibilidad de que puedan ser tóxicos por aspiración para el ser humano.	Se clasificarán en la Categoría 2, guiándose por los resultados de los estudios efectuados con animales y las opiniones de expertos y habida cuenta de la tensión superficial, la solubilidad en el agua, el punto de ebullición y la volatilidad, aquellas sustancias no incluidas en la Categoría 1, cuya viscosidad cinemática, medida a 40° C, sea $\leq 14 \text{ mm}^2/\text{s}$ (véase nota 2)

**NOTA 1:** Ejemplos de sustancias clasificadas en la Categoría 1: ciertos hidrocarburos, trementina y aceite de pino.

**NOTA 2:** En esas condiciones, ciertas autoridades podrán incluir en esta Categoría: los alcoholes *n*-primarios que tienen entre 3 y 13 átomos de carbono; el alcohol isobutílico y las cetonas con un máximo de 13 átomos de carbono.

### 3.10.3 Criterios de clasificación para las mezclas

#### 3.10.3.1 Clasificación de mezclas cuando se dispone de datos sobre las mismas

Una mezcla se clasificará en la Categoría 1 cuando se disponga de datos fiables y de buena calidad obtenidos en el ser humano.

#### 3.10.3.2 Clasificación de mezclas cuando no se dispone de datos sobre las mismas: principios de extrapolación

3.10.3.2.1 Cuando no se hayan realizado ensayos sobre la mezcla como tal para determinar su toxicidad por aspiración, pero se disponga de datos suficientes tanto sobre sus componentes individuales como sobre mezclas similares sometidas a ensayo para caracterizar adecuadamente sus peligros, esos datos se utilizarán de acuerdo con los principios de extrapolación descritos a continuación. De esta manera se asegura la utilización del mayor número de datos disponibles durante el proceso de clasificación con el fin de caracterizar los peligros de la mezcla sin necesidad de efectuar ensayos adicionales en animales.

##### 3.10.3.2.2 Dilución

Si una mezcla sometida a ensayo se diluye con un diluyente que no presenta toxicidad por aspiración y del que no se espera que influya en la toxicidad de los demás componentes de la mezcla, la nueva mezcla diluida podrá clasificarse como equivalente a la mezcla original sometida a ensayo. No obstante, la concentración de los componentes tóxicos por aspiración no deberá ser inferior al 10%.

#### 3.10.3.2.3 *Variación entre lotes*

La toxicidad por aspiración de un lote sometido a ensayo de una mezcla se considerará sustancialmente equivalente a la de otro lote no sometido a ensayo del mismo producto comercial que haya sido obtenido por el mismo fabricante o bajo su control, a menos que haya motivos para creer que, de acuerdo con los valores de viscosidad o de concentración, se han producido cambios que pueden provocar modificaciones en los valores de toxicidad por aspiración del lote no sometido a ensayo. Cuando esto ocurra será necesaria una nueva clasificación.

#### 3.10.3.2.4 *Concentración de mezclas pertenecientes a la Categoría 1*

En una mezcla de Categoría 1 sometida a ensayo, si aumenta la concentración de un componente tóxico, la mezcla no sometida a ensayo resultante se clasificará en el Categoría 1 sin que sea necesario efectuar ensayos adicionales.

#### 3.10.3.2.5 *Interpolación dentro de una misma categoría de toxicidad*

En el caso de tres mezclas (A, B y C) con componentes idénticos, en que las mezclas A y B hayan sido sometidas a ensayo y clasificadas en la misma categoría de toxicidad y la mezcla C no sometida a ensayo tenga los mismos componentes toxicológicamente activos que las mezclas A y B pero concentraciones de esos componentes intermedias entre las de las mezclas A y B, se considerará que la mezcla C pertenece a la misma categoría de toxicidad que A y B.

#### 3.10.3.2.6 *Mezclas esencialmente similares*

Cuando se tenga lo siguiente:

- a) Dos mezclas: i) A+B;  
ii) C+B;
- b) La concentración del componente B sea la misma en ambas mezclas;
- c) La concentración del componente A en la mezcla i) es prácticamente igual a la del componente C en el mezcla ii);
- d) Se dispone de datos, esencialmente equivalentes, sobre la toxicidad de A y C, es decir, ambos pertenecen a la misma categoría de peligro y no se espera que afecten a la toxicidad de B.

Si la mezcla i) o ii) está ya clasificada sobre la base de los criterios de la tabla 3.10.1, entonces la otra mezcla podrá clasificarse en la misma categoría de peligro.

### 3.10.3.3 *Clasificación de una mezcla cuando se dispone de datos para todos los componentes o sólo para algunos*

#### 3.10.3.3.1 *Categoría 1*

3.10.3.3.1.1 Se clasificará en la Categoría 1 toda mezcla que contenga en total  $\geq 10\%$  de uno o varios componentes clasificados en dicha categoría y cuya viscosidad cinemática, medida a 40° C, sea  $\leq 20,5 \text{ mm}^2/\text{s}$ .

3.10.3.3.1.2 Se clasificará en la Categoría 1 toda mezcla que se separe en dos o más capas distintas, en las que una contenga  $\geq 10\%$  de uno o varios componentes clasificados en dicha categoría y cuya viscosidad cinemática, medida a 40° C, sea  $\leq 20,5 \text{ mm}^2/\text{s}$ .

### 3.10.3.3.2 *Categoría 2*

3.10.3.3.2.1 Se clasificará en la Categoría 2 toda mezcla que contenga en total  $\geq 10\%$  de uno o varios componentes clasificados en dicha categoría y cuya viscosidad cinemática, medida a 40° C, sea  $\leq 14 \text{ mm}^2/\text{s}$ .

3.10.3.3.2.2 La clasificación de mezclas en esta categoría requerirá la opinión de expertos, habida cuenta de la tensión superficial, la solubilidad en el agua, el punto de ebullición y la volatilidad, en particular cuando sustancias de la Categoría 2 estén mezcladas con agua.

3.10.3.3.2.3 Se clasificará en la Categoría 2 toda mezcla que se separe en dos o más capas distintas, en las que una contenga  $\geq 10\%$  de uno o varios componentes clasificados en la Categoría 2 y cuya viscosidad cinemática, medida a 40°C, sea  $\leq 14 \text{ mm}^2/\text{s}$ .

## 3.10.4 **Comunicación de peligro**

3.10.4.1 En el capítulo 4.1 (Comunicación de peligros: Etiquetado) figuran consideraciones generales y específicas sobre los requisitos de las etiquetas. El anexo 2 contiene tablas resumen sobre clasificación y etiquetado. El anexo 3 contiene ejemplos de consejos de prudencia y pictogramas de precaución que pueden utilizarse con la aprobación de la autoridad competente. La tabla 3.10.2 presenta los elementos que deben figurar en las etiquetas de las sustancias y mezclas clasificadas, en razón de su peligro de toxicidad por aspiración, en las Categorías 1 y 2 con arreglo a los criterios indicados en el presente capítulo.

**Tabla 3.10.2: Elementos que deben figurar en las etiquetas para la toxicidad por aspiración**

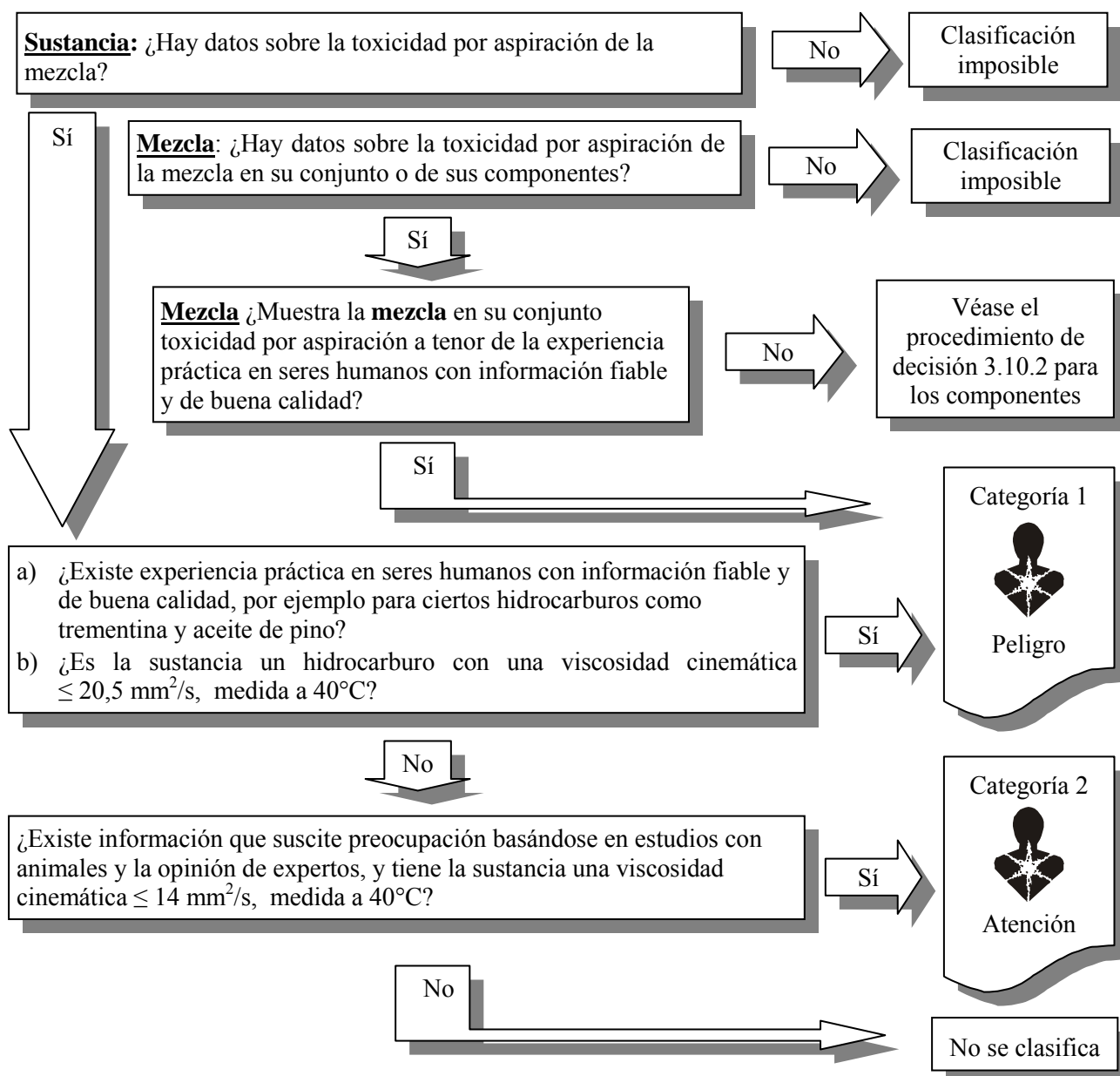
	<b>Categoría 1</b>	<b>Categoría 2</b>
<b>Símbolo</b>	Peligro para la salud	Peligro para la salud
<b>Palabra de advertencia</b>	Peligro	Atención
<b>Indicación de peligro</b>	Puede ser mortal en caso de ingestión y de penetración en las vías respiratorias	Puede ser nocivo en caso de ingestión y de penetración en las vías respiratorias

## 3.10.5 **Procedimiento de decisión para la toxicidad por aspiración**

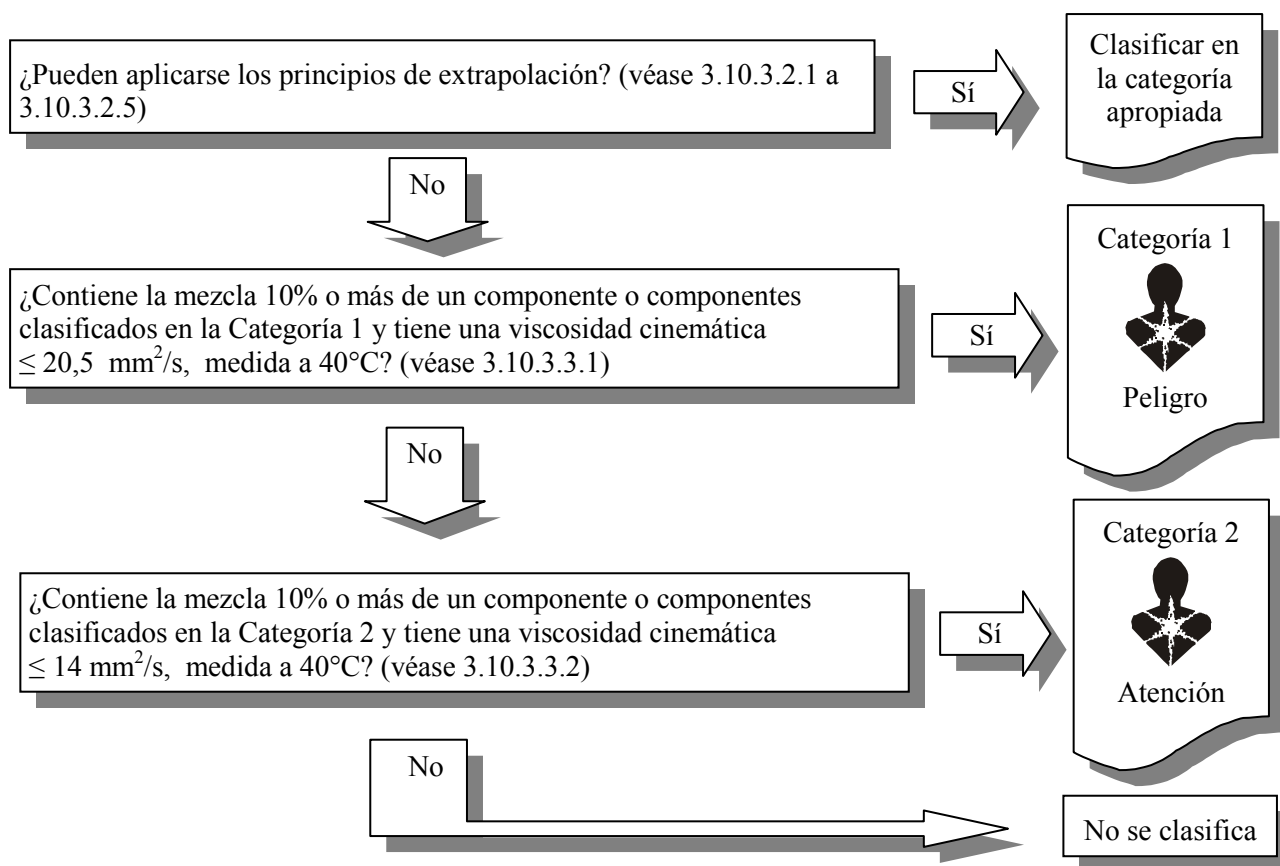
Los procedimientos de decisión siguientes no forman parte del sistema de clasificación armonizado, pero figuran aquí como orientación adicional. Se recomienda encarecidamente que la persona que se encargue de la clasificación estudie los criterios de clasificación antes y durante la aplicación de estos procedimientos de decisión.



### 3.10.5.1 Procedimiento de decisión 3.10.1



### 3.10.5.2 Procedimiento de decisión 3.10.2



# **PARTE 4**

## **PELIGROS PARA EL MEDIO AMBIENTE**



## CAPÍTULO 4.1

### PELIGROS PARA EL MEDIO AMBIENTE ACUÁTICO

#### 4.1.1 Definiciones y consideraciones generales

##### 4.1.1.1 Definiciones

*Bioacumulación* es el resultado neto de la absorción, transformación y eliminación de una sustancia por un organismo a través de todas las vías de exposición (es decir, aire, agua, sedimento/suelo y alimentación).

*Bioconcentración* es el resultado neto de la absorción, transformación y eliminación de una sustancia por un organismo debida a la exposición a través del agua.

*Biodisponibilidad* (o disponibilidad biológica) indica en qué medida una sustancia es absorbida por un organismo y distribuida en una zona del mismo. Depende de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia, de la anatomía y la fisiología del organismo, de la farmacocinética y de la vía de exposición. La disponibilidad no es un requisito previo de la biodisponibilidad.

$CE_x$  es la concentración que causa el x% de la respuesta.

*CSEO (Concentración sin efectos observados)* es la concentración de ensayo inmediatamente inferior a la concentración más baja que produce efectos adversos estadísticamente significativos en un ensayo. La CSEO no tiene efectos adversos estadísticamente significativos en comparación con el testigo.

*Degradación* es la descomposición de moléculas orgánicas en moléculas más pequeñas y finalmente en dióxido de carbono, agua y sales.

*Disponibilidad* de una sustancia indica en qué medida esa sustancia se convierte en una especie soluble o desagregada. Para los metales indica en qué medida la parte de iones metálicos de un compuesto metálico ( $M^0$ ) puede separarse del resto del compuesto (molécula).

*Peligro agudo (a corto plazo)* es, para fines de clasificación, el peligro que presenta un producto químico por su toxicidad aguda para un organismo tras una breve exposición a ese producto químico en el medio acuático.

*Peligro a largo plazo* es, para fines de clasificación, el peligro que presenta un producto químico por su toxicidad crónica para un organismo tras una exposición de larga duración a ese producto químico en el medio acuático

*Sustancias complejas* o *sustancias "multi-componentes"* son mezclas que comprenden una combinación compleja de sustancias individuales con solubilidades y propiedades fisicoquímicas diferentes. En casi todos los casos, pueden caracterizarse como una serie homóloga de sustancias con un determinado rango de longitud en la cadena carbonada /número de sustituyentes o grados de sustitución.

*Toxicidad acuática aguda* es la propiedad intrínseca de una sustancia de provocar efectos nocivos en los organismos acuáticos tras una breve exposición a esa sustancia en el medio acuático.

*Toxicidad acuática crónica* es la propiedad intrínseca de una sustancia de provocar efectos nocivos en los organismos acuáticos durante exposiciones en el medio acuático determinadas en relación con el ciclo de vida del organismo.

#### **4.1.1.2 Elementos básicos**

4.1.1.2.1 Los elementos básicos para la clasificación en el sistema armonizado son:

- a) toxicidad acuática aguda;
- b) toxicidad acuática crónica;
- c) potencial de bioacumulación o bioacumulación real; y
- d) degradación (biótica o abiótica) en el caso de productos químicos orgánicos;

4.1.1.2.2 Si bien son preferibles los datos obtenidos con métodos de ensayo internacionalmente armonizados, en la práctica se puede recurrir a resultados obtenidos con ensayos reconocidos en el plano nacional, siempre que sean considerados equivalentes. Por lo general, existe consenso en que los datos de toxicidad de especies marinas y de agua dulce pueden considerarse equivalentes y han de obtenerse preferentemente aplicando las Directrices de ensayo de la OCDE, u otras equivalentes, conforme a los principios de las buenas prácticas de laboratorio (BPL). Cuando no se disponga de esos datos, la clasificación se basará en los mejores datos disponibles.

#### **4.1.1.3 Toxicidad acuática aguda**

La toxicidad acuática aguda se determinará normalmente a partir de los datos de la  $CL_{50}$  en peces tras una exposición de 96 horas (Directriz de ensayo 203 de la OCDE o equivalente), de la  $CE_{50}$  en crustáceos tras una exposición de 48 horas (Directriz de ensayo 202 de la OCDE, o equivalente) y/o de la  $CE_{50}$  en algas tras una exposición de 72 o 96 horas (Directriz de ensayo 201 de la OCDE o equivalente). Estas especies se consideran representativas de todos los organismos acuáticos. También podrán considerarse datos de otras especies tales como *Lemna sp.* si la metodología de los ensayos es adecuada.

#### **4.1.1.4 Toxicidad acuática crónica**

Se dispone de menos datos sobre toxicidad crónica que sobre toxicidad aguda y los procedimientos de ensayo están menos normalizados. Podrán aceptarse los datos obtenidos de conformidad con las Directrices de ensayo 210 (Fases tempranas de la vida del pez), 211 (Reproducción de la *Dafnia*) o 201 (Inhibición del crecimiento de las algas) de la OCDE (véase A9.3.3.2 en el Anexo 9). También se pueden emplear otros ensayos validados y aceptados internacionalmente. Deberán utilizarse las concentraciones sin efectos observados (CSEO) u otras  $CE_x$  equivalentes.

#### **4.1.1.5 Potencial de bioacumulación**

El potencial de bioacumulación se determinará normalmente utilizando el coeficiente de reparto octanol/agua expresado como  $\log K_{ow}$ , establecido con arreglo a las Directrices de ensayo 107 o 117 de la OCDE. Aunque el potencial de bioacumulación puede determinarse a partir de este coeficiente de reparto, el cálculo del mismo mediante el factor de bioconcentración (FBC) proporciona mejores resultados, por lo que deberá usarse preferentemente siempre que sea posible. El FBC se determinará de conformidad con la Directriz de ensayo 305 de la OCDE.

#### **4.1.1.6 Degradabilidad rápida**

4.1.1.6.1 La degradación medioambiental puede ser biótica o abiótica (como, por ejemplo, la hidrólisis) y los criterios utilizados reflejan ese hecho (véase 4.1.2.11.3). Los ensayos de biodegradabilidad (A a F) de la Directriz de ensayo 301 de la OCDE constituyen el método más sencillo para determinar la rapidez de biodegradación. Un resultado positivo en dichos ensayos puede considerarse como indicador de la facilidad de las sustancias para biodegradarse en casi todos los medios. Tales ensayos se refieren a aguas dulces y por lo tanto también se deben tener en cuenta los resultados obtenidos a partir de la Directriz de ensayo 306 de la OCDE que son más adecuados para el medio marino. Cuando no se disponga de esos datos, el cociente  $DBO_5$  (5 días)/DQO  $\geq 0,5$  se considerará como indicador de una degradación rápida.

4.1.1.6.2 En la definición de degradabilidad rápida, pueden tenerse en cuenta la degradación abiótica (por ejemplo, la hidrólisis), la degradación primaria tanto biótica como abiótica, la degradación en medios no acuáticos y la degradación rápida en el medio ambiente. En el Anexo 9 (Documento Guía) figuran indicaciones especiales acerca de la interpretación de estos datos.

#### **4.1.1.7 Otras consideraciones**

4.1.1.7.1 El sistema armonizado para clasificar las sustancias por los peligros que presentan para el medio acuático está basado en los sistemas existentes que se indican en 4.1.1.7.3. El medio ambiente acuático puede considerarse, por una parte, en base a los organismos acuáticos que viven en el agua, y por otra parte, en base al ecosistema acuático del que forman parte. En este sentido, la propuesta no comprende los contaminantes acuáticos en los que puede ser necesario considerar efectos más allá del medio ambiente acuático, como los efectos sobre la salud humana. Por esta razón, la base de la identificación del peligro es la toxicidad acuática de la sustancia, aunque esto puede modificarse con más información sobre el potencial de degradación y bioacumulación.

4.1.1.7.2 Si bien el sistema pretende aplicarse a todas las sustancias y mezclas, se reconoce que para algunas de ellas, por ejemplo los metales, las sustancias poco solubles, etc., serán necesarias indicaciones especiales. Se han preparado dos documentos guía (véanse los Anexos 9 y 10) para abarcar cuestiones tales como la interpretación de los datos y la aplicación de los criterios que se definen más abajo para esos grupos de sustancias. Habida cuenta de la complejidad de este efecto tóxico y del campo de aplicación tan amplio del sistema, esos documentos guía se consideran un elemento importante del funcionamiento del sistema armonizado.

4.1.1.7.3 Se han examinado los sistemas de clasificación actualmente vigentes, incluido el sistema de suministro y uso de la UE, el procedimiento revisado de evaluación de peligros de GESAMP, el Sistema de la OMI sobre los contaminantes marinos, el Acuerdo Europeo sobre el Transporte de mercancías peligrosas por Carretera y Ferrocarril (ADR/RID), los sistemas de Canadá y los Estados Unidos sobre plaguicidas, y el sistema de éste último país sobre transporte terrestre. El sistema armonizado se considera adecuado para ser aplicado a las mercancías embaladas/envasadas y también a su distribución, utilización y transporte multimodal, y los elementos del mismo pueden usarse en el transporte a granel tanto terrestre como marítimo conforme al Anexo II del Convenio MARPOL 73/78 en las disposiciones relativas a la toxicidad acuática.

#### **4.1.2 Criterios de clasificación para las sustancias**

4.1.2.1 Mientras que el sistema de clasificación armonizado consta de tres categorías de toxicidad aguda y cuatro de toxicidad crónica, la parte central del sistema de clasificación armonizado de las sustancias consta de tres categorías de toxicidad aguda y tres de toxicidad crónica (véase la tabla 4.1.1 a) y b)). La clasificación en las categorías de toxicidad aguda y crónica se hace por separado. Los criterios para clasificar una sustancia en las categorías Aguda 1 a 3 están definidos sólo sobre la base de los datos que se refieren a la toxicidad aguda (CE<sub>50</sub> o CL<sub>50</sub>). Los criterios para clasificar una sustancia en las categorías Crónica 1 a 3 siguen un enfoque secuencial, en que el primer paso es ver si la información disponible sobre la toxicidad crónica justifica una clasificación en la clase de peligro a largo plazo. Si no se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica, el paso siguiente es combinar dos tipos de información, a saber, datos de toxicidad aguda y datos acerca del comportamiento o destino de la sustancia en el medio ambiente (datos sobre degradabilidad y bioacumulación) (véase la figura 4.1.1).

4.1.2.2 El sistema introduce también una clasificación de tipo “red de seguridad” (Categoría: Crónica 4) para que se use cuando los datos disponibles no permitan una clasificación con los criterios establecidos, pero susciten, sin embargo, alguna preocupación. Los criterios concretos no están definidos, con una excepción: las sustancias poco solubles en agua para las que no se haya demostrado ninguna toxicidad podrán clasificarse si no se degradan rápidamente y poseen un potencial de bioacumulación. Se considera que para esas sustancias poco solubles, la toxicidad puede no haberse evaluado adecuadamente en un ensayo de corta duración debido a unos niveles de exposición bajos y de una absorción potencialmente lenta por el organismo. La necesidad de esa clasificación puede refutarse si se demuestra que la sustancia no necesita ser clasificada en función de los peligros a largo plazo para el medio ambiente acuático.

4.1.2.3 Las sustancias con efectos tóxicos agudos a concentraciones muy inferiores a 1 mg/l, o con efectos tóxicos crónicos muy inferiores a 0,1 mg/l (si no son rápidamente degradables) y a 0,01 mg/l (si son rápidamente degradables), contribuyen como componentes de una mezcla a la toxicidad de la mezcla incluso a concentraciones bajas, y se les debe asignar un mayor peso en el método sumatorio (véanse la nota 2 de la tabla 4.1.1 y el párrafo 4.1.3.5.5.5).

4.1.2.4 Las sustancias clasificadas con los siguientes criterios (Tabla 4.1.1) se considerarán como peligrosas para el medio ambiente acuático. Estos criterios describen en detalle las categorías de clasificación. Se resumen en forma de diagrama en la Tabla 4.1.2.

**Tabla 4.1.1: Categorías para las sustancias peligrosas para el medio ambiente acuático (Nota 1)**

**a) Peligro agudo (a corto plazo) para el medio ambiente acuático**

**Categoría Aguda 1: (Nota 2)**

CL <sub>50</sub> 96h (para peces)	≤ 1 mg/l y/o
CE <sub>50</sub> 48 h (para crustáceos)	≤ 1 mg/l y/o
CEr <sub>50</sub> 72 o 96 h (para algas u otras plantas acuáticas)	≤ 1 mg/l (Nota 3)

La categoría Aguda 1 puede subdividirse en algunos sistemas reguladores para incluir un rango inferior con una C(E)L<sub>50</sub> ≤ 0,1 mg/l

**Categoría Aguda 2:**

CL <sub>50</sub> 96h (para peces)	> 1 pero ≤ 10 mg/l y/o
CE <sub>50</sub> 48 h (para crustáceos)	> 1 pero ≤ 10 mg/l y/o
CEr <sub>50</sub> 72 o 96 h (para algas u otras plantas acuáticas)	> 1 pero ≤ 10 mg/l (Nota 3)

**Categoría Aguda 3:**

CL <sub>50</sub> 96h (para peces)	> 10 pero ≤ 100 mg/l y/o
CE <sub>50</sub> 48 h (para crustáceos)	> 10 pero ≤ 100 mg/l y/o
CEr <sub>50</sub> 72 o 96 h (para algas u otras plantas acuáticas)	> 10 pero ≤ 100 mg/l (Nota 3)

Algunos sistemas reguladores pueden ampliar este rango más allá de una C(E)L<sub>50</sub> de 100 mg/l introduciendo otra categoría

**b) Peligro a largo plazo para el medio ambiente acuático (véase también la figura 4.1.1)**

**i) Sustancias no rápidamente degradables (Nota 4) para las que se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica**

**Categoría Crónica 1 : (Nota 2)**

CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para peces)	≤ 0,1 mg/l y/o
CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para crustáceos)	≤ 0,1 mg/l y/o
CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para algas u otras plantas acuáticas)	≤ 0,1 mg/l

**Categoría Crónica 2 :**

CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para peces)	≤ 1 mg/l y/o
CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para crustáceos)	≤ 1 mg/l y/o
CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para algas u otras plantas acuáticas)	≤ 1 mg/l

**ii) Sustancias rápidamente degradables para las que se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica**

**Categoría Crónica 1 : (Nota 2)**

CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para peces)	≤ 0,01 mg/l y/o
CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para crustáceos)	≤ 0,01 mg/l y/o
CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para algas u otras plantas acuáticas)	≤ 0,01 mg/l

**Categoría Crónica 2 :**

CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para peces)	≤ 0,1 mg/l y/o
CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para crustáceos)	≤ 0,1 mg/l y/o
CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para algas u otras plantas acuáticas)	≤ 0,1 mg/l

**Categoría Crónica 3 :**

CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para peces)	≤ 1 mg/l y/o
CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para crustáceos)	≤ 1 mg/l y/o
CSEO o CE <sub>x</sub> crónicas (para algas u otras plantas acuáticas)	≤ 1 mg/l

(Continúa en la página siguiente)



**Tabla 4.1.1: Categorías para las sustancias peligrosas para el medio ambiente acuático (Nota 1) (Cont.)****b) Peligro a largo plazo para el medio ambiente acuático (véase también la figura 4.1.1) (cont.)****iii) Sustancias para las que no se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica****Categoría Crónica 1 : (Nota 2)**

CL <sub>50</sub> 96 h (para peces)	≤ 1 mg/l y/o
CE <sub>50</sub> 48 h (para crustáceos)	≤ 1 mg/l y/o
CER <sub>50</sub> 72 ó 96 h (para algas u otras plantas acuáticas)	≤ 1 mg/l (Nota 3)
y la sustancia no es rápidamente degradable y/o el FBC determinado experimentalmente es ≥ 500 (o, en su defecto el log K <sub>ow</sub> ≥ 4) (Notas 4 y 5)	

**Categoría Crónica 2 :**

CL <sub>50</sub> 96 h (para peces)	> 1 pero ≤ 10 mg/l y/o
CE <sub>50</sub> 48 h (para crustáceos)	> 1 pero ≤ 10 mg/l y/o
CER <sub>50</sub> 72 ó 96 h (para algas u otras plantas acuáticas)	> 1 pero ≤ 10 mg/l (Nota 3)
y la sustancia no es rápidamente degradable y/o el FBC determinado experimentalmente es ≥ 500 (o, en su defecto el log K <sub>ow</sub> ≥ 4) (Notas 4 y 5)	

**Categoría Crónica 3 :**

CL <sub>50</sub> 96 h (para peces)	> 10 pero ≤ 100 mg/l y/o
CE <sub>50</sub> 48 h (para crustáceos)	> 10 pero ≤ 100 mg/l y/o
CER <sub>50</sub> 72 ó 96 h (para algas u otras plantas acuáticas)	> 10 pero ≤ 100 mg/l (Nota 3)
y la sustancia no es rápidamente degradable y/o el FBC determinado experimentalmente es ≥ 500 (o, en su defecto el log K <sub>ow</sub> ≥ 4) (Notas 4 y 5).	

**c) Clasificación de tipo "red de seguridad"****Categoría Crónica 4 :**

Las sustancias poco solubles para las que no se haya registrado toxicidad aguda en concentraciones inferiores o iguales a su solubilidad en agua y que no se degraden rápidamente y tengan un log K<sub>ow</sub> ≥ 4, lo que indica un potencial de bioacumulación, se clasificarán en esta categoría, a menos que la información científica demuestre que la clasificación no es necesaria. Esa información podría ser un FBC determinado experimentalmente < 500, o unas CSEO de toxicidad crónica > 1 mg/l, o datos que indiquen una degradación rápida en el medio ambiente.

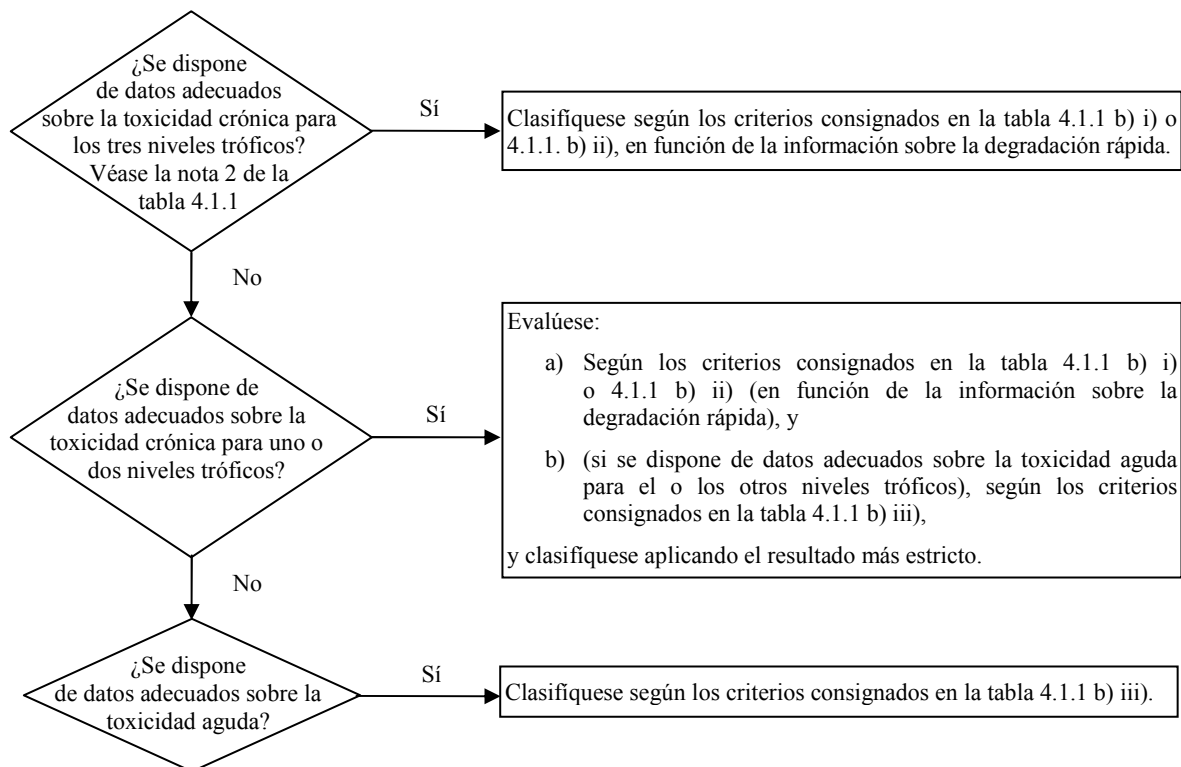
**NOTA 1:** Los organismos que se someten a ensayos normalizados, a saber, peces, crustáceos y algas, son especies representativas que abarcan toda una gama de niveles tróficos y taxones. No obstante, también pueden considerarse datos de otros organismos, siempre que representen a una especie y correspondan a efectos experimentales equivalentes.

**NOTA 2:** Cuando se clasifican sustancias en las categorías Aguda 1 y/o Crónica 1, es necesario indicar al mismo tiempo el factor M adecuado (véase 4.1.3.5.5.5) para aplicar el método sumatorio.

**NOTA 3:** Cuando la toxicidad para las algas CER<sub>50</sub> [= CE<sub>50</sub> (tasa de crecimiento)] sea más de 100 veces inferior a la de la especie de sensibilidad más próxima y se haga una clasificación basada únicamente en ese efecto, convendrá verificar si esa toxicidad es representativa de la toxicidad para plantas acuáticas. Si se ha demostrado que esto no ocurre, deberá recabarse la opinión de los expertos para decidir si se clasifica o no la sustancia. La clasificación debería basarse en la CER<sub>50</sub>. Cuando las condiciones de determinación de la CE<sub>50</sub> no se especifiquen y no se haya registrado ninguna CER<sub>50</sub>, la clasificación deberá basarse en la CE<sub>50</sub> más baja disponible.

**NOTA 4:** La ausencia de degradabilidad rápida se basa en que no se produce una biodegradabilidad fácil o en otra prueba de ausencia de degradación rápida. Cuando no se disponga de datos útiles sobre la degradabilidad, ya sean datos determinados experimentalmente o estimaciones, se considerará que la sustancia no es rápidamente degradable.

**NOTA 5:** Potencial de bioacumulación basado en un FBC ≥ 500 obtenido experimentalmente o, en su defecto, un log K<sub>ow</sub> ≥ 4 con la condición de que este indicador sea un descriptor apropiado del potencial de bioacumulación de la sustancia. Los valores medidos de log K<sub>ow</sub> prevalecen sobre los valores estimados, y los valores medidos del FBC lo hacen sobre los valores de log K<sub>ow</sub>.

**Figura 4.1.1: Categorías para las sustancias peligrosas a largo plazo para el medio ambiente acuático**

4.1.2.5 El sistema de clasificación reconoce que el peligro intrínseco principal para organismos acuáticos está representado por la toxicidad tanto aguda como crónica de una sustancia, cuya importancia relativa estará determinada por el sistema regulatorio específico vigente. Se puede hacer una distinción entre el peligro a corto plazo y el peligro a largo plazo y, por tanto, definir categorías separadas de peligro para ambas propiedades que representen una graduación del nivel de peligro identificado. Normalmente se usará el valor más bajo de toxicidad disponible entre los diferentes niveles tróficos (peces, crustáceos y algas) y dentro de cada uno de ellos para definir la categoría o las categorías de peligro apropiadas. Sin embargo, puede haber circunstancias en que se recurra a ponderar la evidencia disponible. Los datos sobre toxicidad aguda son los más fáciles de obtener y los ensayos utilizados los más normalizados.

4.1.2.6 La toxicidad aguda constituye una propiedad esencial para definir el peligro cuando el transporte de grandes cantidades de una sustancia puede suscitar peligros a corto plazo por causa de accidentes o grandes vertidos. Así, se definen categorías de peligro con valores de  $C(E)L_{50}$  de hasta 100 mg/l, aunque en ciertas disposiciones reglamentarias se usan categorías de hasta 1000 mg/l. La Categoría Aguda 1 puede subdividirse para incluir una categoría adicional de  $C(E)L \leq 0,1$  mg/l en ciertos sistemas regulatorios tales como los definidos en el Anexo II del Convenio MARPOL 73/78. Se prevé que su uso se limitará a los sistemas que regulan el transporte a granel.

4.1.2.7 Para sustancias embaladas/envasadas se considera que el peligro principal viene definido por la toxicidad crónica, aunque sustancias con una toxicidad aguda a niveles de  $C(E)L_{50} \leq 1$  mg/l también se consideran peligrosas. Es posible encontrar sustancias con concentraciones de hasta 1 mg/l en el medio ambiente acuático como consecuencia de un uso y desechos normales. En niveles de toxicidad superiores a este, se considera que la toxicidad aguda no describe por sí sola el peligro principal que resulta de bajas concentraciones que provocan efectos a más largo plazo. Por lo tanto, se definen diversas categorías de peligro que se basan en niveles de toxicidad acuática crónica. Sin embargo, para muchas sustancias no se tienen datos sobre su toxicidad crónica, y en esos casos será necesario usar los datos disponibles sobre toxicidad aguda para estimar esta propiedad. Las propiedades intrínsecas de ausencia de degradabilidad rápida y/o potencial de bioconcentración, en combinación con la toxicidad aguda, pueden usarse para clasificar una sustancia en una categoría de peligro a largo plazo. Cuando los datos de toxicidad crónica muestren una CSEO superior a la solubilidad en agua o superior a 1 mg/l, la clasificación en una de las categorías de peligro a largo plazo, Crónica 1 a 3, no sería necesaria. Igualmente, para sustancias con una

$C(E)L_{50} > 100$  mg/l, casi todos los sistemas regulatorios consideran esa toxicidad insuficiente para justificar una clasificación.

4.1.2.8 Se tienen presentes los objetivos de clasificación que figuran en el Anexo II del Convenio MARPOL 73/78, que se refieren al transporte de mercancías a granel en buques tanque, con el propósito de regular los vertidos en descargas operacionales y en la designación de los tipos de buque adecuados. Esos objetivos no se limitan únicamente a proteger los ecosistemas acuáticos, aunque esto esté claramente incluido. De este modo, se pueden usar categorías adicionales de peligro que tengan en cuenta factores tales como las propiedades fisicoquímicas y la toxicidad para los mamíferos.

#### **4.1.2.9 Toxicidad acuática**

4.1.2.9.1 Los organismos que se someten a ensayos normalizados, a saber, peces, crustáceos y algas, son especies representativas que abarcan toda una gama de niveles tróficos y taxones. No obstante, también pueden considerarse datos de otros organismos, siempre que representen a una especie y correspondan a efectos experimentales equivalentes. El ensayo de inhibición de crecimiento de las algas es un ensayo crónico pero la  $CE_{50}$  se considera un valor agudo para los propósitos de la clasificación. Esa  $CE_{50}$  debería normalmente basarse en la inhibición de la tasa de crecimiento. Cuando la  $CE_{50}$  disponible se base sólo en la reducción de la biomasa o no se indique a qué parámetro se refiere, ese valor podrá utilizarse igual.

4.1.2.9.2 Los ensayos de toxicidad acuática entrañan, por su propia naturaleza, la disolución de la sustancia ensayada en el medio acuático examinado y el mantenimiento de una concentración de exposición biodisponible y estable durante todo el ensayo. Algunas sustancias son difíciles de someter a ensayo con procedimientos normalizados, por lo que se desarrollarán indicaciones especiales sobre interpretación de datos para esas sustancias y sobre cómo se usarán los mismos al aplicar los criterios de clasificación.

#### **4.1.2.10 Bioacumulación**

La bioacumulación de sustancias en organismos acuáticos puede entrañar efectos tóxicos a largo plazo incluso cuando la concentración de esas sustancias en el agua sea baja. El potencial de bioacumulación viene determinado por el reparto de la sustancia ensayada entre el n-octanol y el agua. La relación entre el coeficiente de reparto de una sustancia orgánica y su bioconcentración tal como se mide por el FBC en los peces ha quedado confirmada en muchas publicaciones científicas. Para identificar sólo aquellas sustancias con un potencial real de bioconcentración se usa un valor de corte de  $\log K_{ow} \geq 4$ . Al reconocerse que este indicador es únicamente un sustituto imperfecto del FBC, el valor cuantificado de éste prevalecerá siempre. Un FBC en peces  $< 500$  se considera indicativo de un nivel bajo de bioconcentración. Puede observarse cierta relación entre la toxicidad crónica y el potencial de bioacumulación, ya que la toxicidad se relaciona con la carga corporal.

#### **4.1.2.11 Degradabilidad rápida**

4.1.2.11.1 Las sustancias que se degradan rápidamente se eliminan también con rapidez del medio ambiente. Si bien pueden producir efectos, sobre todo en el caso de un vertido o de un accidente, estos estarán localizados y durarán poco. La ausencia de una degradación rápida en el medio ambiente puede significar que una sustancia en el agua es susceptible de ejercer una acción tóxica a gran escala en el tiempo y el espacio. Un modo de demostrar una degradación rápida consiste en utilizar ensayos de biodegradación para determinar si una sustancia es “fácilmente biodegradable”. Así, una sustancia que de un resultado positivo en este tipo de ensayos es probable que se biodegrade rápidamente en el medio acuático, con lo que es improbable que tenga efectos persistentes. No obstante, un resultado negativo en los ensayos selectivos no significa necesariamente que la sustancia no se degradará rápidamente en el medio ambiente. Por esto, se añadió un criterio más que permite usar datos para mostrar que una sustancia ha registrado realmente una degradación biótica o abiótica en el medio acuático superior al 70% en 28 días. De este modo, si la degradación puede demostrarse en condiciones ambientales realistas, la sustancia responderá a la definición de “degradabilidad rápida”. Muchos datos de degradación están disponibles en forma de vidas medias de degradación, que también se pueden utilizar en la definición de degradación rápida. En el Documento Guía que figura en el Anexo 8 se dan más detalles sobre la interpretación de esos datos. Algunos ensayos miden la biodegradación última de la sustancia, es decir, su mineralización completa. La biodegradación primaria no permitiría normalmente establecer una degradabilidad rápida a menos que pueda demostrarse que los

productos de la degradación no cumplen los criterios de clasificación de peligros para el medio ambiente acuático.

4.1.2.11.2 Hay que tener en cuenta que la degradación ambiental puede ser biótica o abiótica (como, por ejemplo, la hidrólisis) y los criterios utilizados reflejan ese hecho. Igualmente, hay que tener presente que el que no se cumplan los criterios de degradabilidad fácil en los ensayos de la OCDE no significa que la sustancia no se degradará rápidamente en el medio real. Así, cuando pueda demostrarse esa degradación rápida, la sustancia deberá considerarse rápidamente degradable. La hidrólisis podrá tomarse en cuenta si sus productos no cumplen los criterios de clasificación de peligros para el medio ambiente acuático. En el párrafo siguiente se incluye una definición específica de degradabilidad rápida. También cabe considerar otra evidencia de degradación rápida en el medio, que podrá revestir particular importancia si las sustancias inhiben la actividad microbiana a los niveles de concentración usados en los ensayos normalizados. En el documento guía del Anexo 8 se encontrará un conjunto de datos disponibles y orientaciones sobre su interpretación.

4.1.2.11.3 Las sustancias se considerarán rápidamente degradables en el medio ambiente si cumplen los siguientes criterios:

- a) Si en estudios de biodegradación fácil de 28 días, se obtienen los siguientes niveles de degradación:
  - i) Ensayos basados en carbono orgánico disuelto: 70%
  - ii) Ensayos basados en la desaparición de oxígeno o en la generación de dióxido de carbono: 60% del máximo teórico

Estos niveles de biodegradación han de lograrse en los 10 días siguientes al comienzo de la degradación, que se considera el momento en que el 10% de la sustancia se ha degradado, a menos que la sustancia se identifique como una sustancia compleja, de componentes múltiples, con constituyentes estructuralmente similares. En este caso, y cuando esté suficientemente justificado, podrá suprimirse la condición de los 10 días siguientes al comienzo de la degradación y aplicarse el criterio de los 28 días, como se explica en el anexo 9 (A9.4.2.3.3);

- b) Si, en los casos en que sólo se dispone de datos de la DBO y la DQO, la razón  $DBO_5/DQO$  es  $\geq 0,5$ ; o
- c) Si se dispone de otra información científica convincente que demuestra que la sustancia puede degradarse (biótica y/o abióticamente) en el medio acuático en una proporción  $> 70\%$  en un período de 28 días.

#### **4.1.2.12      *Compuestos inorgánicos y metales***

4.1.2.12.1 Para los compuestos inorgánicos y los metales, el concepto de degradabilidad tal como se aplica a los compuestos orgánicos tiene poco o ningún significado. Más bien, la sustancia puede transformarse mediante procesos ambientales normales para aumentar o disminuir la biodisponibilidad de la especie tóxica. Igualmente, los datos sobre bioacumulación deberían tratarse con cautela. Se proporcionará orientación específica sobre cómo usar los datos relativos a tales sustancias para determinar los requisitos de los criterios de clasificación.

4.1.2.12.2 Los metales y los compuestos inorgánicos poco solubles pueden ejercer una toxicidad aguda o crónica sobre el medio ambiente acuático dependiendo de la toxicidad intrínseca de la especie inorgánica biodisponible y de la cantidad de esta especie que puede entrar en disolución, así como de la velocidad a la que ello se produce. Al tomar una decisión sobre la clasificación deberán sopesarse todos los datos disponibles. Esto se aplica en particular a los metales que arrojen resultados cercanos a los límites en el protocolo de transformación/disolución.

#### 4.1.2.13 *Uso de las QSAR*

Si bien son preferibles resultados experimentales de ensayos, cuando no se disponga de ellos, podrán usarse en el proceso de clasificación las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) validadas para la toxicidad acuática y el  $\log K_{ow}$ . Cabe usar esas QSAR validadas sin modificar los criterios convenidos, si se limitan a sustancias cuyo modo de acción y aplicabilidad están bien caracterizados. Los valores calculados de toxicidad y de  $\log K_{ow}$  deberán ser valorados en el contexto de la red de seguridad. Las QSAR que permiten predecir la biodegradación fácil no son lo suficientemente precisas para estimar la degradación rápida.

#### 4.1.2.14 *Criterios de clasificación de las sustancias resumidos en forma de diagrama*

**Tabla 4.1.2: Esquema de clasificación de las sustancias peligrosas para el medio ambiente acuático**

Categorías de clasificación			
Peligro agudo (Nota 1)	Peligro a largo plazo (Nota 2)		
	Se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica		No se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica (Nota 1)
	Sustancias que no se degradan rápidamente (Nota 3)	Sustancias que se degradan rápidamente (Nota 3)	
<b>Categoría Aguda 1</b> $C(E)L_{50} \leq 1,00$	<b>Categoría Crónica 1</b> $CSEO \text{ o } CE_x \leq 0,1$	<b>Categoría Crónica 1</b> $CSEO \text{ o } CE_x \leq 0,01$	<b>Categoría Crónica 1</b> $C(E)L_{50} \leq 1,00$ y ausencia de degradabilidad rápida y/o $FBC \geq 500$ o, en su defecto, $\log K_{ow} \geq 4$
<b>Categoría Aguda 2</b> $1,00 < C(E)L_{50} \leq 10,0$	<b>Categoría Crónica 2</b> $0,1 < CSEO \text{ o } CE_x \leq 1$	<b>Categoría Crónica 2</b> $0,01 < CSEO \text{ o } CE_x \leq 0,1$	<b>Categoría Crónica 2</b> $1,00 < C(E)L_{50} \leq 10,0$ y ausencia de degradabilidad rápida y/o $FBC \geq 500$ o, en su defecto, $\log K_{ow} \geq 4$
<b>Categoría Aguda 3</b> $10,0 < C(E)L_{50} \leq 100$		<b>Categoría Crónica 3</b> $0,1 < CSEO \text{ o } CE_x \leq 1$	<b>Categoría Crónica 3</b> $10,0 < C(E)L_{50} \leq 100$ y ausencia de degradabilidad rápida y/o $FBC \geq 500$ o, en su defecto, $\log K_{ow} \geq 4$
	<b>Categoría Crónica 4 (Nota 4)</b> Ejemplo: (Nota 5) Ausencia de toxicidad aguda y de degradabilidad rápida, y $FBC \geq 500$ o, en su defecto, $\log K_{ow} \geq 4$ , a menos que las $CSEO > 1$ mg/l		

**NOTA 1:** Rango de toxicidad aguda basado en los valores de  $C(E)L_{50}$  en mg/l para peces, crustáceos y/o algas u otras plantas acuáticas (o estimación de la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) si no se dispone de datos experimentales).

**NOTA 2:** Las sustancias se clasifican en las diversas categorías crónicas, a menos que se disponga de datos adecuados sobre la toxicidad crónica para los tres niveles tróficos por encima de la solubilidad en agua o de 1 mg/l. (Por "adecuados" se entiende que los datos proporcionan una cobertura suficiente del efecto que interesa. En general, ello supondría disponer de datos medidos en ensayos, pero para evitar una cantidad de ensayos innecesaria, en algunos casos pueden utilizarse también datos estimados, por ejemplo, la (Q)SAR o, en los casos más claros, opiniones de expertos.)

**NOTA 3:** Rango de toxicidad crónica basado en los valores de la  $CSEO$  o en los valores equivalentes de la  $CE_x$  en mg/l para peces o crustáceos u otras medidas reconocidas de toxicidad crónica.

**NOTA 4:** *El sistema también introduce una clasificación de tipo "red de seguridad" (denominada categoría Crónica 4) para los casos en que los datos disponibles no permitan la clasificación con arreglo a los criterios establecidos pero exista, sin embargo, algún motivo de preocupación.*

**NOTA 5:** *Las sustancias poco solubles para las que no se haya registrado toxicidad aguda en el límite de solubilidad y que no sean rápidamente degradables y presenten un potencial de bioacumulación se clasificarán en esta categoría a menos que se demuestre que la clasificación no es necesaria en razón de los peligros a largo plazo para el medio ambiente acuático.*

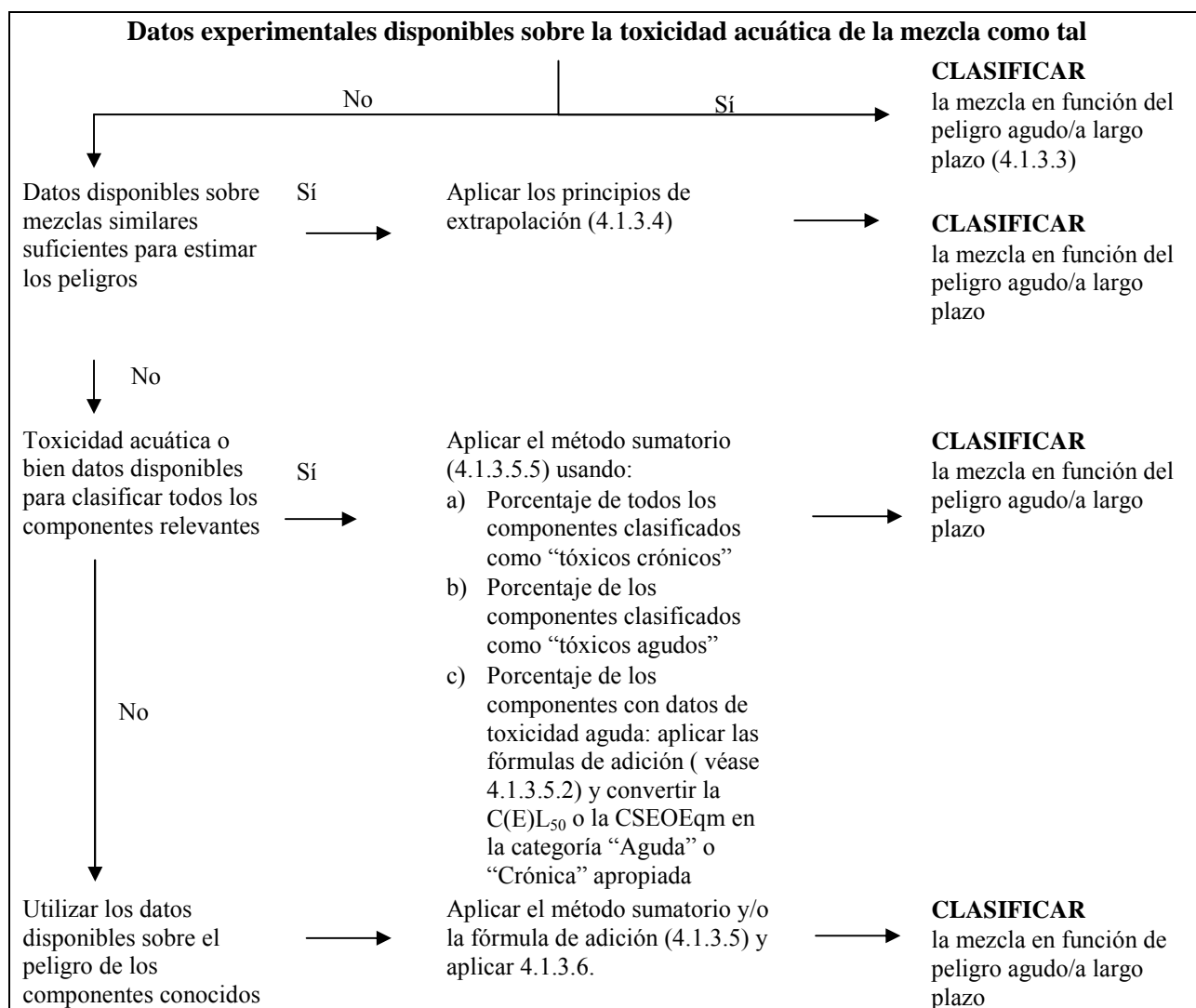
#### **4.1.3 Criterios de clasificación para las mezclas**

4.1.3.1 El sistema de clasificación de mezclas comprende todas las categorías que se usan para clasificar las sustancias, es decir las categorías Aguda 1 a 3 y Crónica 1 a 4. Con el fin de aprovechar todos los datos disponibles a la hora de clasificar los peligros para el medio ambiente de cada mezcla, se efectúa el supuesto siguiente que se aplicará cuando corresponda.

Los “componentes relevantes” de una mezcla son los que están presentes en una concentración igual o superior a 1% (peso/peso), en el caso de los componentes clasificados en las categorías Aguda y/o Crónica 1, e igual o superior a 1% en el caso de los demás componentes, a menos que exista la presunción (por ejemplo, en el caso de componentes muy tóxicos) de que un componente presente en una concentración inferior a 0,1% puede ser relevante para clasificar la mezcla según los peligros que presenta para el medio ambiente acuático.

4.1.3.2 La clasificación de los peligros para el medio ambiente acuático se hace mediante un enfoque secuencial y depende del tipo de información disponible sobre la propia mezcla y sus componentes. Comprende una clasificación basada en las mezclas sometidas a ensayo, una clasificación basada en los principios de extrapolación y el método de la “suma de los componentes clasificados” y/o la aplicación de una “fórmula de adición”. La figura 4.1.2 esquematiza el proceso que hay que seguir.

**Figura 4.1.2: Enfoque secuencial para clasificar mezclas en función de los peligros agudos y a largo plazo que presentan para el medio ambiente acuático**



#### 4.1.3.3 *Clasificación de las mezclas cuando se dispone de datos sobre la toxicidad de la mezcla como tal*

4.1.3.3.1 Cuando se hayan realizado ensayos sobre la mezcla como tal para determinar su toxicidad para el medio ambiente acuático, esta información se utilizará para clasificar la mezcla con arreglo a los criterios adoptados para las sustancias. La clasificación se basará normalmente en los datos relativos a los peces, los crustáceos, y las algas o plantas (véanse 4.1.1.3 y 4.1.1.4). Cuando no se disponga de suficientes datos de toxicidad aguda o crónica para las mezclas como tal, se aplicarán los "principios de extrapolación" o el "método sumatorio" (véanse los párrafos 4.1.3.4 y 4.1.3.5 y el procedimiento de decisión 4.1.5.2.2).

4.1.3.3.2 La clasificación de las mezclas en función del peligro a largo plazo requiere información adicional sobre la degradabilidad y, en ciertos casos, la bioacumulación. No existen datos sobre la degradabilidad y la bioacumulación para las mezclas como tal. Los ensayos de degradabilidad y bioacumulación no se utilizan para las mezclas porque normalmente son difíciles de interpretar y sólo son significativos para las sustancias individuales.

#### 4.1.3.3.3 *Clasificación en las categorías Aguda 1, 2 y 3*

- a) Cuando se dispone de datos adecuados de ensayos de toxicidad aguda ( $CL_{50}$  o  $CE_{50}$ ) para la mezcla como tal que indican que la  $C(E)L_{50} \leq 100$  mg/l:

Clasifíquese la mezcla como Aguda 1, 2 ó 3 con arreglo a la tabla 4.1.1 a);

- b) Cuando se dispone de datos de ensayos de toxicidad aguda ( $CL_{50}(s)$  o  $CE_{50}(s)$ ) para la mezcla como tal que indican que la  $C(E)L_{50}(s) > 100$  mg/l, o superior a la solubilidad en agua:

No es necesario clasificar la muestra en función del peligro agudo.

#### 4.1.3.3.4 *Clasificación en las categorías Crónica 1, 2 y 3*

- a) Cuando se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica ( $CE_x$  o CSEO) para la mezcla como tal que indican que la  $CE_x$  o la CSEO de la mezcla sometida a ensayo  $\leq 1$  mg/l:

- i) Clasifíquese la mezcla en las categorías Crónica 1, 2 ó 3 con arreglo a la tabla 4.1.1 b) ii) (rápidamente degradable) si la información disponible permite concluir que todos los componentes relevantes de la mezcla son rápidamente degradables;
- ii) Clasifíquese la mezcla en las categorías Crónica 1, 2 ó 3 en todos los demás casos con arreglo a la tabla 4.1.1 b) i) (no rápidamente degradable);

- b) Cuando se dispone de datos adecuados de la toxicidad crónica ( $CE_x$  o CSEO) para la mezcla como tal que indican que las  $CE_x(s)$  o CSEO(s) de la mezcla sometida a ensayo  $> 1$  mg/l o superior a la solubilidad en agua:

No es necesario clasificar la mezcla en función del peligro a largo plazo a menos que, aún así, haya algún motivo de preocupación.

#### 4.1.3.3.5 *Clasificación en la categoría Crónica 4*

Si persiste algún motivo de preocupación:

Clasifíquese la mezcla en la categoría Crónica 4 (clasificación de tipo red de seguridad) con arreglo a la tabla 4.1.1 c).

#### 4.1.3.4 *Clasificación de mezclas cuando no se dispone de datos sobre la toxicidad de las mezclas como tal: Principios de extrapolación*

Cuando no se hayan realizado ensayos sobre la mezcla como tal para determinar el peligro que presenta para el medio ambiente acuático, pero se disponga de datos suficientes sobre sus componentes individuales y sobre mezclas similares sometidas a ensayo para caracterizar debidamente sus peligros, se usarán estos datos de conformidad con los principios de extrapolación descritos a continuación. De esta manera se asegura la utilización del mayor número posible de datos disponibles durante el proceso de clasificación con el fin de caracterizar los peligros de la mezcla sin necesidad de efectuar ensayos adicionales en animales.

#### 4.1.3.4.2 *Dilución*

Si una nueva mezcla resulta de la dilución de una mezcla sometida a ensayo o de una sustancia con un diluyente clasificado en una categoría de peligro para el medio ambiente acuático igual o inferior a la del componente original menos tóxico y del que no se espera que influya sobre el peligro para el medio ambiente acuático del resto de los componentes, la mezcla resultante se considerará, a efectos de clasificación, como equivalente a la mezcla o sustancia originales sometidas a ensayo. También puede aplicarse el método que se explica en 4.1.3.5.



#### 4.1.3.4.3 *Variación entre lotes*

La clasificación de peligro para el medio ambiente acuático de un lote sometido a ensayo de una mezcla se considerará esencialmente equivalente a la de otro lote no sometido a ensayo del mismo producto comercial que haya sido obtenido por el mismo fabricante o bajo su control, a menos que haya motivos para creer que se han producido cambios que pueden provocar modificaciones en la clasificación de peligro para el medio ambiente acuático del lote no sometido a ensayo. Cuando esto suceda será necesaria una nueva clasificación.

#### 4.1.3.4.4 *Concentración de las mezclas clasificadas en las categorías más tóxicas (Crónica 1 y Aguda 1)*

Si una mezcla sometida a ensayo se clasifica en las categorías Crónica 1 y/o Aguda 1 y se aumenta la concentración de los componentes de la mezcla que se clasifican en esas mismas categorías, la mezcla concentrada no sometida a ensayo se clasificará en la misma categoría que la mezcla original sometida a ensayo sin que sea necesario realizar ensayos adicionales.

#### 4.1.3.4.5 *Interpolación dentro de una misma categoría de toxicidad*

En el caso de tres mezclas (A, B y C) con componentes idénticos, en que las mezclas A y B hayan sido sometidas a ensayo y clasificadas en la misma categoría de toxicidad, y la mezcla C, no sometida a ensayo, tenga los mismos componentes toxicológicamente activos que las mezclas A y B pero concentraciones de esos componentes intermedias con respecto a las de las mezclas A y B, se considerará que la mezcla C pertenece a la misma categoría de toxicidad que A y B.

#### 4.1.3.4.6 *Mezclas esencialmente similares*

Cuando se tenga lo siguiente:

- a) Dos mezclas:    i)    A + B;  
                              ii)    C + B;
- b) La concentración del componente B es esencialmente la misma en ambas mezclas;
- c) La concentración del componente A en la mezcla i) es prácticamente igual a la del componente C en la mezcla ii);
- d) Se dispone de datos relativos a los peligros para el medio ambiente acuático de A y C y esos datos son sustancialmente equivalentes, es decir, ambos pertenecen a la misma categoría de peligro y no se espera que afecten a la toxicidad de B para el medio ambiente acuático.

Si la mezcla i) o ii) ya está clasificada sobre la base de datos experimentales, la otra mezcla podrá asignarse a la misma categoría de peligro.

#### **4.1.3.5 *Clasificación de mezclas cuando se dispone de datos de toxicidad sobre todos los componentes o sólo sobre algunos***

4.1.3.5.1 La clasificación de una mezcla se basará en la suma de las concentraciones de los componentes clasificados. El porcentaje de los componentes clasificados como “tóxicos agudos” o “tóxicos crónicos” se introducirá directamente en el método sumatorio. Los detalles de este método se describen en 4.1.3.5.5.

4.1.3.5.2 Las mezclas pueden estar constituidas por componentes ya clasificados (categorías Aguda 1, 2, 3 y/o Crónica 1, 2, 3, 4) o por componentes para los que se dispone de datos de toxicidad adecuados obtenidos a partir de ensayos. Cuando se disponga de datos adecuados sobre la toxicidad para más de un componente de la mezcla, la toxicidad combinada de esos componentes se calculará utilizando las fórmulas de adición a) o b) que figuran a continuación, en función de la naturaleza de los datos de toxicidad.

- a) Sobre la base de la toxicidad acuática aguda:

$$\frac{\sum C_i}{C(E)L_{50m}} = \sum_n \frac{C_i}{C(E)L_{50i}}$$

donde:

- $C_i$  = concentración del componente i (porcentaje en peso);  
 $C(E)L_{50i}$  =  $CL_{50}$  o  $CE_{50}$  del componente i (en mg/l);  
 $n$  = número de componentes, variando i de 1 a n;  
 $C(E)L_{50m}$  =  $C(E)L_{50}$  de la fracción de la mezcla para la que se dispone de datos obtenidos a partir de ensayos.

La toxicidad así calculada se utilizará para asignar esa fracción de la mezcla a una categoría de peligro agudo que se utilizará posteriormente al aplicar el método sumatorio.

- b) Sobre la base de la toxicidad acuática crónica:

$$\frac{\sum C_i + \sum C_j}{CSEOE_{qm}} = \sum_n \frac{C_i}{CSEO_i} + \sum_n \frac{C_j}{0.1 \times CSEO_j}$$

donde:

- $C_i$  = concentración del componente i (porcentaje en peso) para los componentes rápidamente degradables;  
 $C_j$  = concentración del componente j (porcentaje en peso) para los componentes no rápidamente degradables;  
 $CSEO_i$  = CSEO (u otra medida reconocida de la toxicidad crónica) del componente i para los componentes rápidamente degradables en mg/l;  
 $CSEO_j$  = CSEO (u otra medida reconocida de la toxicidad crónica) del componente j para los componentes no rápidamente degradables, en mg/l;  
 $n$  = número de componentes, variando i y j de 1 a n;  
 $CSEOE_{qm}$  = CSEO equivalente de la fracción de la mezcla para la que se dispone de datos obtenidos a partir de ensayos.

Así pues, la toxicidad equivalente refleja el hecho de que las sustancias no rápidamente degradables se clasifican en una categoría de peligro más "severa", en un nivel, que las sustancias rápidamente degradables.

La toxicidad equivalente calculada se utilizará para asignar esa fracción de la mezcla a una categoría de peligro a largo plazo, de conformidad con los criterios aplicables a las sustancias rápidamente degradables (tabla 4.1.1 b) ii)), que se utilizará posteriormente al aplicar el método sumatorio.

4.1.3.5.3 Si se aplica la fórmula de adición a una fracción de la mezcla, es preferible calcular la toxicidad de esta fracción de la mezcla introduciendo para cada componente los valores de toxicidad de cada uno de ellos obtenidos con respecto al mismo grupo taxonómico (peces, crustáceos o algas) y seleccionando a continuación la toxicidad más elevada (valor más bajo) obtenida utilizando el grupo más sensible de los tres. Sin embargo, cuando no se disponga de datos de toxicidad para cada componente con respecto al mismo grupo taxonómico, el valor de la toxicidad de cada componente se seleccionará de la misma manera que se seleccionan los valores de toxicidad para clasificar las sustancias, esto es, se usará la toxicidad más alta (es decir, el resultado obtenido con el organismo más sensible sometido a ensayo). La toxicidad aguda y/o

crónica calculada se utilizará entonces para clasificar esa fracción de la mezcla en la categoría Aguda 1, 2 o 3 y/o Crónica 1, 2 ó 3 usando los mismos criterios descritos para las sustancias.

4.1.3.5.4 Cuando una mezcla se haya clasificado de diferentes maneras, se tomará el método que arroje el resultado más restrictivo.

4.1.3.5.5 *Método sumatorio*

4.1.3.5.5.1 Fundamento

4.1.3.5.5.1.1 En el caso de la clasificación de componentes en las categorías Aguda 1/Crónica 1 a Aguda 3/Crónica 3, los criterios de toxicidad subyacentes difieren en un factor 10 entre una categoría y otra. Los componentes clasificados en una categoría de peligro alta pueden, por lo tanto, contribuir a la clasificación de una mezcla en una categoría inferior. El cálculo de estas categorías de clasificación ha de tener en cuenta, por consiguiente, la contribución de todos los componentes juntos clasificados en las categorías Aguda 1/Crónica 1 a Aguda 3/Crónica 3.

4.1.3.5.5.1.2 Cuando una mezcla contenga componentes clasificados en las categorías Aguda 1 o Crónica 1, deberá prestarse atención al hecho de que tales componentes, cuando su toxicidad aguda sea claramente inferior a 1 mg/l y/o la toxicidad crónica sea claramente inferior a 0,1 mg/l (si no son rápidamente degradables) y a 0,01 mg/l (si son rápidamente degradables), contribuyen a la toxicidad de la mezcla incluso a bajas concentraciones (véase también el capítulo 1.3, *Clasificación de sustancias y mezclas peligrosas*, párrafo 1.3.3.2.1). Los componentes activos de plaguicidas a menudo presentan esa toxicidad acuática elevada, pero también lo hacen algunas otras sustancias tales como los compuestos organometálicos. En esas circunstancias, la aplicación de los valores de corte/límites de concentración normales pueden conducir a una “infraclasificación” de la mezcla. Por tanto, para tener en cuenta los componentes muy tóxicos habrá que multiplicar por los factores que se indican en 4.1.3.5.5.5.

4.1.3.5.5.2 Procedimiento de clasificación

Por lo general, una clasificación más severa de las mezclas se impone a una clasificación menos severa, por ejemplo una clasificación en la categoría Crónica 1 prevalece sobre una clasificación en la categoría Crónica 2. En consecuencia, el procedimiento de clasificación se considerará ya completado cuando el resultado de la clasificación sea toxicidad Crónica 1. Una clasificación más severa que esta última no es posible y, por tanto, no será necesario continuar con el procedimiento de clasificación.

4.1.3.5.5.3 Clasificación en las categorías Aguda 1, 2 y 3

4.1.3.5.5.3.1 Se considerarán en primer lugar todos los componentes clasificados en la categoría Aguda 1. Si la suma de las concentraciones (en %) de esos componentes es  $\geq 25\%$ , toda la mezcla se clasificará como Aguda 1. Si el resultado del cálculo es una clasificación de la mezcla en la categoría Aguda 1, el proceso de clasificación habrá terminado.

4.1.3.5.5.3.2 En los casos en que la mezcla no se clasifique en la categoría Aguda 1, se considerará su clasificación en la categoría Aguda 2. Si la suma de las concentraciones (en %) de todos los componentes clasificados en la categoría Aguda 1 multiplicada por 10, más la suma de las concentraciones (en %) de todos los componentes clasificados en la categoría Aguda 2, es  $\geq 25\%$ , toda la mezcla se clasificará en la categoría Aguda 2. Si el resultado del cálculo es una clasificación de la mezcla en la categoría Aguda 2, el proceso de clasificación habrá terminado.

4.1.3.5.5.3.3 En los casos en que la mezcla no se clasifique en la categoría Aguda 1 ó 2, se considerará su clasificación en la categoría Aguda 3. Si la suma de las concentraciones (en %) de los componentes clasificados en la categoría Aguda 1 multiplicada por 100, más la suma de las concentraciones (en %) de todos los componentes clasificados en la categoría Aguda 2 multiplicada por 10, más la suma de las concentraciones (en %) de todos los componentes clasificados en la categoría Aguda 3, es  $\geq 25\%$ , toda la mezcla se clasificará en la categoría Aguda 3.

4.1.3.5.5.3.4 La clasificación de las mezclas en función de sus peligros agudos, mediante la suma de las concentraciones de los componentes clasificados, se resume en la tabla 4.1.3.

**Tabla 4.1.3: Clasificación de las mezclas en función de los peligros agudos que presentan, mediante la suma de las concentraciones de los componentes clasificados**

Suma de las concentraciones (en %) de los componentes clasificados:	Mezcla clasificada en la categoría:
$\text{Aguda 1} \times M^a \geq 25\%$	Aguda 1
$(M \times 10 \times \text{Aguda 1}) + \text{Aguda 2} \geq 25\%$	Aguda 2
$(M \times 100 \times \text{Aguda 1}) + (10 \times \text{Aguda 2}) + \text{Aguda 3} \geq 25\%$	Aguda 3

<sup>a</sup> El factor *M* se explica en 4.1.3.5.5.5.

#### 4.1.3.5.5.4 Clasificación en las categorías Crónica 1, 2, 3 y 4

4.1.3.5.5.4.1 En primer lugar, se considerarán todos los componentes clasificados en la categoría Crónica 1. Si la suma de las concentraciones (en %) de esos componentes es  $\geq 25\%$ , la mezcla se clasificará en la categoría Crónica 1. Si el resultado del cálculo es una clasificación de la mezcla en la categoría Crónica 1, el proceso de clasificación habrá terminado.

4.1.3.5.5.4.2 En los casos en que la mezcla no se clasifique en la categoría Crónica 1, se considerará la clasificación de la mezcla en la categoría Crónica 2. Una mezcla se clasificará en la categoría Crónica 2 si la suma de las concentraciones (en %) de todos los componentes clasificados en la categoría Crónica 1 multiplicada por 10, más la suma de las concentraciones (en %) de todos los componentes clasificados en la categoría Crónica 2, es  $\geq 25\%$ . Si el resultado del cálculo es una clasificación de la mezcla en la categoría Crónica 2, el proceso de clasificación habrá terminado.

4.1.3.5.5.4.3 En los casos en que la mezcla no se clasifique en las categorías Crónica 1 ó Crónica 2, se considerará la clasificación de la mezcla en la categoría Crónica 3. La mezcla se clasificará en esta última categoría si la suma de las concentraciones (en %) de todos los componentes clasificados en la categoría Crónica 1 multiplicada por 100, más la suma de las concentraciones (en %) de todos los componentes clasificados en la categoría Crónica 2 multiplicada por 10, más la suma de las concentraciones (en %) de todos los componentes clasificados en la categoría Crónica 3, es  $\geq 25\%$ .

4.1.3.5.5.4.4 En los casos en que la mezcla no se clasifique en la categoría Crónica 1, 2 ó 3, se considerará la clasificación de la mezcla en la categoría Crónica 4. La mezcla se clasificará en esta última categoría si la suma de las concentraciones (en %) de todos los componentes clasificados en las categorías Crónica 1, 2, 3 y 4 es  $\geq 25\%$ .

4.1.3.5.5.4.5 En la tabla 4.1.4 se resume la clasificación de las mezclas en función de sus peligros a largo plazo, mediante la suma de las concentraciones de los componentes clasificados.

**Tabla 4.1.4: Clasificación de mezclas en función de los peligros a largo plazo que presenta, mediante la suma de las concentraciones de los componentes clasificados**

Suma de las concentraciones (en %) de componentes clasificados :	Mezcla clasificada en la categoría:
$\text{Crónica 1} \times M^a \geq 25\%$	Crónica 1
$(M \times 10 \times \text{Crónica 1}) + \text{Crónica 2} \geq 25\%$	Crónica 2
$(M \times 100 \times \text{Crónica 1}) + (10 \times \text{Crónica 2}) + \text{Crónica 3} \geq 25\%$	Crónica 3
$\text{Crónica 1} + \text{Crónica 2} + \text{Crónica 3} + \text{Crónica 4} \geq 25\%$	Crónica 4

<sup>a</sup> El factor *M* se explica en 4.1.3.5.5.5.

#### 4.1.3.5.5 Mezclas con componentes altamente tóxicos

Los componentes clasificados en la categoría Aguda 1 ó Crónica 1 con efectos tóxicos agudos a concentraciones muy inferiores a 1 mg/l y/o efectos tóxicos crónicos a concentraciones muy inferiores a 0,1 mg/l (si no son rápidamente degradables) y a 0,01 mg/l (si son rápidamente degradables), pueden influir en la toxicidad de la mezcla y se les asigna un mayor peso al aplicar el método sumatorio. Cuando una mezcla contenga componentes clasificados en la categoría Aguda 1 ó Crónica 1, el enfoque secuencial descrito en 4.1.3.5.3 y 4.1.3.5.4 se aplicará usando una suma ponderada que se obtiene al multiplicar las concentraciones de los componentes de las categorías Aguda 1 y Crónica 1 por un factor de multiplicación, en lugar de sumar sin más los porcentajes. Esto significa que la concentración de componentes clasificados en la categoría “Aguda 1” en la columna de la izquierda de la tabla 4.1.3 y la concentración de componentes clasificados en la categoría “Crónica 1” en la columna de la izquierda de la tabla 4.1.4 se multiplican por el factor apropiado. Los factores de multiplicación se definen usando el valor de toxicidad, tal como se resume en la tabla 4.1.5. Por tanto, con el fin de clasificar una mezcla formada por componentes de toxicidad Aguda 1 y/o Crónica 1, quien clasifique necesitará conocer el valor del factor M para aplicar el método sumatorio. Como alternativa también se puede usar la fórmula de adición (véase 4.1.3.5.2) cuando se disponga de datos sobre la toxicidad de todos los componentes altamente tóxicos de la mezcla y existan pruebas convincentes de que todos los demás componentes, incluidos aquéllos para los que no se dispone de datos específicos de toxicidad aguda y/o crónica, son poco o nada tóxicos y no contribuyen de modo apreciable al peligro que presenta la mezcla para el medio ambiente.

**Tabla 4.1.5: Factores de multiplicación para componentes altamente tóxicos de las mezclas**

Toxicidad aguda	Factor M	Toxicidad crónica	Factor M	
Valor de $C(E)L_{50}$		Valor CSEO	Componentes NRD <sup>a</sup>	Componentes RD <sup>b</sup>
$0,1 < C(E)L_{50} \leq 1$	1	$0,01 < CSEO \leq 0,1$	1	-
$0,01 < C(E)L_{50} \leq 0,1$	10	$0,001 < CSEO \leq 0,01$	10	1
$0,001 < C(E)L_{50} \leq 0,01$	100	$0,0001 < CSEO \leq 0,001$	100	10
$0,0001 < C(E)L_{50} \leq 0,001$	1000	$0,00001 < CSEO \leq 0,0001$	1000	100
$0,00001 < C(E)L_{50} \leq 0,0001$	10000	$0,000001 < CSEO \leq 0,00001$	10000	1000
(continúa a intervalos de un factor 10)		(continúa a intervalos de un factor 10)		

<sup>a</sup> No rápidamente degradables

<sup>b</sup> Rápidamente degradables

#### 4.1.3.6 Clasificación de mezclas con componentes sobre los que no se dispone de ninguna información utilizable

Cuando no exista información útil sobre la toxicidad acuática aguda y/o crónica de uno o más componentes relevantes, se concluirá que la mezcla no puede asignarse a ninguna categoría de peligro definitivo. En esa situación, la mezcla se clasificará basándose sólo en los componentes conocidos, con la mención adicional de que: “x % de la mezcla está constituida por uno o varios componentes de peligro desconocido para el medio ambiente acuático”. La autoridad competente podrá decidir que la declaración adicional figure en la etiqueta o en la FDS, o en ambas, o bien dejar que sea el fabricante/proveedor quien elija el lugar donde haya de aparecer.

#### 4.1.4 Comunicación de peligro

En el Capítulo 1.4 (*Comunicación de peligros: Etiquetado*) figuran consideraciones generales y específicas sobre los requisitos de etiquetado. El anexo 2 contiene tablas resumen sobre clasificación y etiquetado. El anexo 3 contiene ejemplos de consejos de prudencia y pictogramas de precaución que pueden utilizarse con la aprobación de la autoridad competente.

**Tabla 4.1.6: Elementos que deben figurar en las etiquetas de peligro para sustancias y mezclas peligrosas para el medio ambiente acuático****AGUDA**

	<b>Categoría 1</b>	<b>Categoría 2</b>	<b>Categoría 3</b>
<b>Símbolo</b>	Medio ambiente	<i>Sin símbolo</i>	<i>Sin símbolo</i>
<b>Palabra de advertencia</b>	Atención	<i>Sin palabra de advertencia</i>	<i>Sin palabra de advertencia</i>
<b>Indicación de peligro</b>	Muy tóxico para los organismos acuáticos	Tóxico para los organismos acuáticos	Nocivo para los organismos acuáticos

**CRÓNICA**

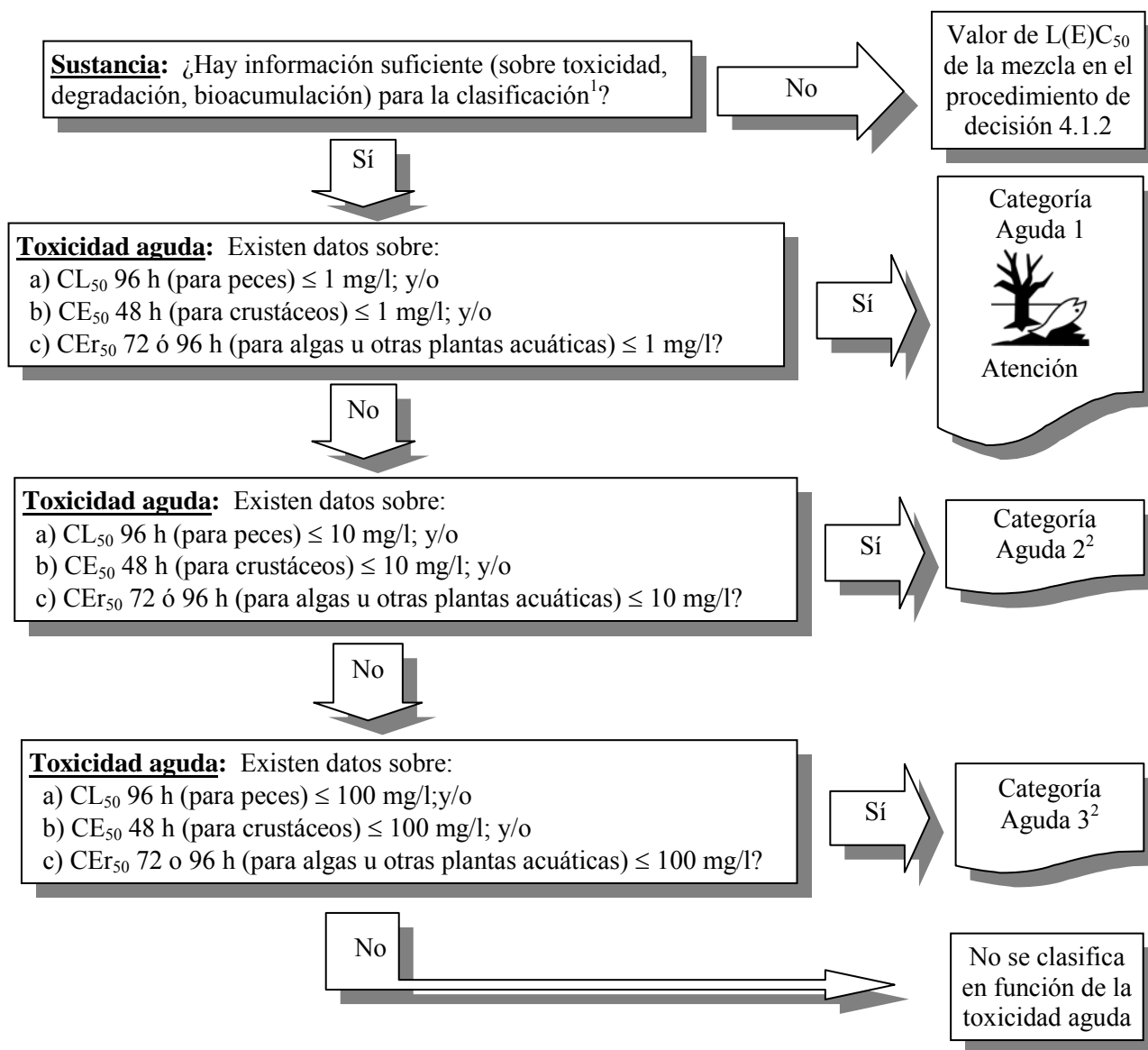
	<b>Categoría 1</b>	<b>Categoría 2</b>	<b>Categoría 3</b>	<b>Categoría 4</b>
<b>Símbolo</b>	Medio ambiente	Medio ambiente	<i>Sin símbolo</i>	<i>Sin símbolo</i>
<b>Palabra de advertencia</b>	Atención	<i>Sin palabra de advertencia</i>	<i>Sin palabra de advertencia</i>	<i>Sin palabra de advertencia</i>
<b>Indicación de peligro</b>	Muy tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos	Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos	Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos	Puede ser nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos

**4.1.5 Procedimiento de decisión para las sustancias y mezclas peligrosas para el medio ambiente acuático**

Los procedimientos de decisión siguientes no forman parte del sistema de clasificación armonizado, pero figuran aquí como orientación adicional. Se recomienda encarecidamente que la persona que se encargue de la clasificación estudie los criterios de clasificación antes y durante la aplicación de estos procedimientos de decisión.

#### 4.1.5.1 Clasificación en función de los peligros agudos (a corto plazo) para el medio ambiente acuático

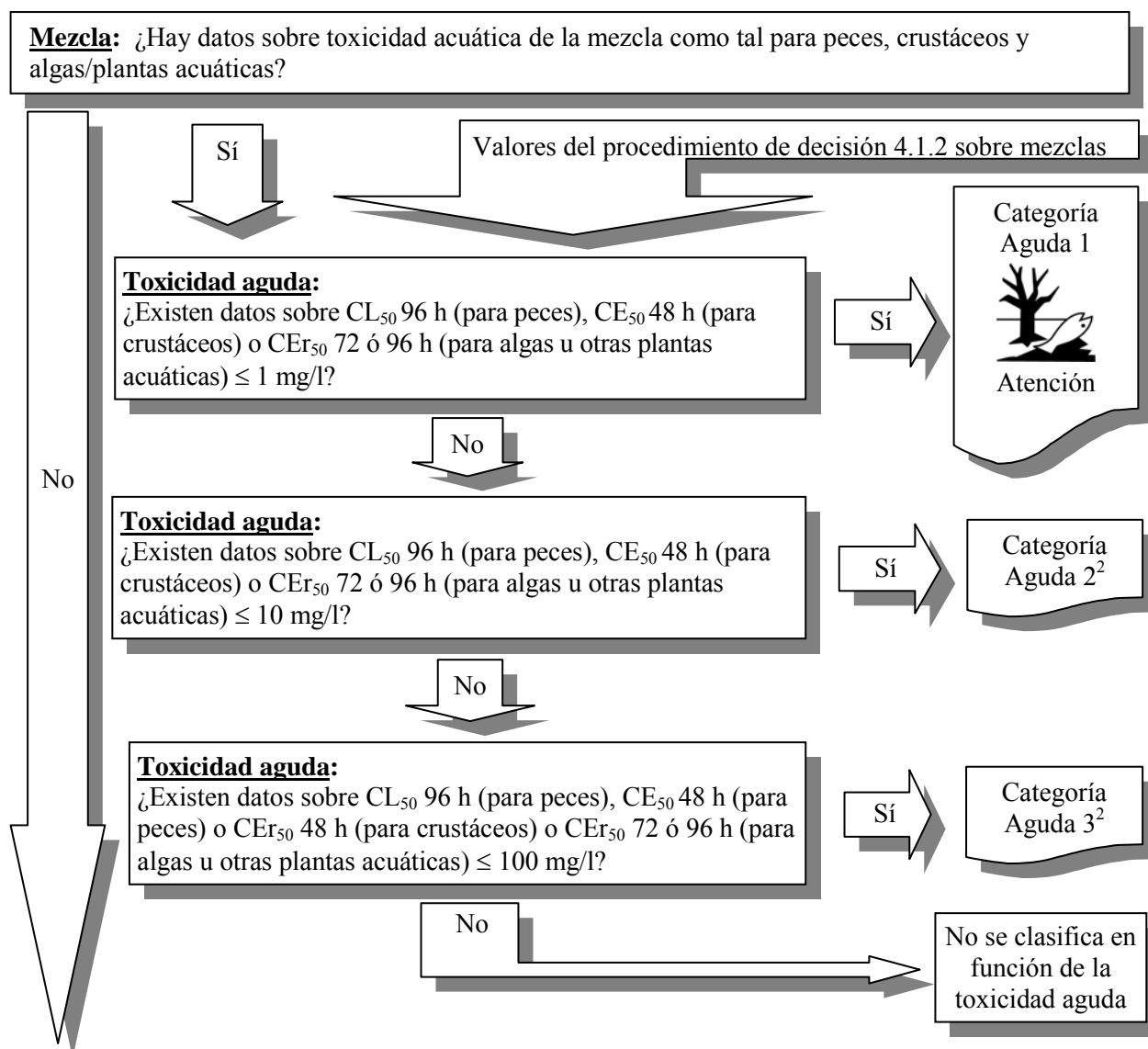
##### 4.1.5.1.1 Procedimiento de decisión 4.1.1 para las sustancias y mezclas peligrosas para el medio ambiente acuático



(Continúa en la página siguiente)

<sup>1</sup> La clasificación puede basarse en datos medidos y/o calculados (véanse 4.1.2.13 y anexo 9) y/o, en decisiones por analogía (véase A9.6.4.5 en el anexo 9).

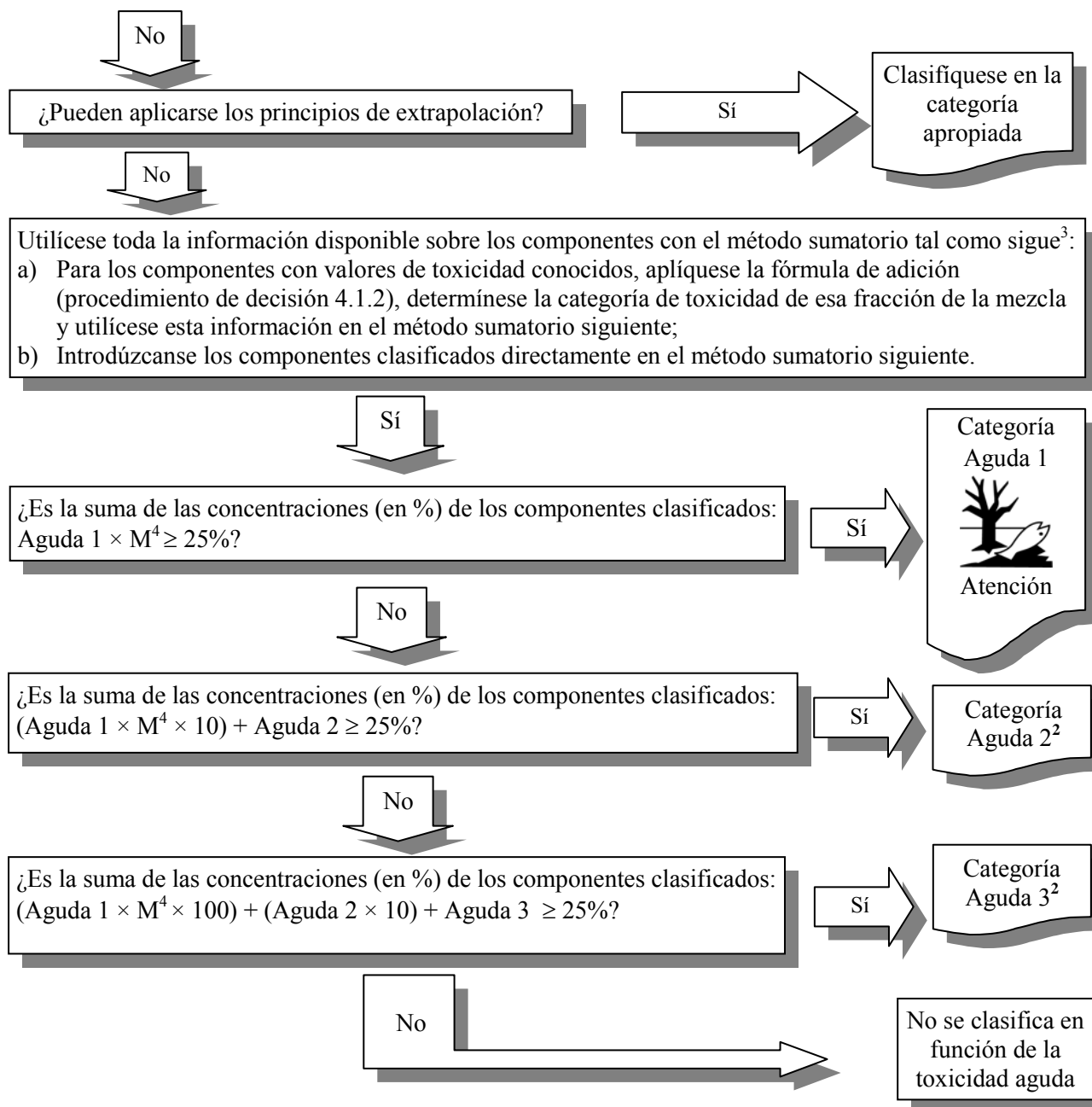
<sup>2</sup> Los requisitos de etiquetado difieren entre unos sistemas reguladores y otros y algunas categorías de clasificación sólo se usan en algunos sistemas.



(Continúa en la página siguiente)

<sup>2</sup> Los requisitos de etiquetado difieren entre unos sistemas reguladores y otros y algunas categorías de clasificación sólo se usan en algunos sistemas.





<sup>2</sup> Los requisitos de etiquetado difieren entre unos sistemas reguladores y otros y algunas categorías de clasificación sólo se usan en algunos sistemas.

<sup>3</sup> Si no hay información sobre todos los componentes, menciónese en la etiqueta que "el x % de la mezcla está constituido por uno o varios componentes de peligro desconocido para el medio ambiente acuático". La autoridad competente podrá decidir que la declaración adicional figure en la etiqueta o en la FDS, o en ambas, o bien dejar que sea el fabricante/proveedor quien elija el lugar donde haya de aparecer. Como alternativa, en el caso de una mezcla con componentes muy tóxicos, si se conocen los valores de toxicidad de esos componentes y el resto de ellos no contribuyen de manera significativa al peligro de la mezcla, podrá aplicarse la fórmula de adición (véase 4.1.3.5.5.5). En este caso y en los demás en que se disponga de los valores de toxicidad para todos los componentes, la clasificación en la categoría de toxicidad aguda podrá hacerse basándose tan sólo en la fórmula de adición.

<sup>4</sup> El factor M se explica en 4.1.3.5.5.5.

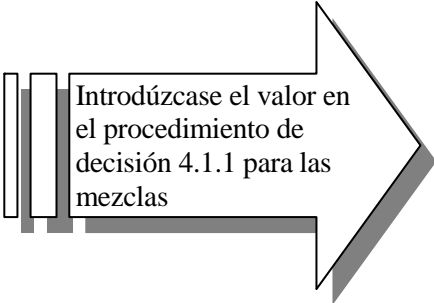
4.1.5.1.2 *Procedimiento de decisión 4.1.2 para mezclas (fórmula de adición)*

Aplíquese el método de adición:

$$\frac{\sum C_i}{C(E)L_{50_m}} = \sum_n \frac{C_i}{C(E)L_{50_i}}$$

donde:

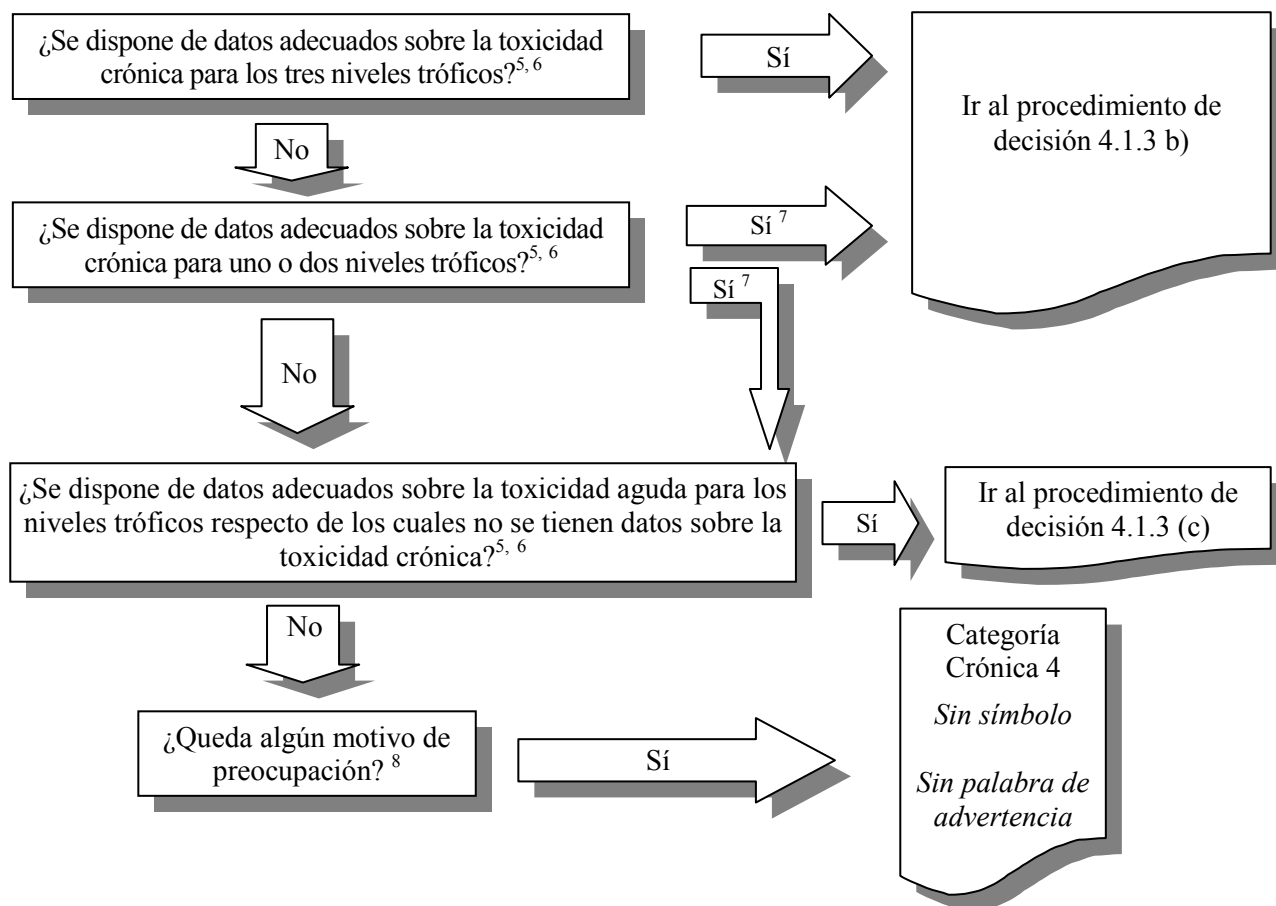
$C_i$  = concentración del componente i (porcentaje en peso);  
 $C(E)L_{50_i}$  =  $CL_{50}$  o  $CE_{50}$  (en mg/l) para el componente i;  
 $N$  = número de componentes, variando i de 1 a n;  
 $C(E)L_{50_m}$  =  $C(E)L_{50}$  de la fracción de la mezcla constituida por componentes de los que se dispone de datos obtenidos de los ensayos



Introdúzcase el valor en el procedimiento de decisión 4.1.1 para las mezclas

#### 4.1.5.2 Clasificación en función del peligro a largo plazo para el medio ambiente

##### 4.1.5.2.1 Procedimiento de decisión 4.1.3 a) para sustancias



(Continúa en la página siguiente)

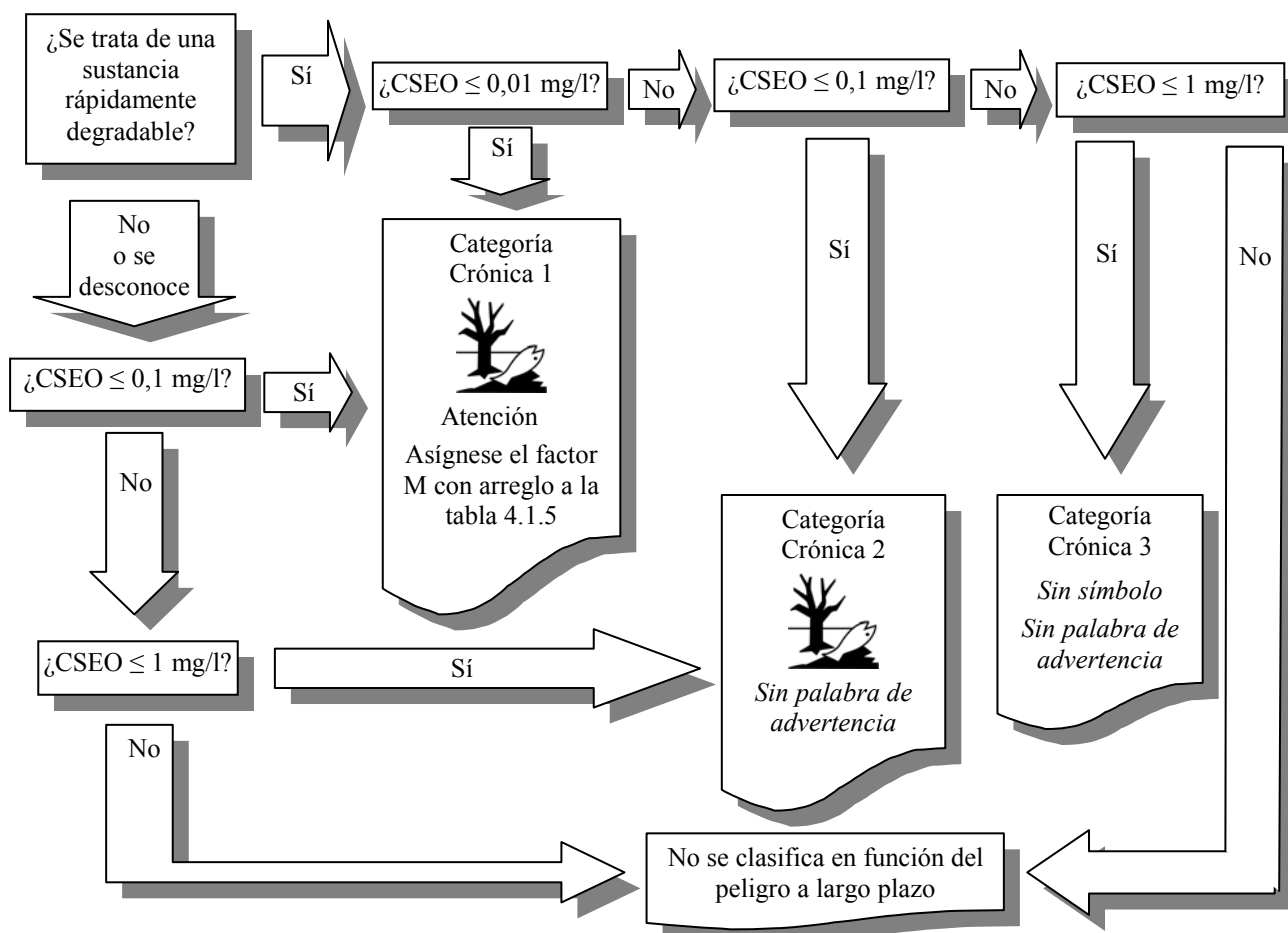
<sup>5</sup> Los datos deberán obtenerse utilizando preferentemente métodos de ensayo internacionalmente armonizados (por ejemplo, las Directrices de ensayo de la OCDE u otras equivalentes) y de conformidad con los principios de las buenas prácticas de laboratorio (BPL), pero también podrán utilizarse datos obtenidos a partir de otros métodos de ensayo, como los métodos nacionales, cuando se consideren equivalentes (véanse 4.1.1.2.2 y A9.3.2 del anexo 9).

<sup>6</sup> Véase la figura 4.1.1.

<sup>7</sup> Seguir el diagrama de flujo en los dos sentidos y elegir la clasificación más severa.

<sup>8</sup> Obsérvese que el sistema introduce también una clasificación de tipo "red de seguridad" (denominada categoría Crónica 4) que puede utilizarse cuando los datos disponibles no permiten clasificar la sustancia con arreglo a los criterios establecidos, pero persiste algún motivo de preocupación.

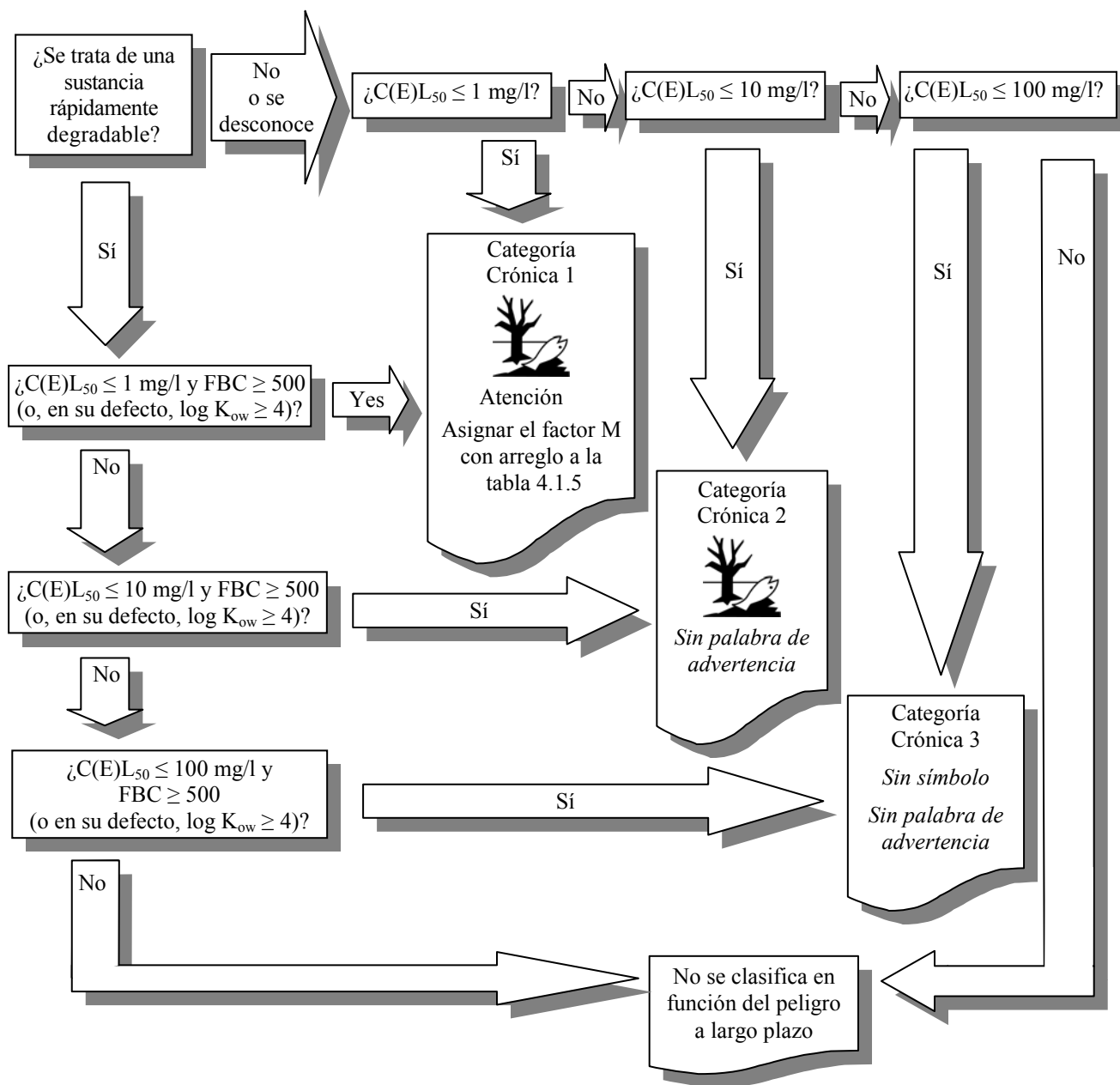
4.1.5.2.2 Procedimiento de decisión 4.1.3 b) para sustancias (cuando se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica para los tres niveles tróficos)<sup>5</sup>



(Continúa en la página siguiente)

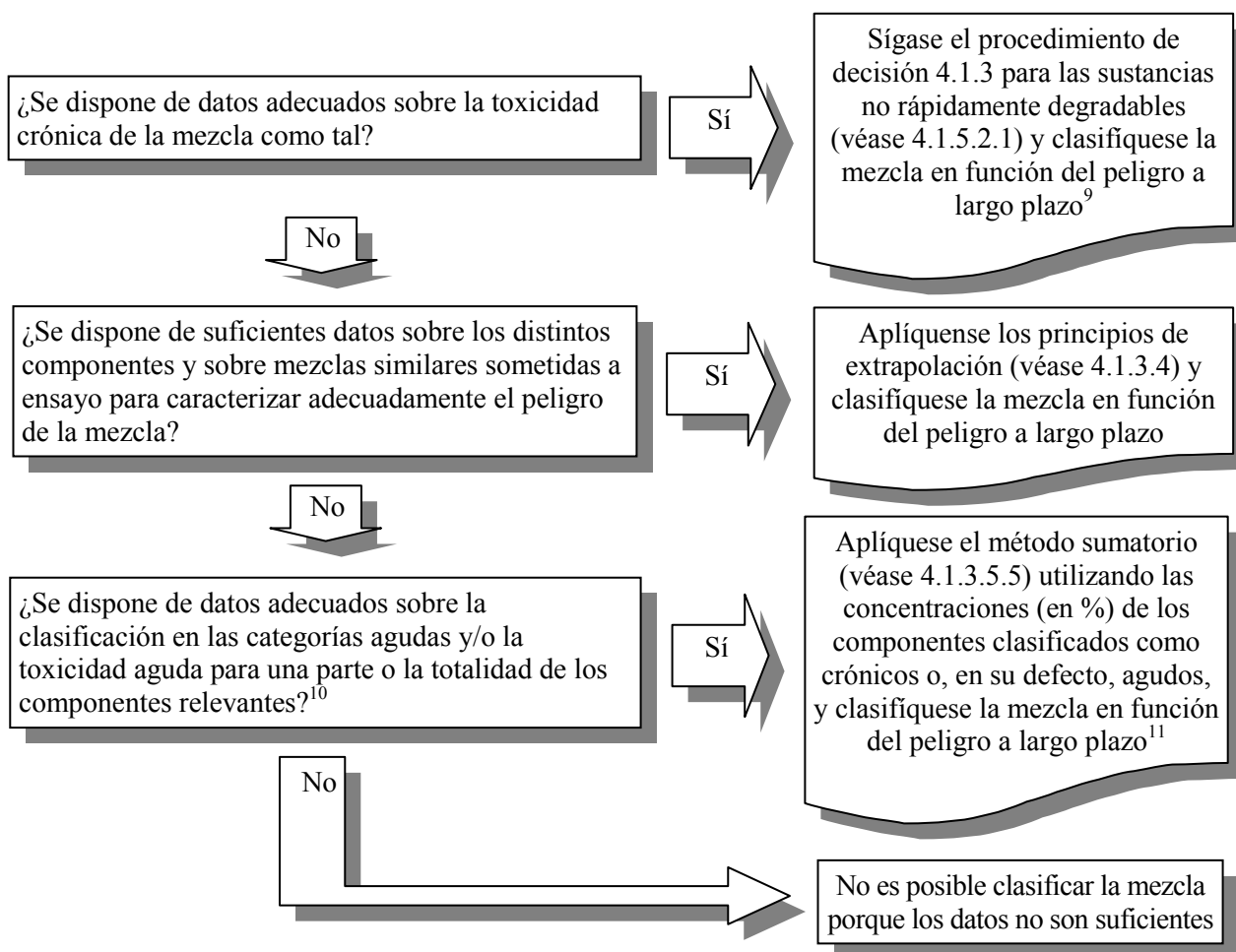
<sup>5</sup> Los datos deberán obtenerse utilizando preferentemente métodos de ensayo internacionalmente armonizados (por ejemplo, las Directrices de ensayo de la OCDE u otras equivalentes) y de conformidad con los principios de las buenas prácticas de laboratorio (BPL), pero también podrán utilizarse datos obtenidos a partir de otros métodos de ensayo, como los métodos nacionales, cuando se consideren equivalentes (véanse 4.1.1.2.2 y A9.3.2 del anexo 9).

4.1.5.2.3 Procedimiento de decisión 4.1.3 c) para sustancias (cuando no se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica para los tres niveles tróficos)<sup>5</sup>



<sup>5</sup> Los datos deberán obtenerse utilizando preferentemente métodos de ensayo internacionalmente armonizados (por ejemplo, las Directrices de ensayo de la OCDE u otras equivalentes) y de conformidad con los principios de las buenas prácticas de laboratorio (BPL), pero también podrán utilizarse datos obtenidos a partir de otros métodos de ensayo, como los métodos nacionales, cuando se consideren equivalentes (véanse 4.1.1.2.2 y A9.3.2 del anexo 9).

#### 4.1.5.2.4 Procedimiento de decisión 4.1.4 para mezclas



<sup>9</sup> Los ensayos de la degradabilidad y la bioacumulación no se utilizan para las mezclas porque normalmente son difíciles de interpretar y sólo son significativos para las sustancias individuales. Por consiguiente, se considera por defecto que la mezcla no es rápidamente degradable. Sin embargo, si la información disponible permite concluir que todos los componentes relevantes de la mezcla son rápidamente degradables, la mezcla puede, para fines de clasificación, considerarse rápidamente degradable.

<sup>10</sup> Si no se dispone de información útil sobre la toxicidad acuática aguda y/o crónica de uno o más componentes relevantes, se concluye que la mezcla no puede asignarse a una o más categorías de peligro definitivas. En esta situación, la mezcla debe clasificarse sobre la base de los componentes conocidos solamente, añadiendo la declaración de que: "el x% de la mezcla consiste en componentes cuyos peligros para el medio ambiente acuático se desconocen". La autoridad competente podrá decidir que la declaración adicional figure en la etiqueta o en la FDS, o en ambas, o bien dejar que sea el fabricante/proveedor quien elija el lugar donde haya de aparecer.

<sup>11</sup> Cuando se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad de más de un componente de la mezcla, la toxicidad combinada de esos componentes puede calcularse utilizando las fórmulas de adición a) o b) del párrafo 4.1.3.5.2, según la naturaleza de los datos sobre la toxicidad. La toxicidad calculada puede utilizarse para asignar esa fracción de la mezcla a una categoría de peligro agudo o a largo plazo, que se utiliza posteriormente al aplicar el método sumatorio. (Es preferible calcular la toxicidad de esa parte de la mezcla utilizando para cada componente un valor de toxicidad que se refiera al mismo grupo taxonómico (por ejemplo peces, crustáceos o algas) seleccionando a continuación la toxicidad más elevada (valor más bajo) que se haya obtenido (es decir, utilizando el grupo más sensible de los tres) (véase 4.1.3.5.3))

## CAPÍTULO 4.2

### PELIGROS PARA LA CAPA DE OZONO

#### 4.2.1 Definiciones

El *potencial de agotamiento* del ozono es un valor integrado, distinto para cada especie fuente de halocarburo, que representa la medida en que el halocarburo puede reducir el ozono en la estratosfera, expresada en relación con el efecto que tendría la misma masa de CFC-11. La definición oficial del potencial de agotamiento del ozono es la relación entre las perturbaciones integradas y el ozono total, para una diferencia de emisión de masa de un compuesto dado en comparación con una emisión equivalente de CFC-11.

El *Protocolo de Montreal* es el Protocolo de Montreal relativo a las sustancias que agotan el ozono en su forma ajustada y/o enmendada por las Partes en el Protocolo.

#### 4.2.2 Criterios de clasificación<sup>1</sup>

Las sustancias o mezclas se clasificarán en la Categoría 1 si cumplen los criterios que se indican en la siguiente tabla:

**Tabla 4.2.1: Criterios aplicables a las sustancias y mezclas peligrosas para la capa de ozono**

Categoría	Criterios
1	Cualquiera de las sustancias controladas que se enumeran en los anexos del Protocolo de Montreal; o cualquier mezcla que contenga por lo menos uno de los componentes enumerados en los anexos del Protocolo de Montreal, en una concentración $\geq 0,1\%$

#### 4.2.3 Comunicación de peligros

Las consideraciones generales y específicas sobre los requisitos de etiquetado figuran en el capítulo 1.4, *Comunicación de peligros: Etiquetado*. En el anexo 2 figuran tablas resumen de clasificación y etiquetado. En el anexo 3 se dan ejemplos de los consejos de prudencia y los pictogramas de precaución que pueden utilizarse cuando la autoridad competente lo autorice.

**Tabla 4.2.2: Elementos de la etiqueta que se aplican a las sustancias y mezclas peligrosas para la capa de ozono**

	Categoría 1
<b>Símbolo</b>	Signo de exclamación
<b>Palabra de advertencia</b>	Atención
<b>Indicación de peligro</b>	Causa daños a la salud pública y el medio ambiente al destruir el ozono en la atmósfera superior

<sup>1</sup> Los criterios que se dan en el presente capítulo se aplican tanto a las sustancias como a las mezclas. Los criterios no se aplican a equipos, objetos o aparatos (como el equipo de refrigeración o aire acondicionado) que contienen sustancias peligrosas para la capa de ozono. En consonancia con lo dispuesto en 1.1.2.5 a) iii) sobre los productos farmacéuticos, los criterios de clasificación y etiquetado del SGA no se aplican a los aerosoles de uso médico, cuya inhalación es voluntaria.

de sustancias estructuralmente similares, justifica la clasificación. En el SGA, hay tres categorías de sustancias corrosivas. Es cierto que los datos no se ajustan fácilmente a los criterios, pero la Categoría 1C resultaría apropiada, ya que las lesiones necróticas observadas se produjeron después de un período de exposición de cuatro horas. No hay información que sugiera que exposiciones bastante más breves puedan producir corrosión cutánea.

<b>Especie</b>	<b>Número de animales</b>	<b>Tiempo de exposición (h)</b>	<b>Concentración (% p/p)</b>	<b>Vendaje (cerrado, semicerrado, abierto)</b>	<b>Observaciones y comentarios (especifíquese el grado y la índole de la irritación y la reversibilidad)</b>	<b>Ref.</b>
Conejo	6	4	0,5 ml de 100 %	Cerrado	No se observaron signos de irritación en un animal, y sólo un eritema ligero (grado 1) en otro en el día 1, que se había resuelto en el día 7. Cuatro animales mostraron un eritema entre suave y moderado (grado 1-2) y un edema entre suave y acusado (grado 1-3) después de levantar el vendaje. El edema se había resuelto en el día 7 siguiente a la exposición. Se observó «necrosis» en la zona de aplicación en tres conejos de seis desde el día 1 hasta el final del período de observación del día 7. En cuatro de seis conejos se observó una descamación en el día 7.	8
Conejo (albino)	5	24	100 % (volumen no indicado)	No indicado	En este estudio, del que no se ha hecho un informe completo, se encontró poco o ningún signo de irritación cutánea.	2

#### **A8.4.3 Lesiones oculares graves/irritación ocular**

El único estudio disponible se refería a la exposición de conejos a cantidades de la sustancia comprobada considerablemente inferiores a las recomendadas para los protocolos normalizados existentes a este efecto. Se observaron efectos relativamente severos (por ejemplo, inflamación conjuntiva del grado 3) pero reversibles. Es muy probable que en condiciones normales de ensayo los efectos sobre el ojo serían muy graves y se justificaría, por tanto, una clasificación en la Categoría 1 del SGA (efectos irreversibles en el ojo).

<b>Especie</b>	<b>Número de animales</b>	<b>Concentración (% p/p)</b>	<b>Observaciones y comentarios (especifíquese el grado y la índole de la irritación, cualquier lesión grave y la reversibilidad)</b>	<b>Ref.</b>
Conejo	6	0,005 ml de 100 %	Se observó una inflamación conjuntiva (grado 3) con secreción (grado 2,8) una hora después de la instilación. Los índices medios a 24, 48 y 72 horas de opacidad córnea, iris, inflamación conjuntiva, quemosis y secreción fueron todos ellos aproximadamente de 0,5. Todas las lesiones habían desaparecido el día 7.	8
Conejo	60	1 y 5 %	La información encontrada en fuentes secundarias según la cual se habrían observado lesiones oculares graves en conejos después de la instilación de una cantidad no precisada de una disolución al 5 %, no se ha podido corroborar, ya que esa información no figuraba en el texto de referencia mencionado.	1



**A8.4.4      *Sensibilización cutánea y respiratoria***

No se dispone de datos. No hay motivos adicionales de preocupación (por ejemplo, relaciones estructura-actividad) y no se propone clasificación alguna.

**A8.4.5      *Toxicidad específica de órganos diana (exposición única o repetida)*****A8.4.5.1      *Toxicidad tras una exposición única***

No se dispone de información fiable sobre el potencial de esta sustancia para producir una toxicidad no mortal y específica de órganos diana, tras una exposición única. Por lo tanto, no se propone clasificar la sustancia en la categoría de toxicidad específica de órganos diana tras una exposición única.

**A8.4.5.2      *Toxicidad tras una exposición repetida*****A8.4.5.2.1      Toxicidad por ingestión**

No se dispone de estudios sobre toxicidad por ingestión en caso de exposición repetida ni hay información sobre los humanos, por lo que no se propone una clasificación.

**A8.4.5.2.2      Inhalación**

No se encontraron efectos tóxicos adversos en un estudio de 13 semanas en ratas sobre toxicidad por inhalación de 0,43 mg/l (aproximadamente 72 ppm), es decir, con un nivel de exposición cercano a la concentración de vapor saturado. No está justificada clasificación alguna con arreglo a los criterios del SGA.

<b>Especie</b>	<b>Conc. mg/l</b>	<b>Tiempo de exposición (h)</b>	<b>Duración del tratamiento</b>	<b>Observaciones y comentarios (especifíquese el tamaño del grupo, la DSEO, y los efectos tóxicos importantes)</b>	<b>Ref.</b>
Rata (F344) 20/sexo/grupo (más 10/sexo/grupo-grupo de recuperación de cuatro semanas)	0,12, 0,24 y 0,425	6	5 d/sem. durante 13 semanas	No hubo muertes. Se observó una disminución del incremento de peso en animales de ambos sexos expuestos a dosis elevadas y en hembras expuestas a dosis medias. No hubo cambios toxicológicamente apreciables en los parámetros de la sangre o la orina. Las hembras expuestas a dosis altas mostraron un aumento de la fosfatasa alcalina. Los machos expuestos a dosis altas y medias presentaron un incremento estadísticamente significativo en el peso absoluto y relativo de los riñones. En las hembras sometidas a dosis altas se observó un pequeño aumento del peso absoluto del hígado (12 %) . No obstante, no se encontraron cambios macroscópicos o histopatológicos en ninguno de los órganos examinados.	3

**A8.4.5.2.3 Toxicidad cutánea**

En conejos expuestos a una dosis de 444 mg/kg por vía cutánea durante 11 días se observaron modificaciones hematológicas no cuantificadas. No obstante, debido a la limitada información suministrada, no cabe extraer conclusiones de ese estudio y no se propone una clasificación.

Especie	Dosis (mg/kg)	Tiempo de exposición (h)	Duración del tratamiento	Observaciones y comentarios (especifíquese el tamaño del grupo, la DSEO, y los efectos toxicológicos importantes)	Ref.
Conejo	0, 44, 222 y 444	6	9 dosis aplicadas en 11 días	Se trata de un estudio inédito señalado en fuentes secundarias. En animales que recibieron la dosis máxima se advirtieron disminuciones no cuantificadas de los parámetros hematológicos. No se describieron efectos locales.	1

**A8.4.6 Carcinogenicidad (incluidos estudios de toxicidad crónica)**

No se dispone de datos, así que no se propone una clasificación.

**A8.4.7 Mutación de células germinales**

En ensayos de Ames *in vitro* de citogenética y de mutación génica, señalados en fuentes secundarias, se han obtenido resultados negativos. No se dispone de datos *in vivo*. La información no justifica la clasificación.

**Estudios *in vitro***

Ensayo	Tipo de células	Rango de concentración	Observaciones y comentarios	Ref.
Ames	Salmonela (cepas no indicadas)	0,3-15 mg/placa	<b>Negativo</b> , en presencia y ausencia de activación metabólica. Se trata de un estudio inédito descrito en una fuente secundaria y no se dispone de más información.	5
IVC	CHO	0,1-0,8 mg/ml (-S9), 0,08-0,4 mg/ml (+S9)	<b>Negativo</b> , en presencia y ausencia de activación metabólica. Se trata de un estudio inédito descrito en una fuente secundaria y no se dispone de más información.	6
Mutación génica	CHO	No se indica	<b>Negativo</b> . Se trata de un estudio inédito descrito en una fuente secundaria y no se dispone de más información.	7
SCE	CHO	No se indica	<b>Negativo</b> . Se trata de un estudio inédito descrito en una fuente secundaria y no se dispone de más información.	7

**A8.4.8 Toxicidad para la reproducción-fertilidad**

No se dispone de datos y no se propone una clasificación.

**A8.4.9 Toxicidad para la reproducción**

No hubo pruebas de toxicidad para la reproducción en ratas o conejos después de inhalación de dosis que causan una ligera toxicidad materna. Hay que señalar que aunque sustancias relacionadas de cadena más corta se clasifican en la categoría de toxicidad para la reproducción, esta toxicidad disminuye al aumentar la longitud de la cadena. Por tanto, no hay pruebas de este peligro. No se propone una clasificación.

Especie	Vía	Dosis	Exposición	Observaciones y comentarios	Ref.
Rata	Inhalación	21, 41 y 80 ppm (0,12, 0,24 y 0,48 mg/l)	Días 6 a 15 de la gestación	La sustancia se probó hasta una concentración cercana a la concentración de vapor saturado.  En los grupos que recibieron una dosis entre media y alta durante el período de exposición se observó una disminución del peso corporal de las hembras, asociada a una disminución del consumo de alimentos. No hubo signos de toxicidad para la reproducción.	4
Conejo	Inhalación	21, 41 y 80 ppm (0,12, 0,24 y 0,48 mg/l)	Días 6 a 18 de la gestación	La sustancia se comprobó hasta con un valor cercano a la concentración de vapor saturado.  En animales sometidos a dosis altas se observó una disminución del peso absoluto del cuerpo durante el período de exposición. No hubo signos de toxicidad para la reproducción.	4

### A8.5 Referencias

1. Patty, F. (Ed.) (1994). Industrial Hygiene and Toxicology. 4<sup>a</sup> ed. Nueva York: Wiley-Interscience.
2. Smyth, H.F., Carpenter, C.P., Weil, C.S. y Pozzoni, U.S. (1954). Range finding toxicity data. *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.*
3. Fasey, Headrick, Silk y Sundquist (1987). Acute, 9-day, and 13-week vapour inhalation studies on Globalene Hazexyl Systemol. *Fundamental and Applied Toxicology*.
4. Wyeth, Gregor, Pratt y Obadia (1989). Evaluation of the developmental toxicity of Globalene Hazexyl Systemol in Fischer 344 rats and New Zealand White rabbits. *Fundamental and Applied Toxicology*.



## **ANEXO 9**

# **GUÍA DE LOS PELIGROS PARA EL MEDIO AMBIENTE ACUÁTICO**



## Anexo 9

# GUÍA DE LOS PELIGROS PARA EL MEDIO AMBIENTE ACUÁTICO

## Índice

## Página

<b>A9.1</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>499</b>
<b>A9.2</b>	<b>El esquema de clasificación armonizado .....</b>	<b>503</b>
A9.2.1	Alcance.....	503
A9.2.2	Categorías y criterios de clasificación.....	503
A9.2.3	Razón de ser .....	503
A9.2.4	Aplicación .....	505
A9.2.5	Disponibilidad de datos.....	506
A9.2.6	Calidad de los datos.....	506
<b>A9.3</b>	<b>Toxicidad acuática .....</b>	<b>507</b>
A9.3.1	Introducción .....	507
A9.3.2	Descripción de los ensayos .....	507
A9.3.3	Conceptos de toxicidad acuática .....	509
A9.3.4	El peso de la evidencia.....	512
A9.3.5	Sustancias difíciles de someter a ensayo.....	512
A9.3.6	Interpretación de la calidad de los datos .....	518
<b>A9.4</b>	<b>Degradación .....</b>	<b>519</b>
A9.4.1	Introducción .....	519
A9.4.2	Interpretación de los datos de degradabilidad.....	519
A9.4.3	Problemas generales de interpretación.....	524
A9.4.4	Esquema de la toma de decisiones.....	527
<b>A9.5</b>	<b>Bioacumulación .....</b>	<b>528</b>
A9.5.1	Introducción .....	528
A9.5.2	Interpretación de los datos de bioconcentración.....	529
A9.5.3	Clases de productos químicos que necesitan atención especial respecto de los valores del FBC y de $K_{ow}$ .....	533
A9.5.4	Datos contradictorios y ausencia de datos.....	534
A9.5.5	Esquema de la toma de decisiones.....	535
<b>A9.6</b>	<b>Utilización de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) .....</b>	<b>536</b>
A9.6.1	Historia.....	536
A9.6.2	Anomalías experimentales que causan una subestimación del peligro.....	536
A9.6.3	Problemas de los modelos QSAR .....	537
A9.6.4	Utilización de las QSAR en la clasificación de los peligros acuáticos .....	538
<b>A9.7</b>	<b>Clasificación de metales y compuestos metálicos.....</b>	<b>542</b>
A9.7.1	Introducción .....	542
A9.7.2	Aplicación de los datos de toxicidad acuática y solubilidad a la clasificación .....	544
A9.7.3	Evaluación de la transformación en el medio ambiente.....	545
A9.7.4	Bioacumulación.....	546
A9.7.5	Aplicación de los criterios de clasificación a metales y compuestos metálicos.....	546

**Índice** (*continuación*)

	<b>Página</b>
<b>Apéndice I</b>	<b>Determinación de la degradabilidad de las sustancias orgánicas ..... 553</b>
<b>Apéndice II</b>	<b>Factores que influyen en la degradabilidad en el medio ambiente acuático ..... 559</b>
<b>Apéndice III</b>	<b>Principios básicos de los métodos experimentales y de estimación para determinar el FBC y el <math>K_{ow}</math> de sustancias orgánicas..... 565</b>
<b>Apéndice IV</b>	<b>Influencia de factores externos e internos en el potencial de bioconcentración de sustancias orgánicas..... 571</b>
<b>Apéndice V</b>	<b>Directrices para los ensayos ..... 575</b>
<b>Apéndice VI</b>	<b>Referencias..... 579</b>



## Anexo 9

# GUÍA DE LOS PELIGROS PARA EL MEDIO AMBIENTE ACUÁTICO<sup>1</sup>

### A9.1 Introducción

A9.1.1 Al desarrollar el conjunto de criterios para identificar las sustancias que entrañan un peligro para el medio ambiente acuático, se convino en que el detalle necesario para definir con propiedad ese peligro obligaba a un sistema complejo donde serían necesarias algunas indicaciones adecuadas. Por lo tanto, el propósito del presente documento es doble:

- a) Describir el sistema e indicar su funcionamiento;
- b) Proporcionar una guía para interpretar los datos que se usan al aplicar los criterios de clasificación.

A9.1.2 El sistema de clasificación de peligros se ha preparado con el objeto de identificar las sustancias que presentan, en razón de sus propiedades intrínsecas, un peligro para el medio ambiente acuático. En ese contexto, por medio ambiente acuático se entiende los ecosistemas acuáticos marinos y de agua dulce y los organismos que allí viven. Para casi todas las sustancias, la mayoría de los datos disponibles se refiere a ese compartimiento ambiental. La definición tiene un alcance limitado, ya que todavía no comprende los sedimentos acuáticos ni los organismos superiores situados en el extremo superior de la red trófica acuática, aunque estos últimos, hasta cierto punto, puedan quedar cubiertos por los criterios seleccionados.

A9.1.3 Aunque su alcance sea limitado, está muy aceptado que ese compartimiento es doblemente vulnerable, porque constituye el medio receptor final de muchas sustancias nocivas y porque los organismos que viven en él son sensibles. Es también complejo, ya que todo sistema que procure identificar los peligros para el medio ambiente ha de intentar definir esos efectos en términos del impacto más amplio sobre los ecosistemas, más que sobre los ejemplares de una especie o población. Tal como se describirá en detalle en las secciones siguientes, se ha seleccionado un conjunto limitado de propiedades específicas de sustancias a través de las cuales se puede describir mejor el peligro; a saber, toxicidad acuática aguda, toxicidad acuática crónica, ausencia de degradabilidad y bioacumulación potencial o real. En la sección A9.2 se explicará con mayor detalle por qué se han seleccionado esos datos para definir el peligro acuático.

A9.1.4 El presente anexo se limita, en esta fase, a la aplicación de los criterios a las sustancias. Con el término sustancia se abarca una amplia gama de productos químicos, de los que muchos plantean retos difíciles a un sistema de clasificación basado en criterios rígidos. Las secciones siguientes proporcionan así algunas orientaciones sobre cómo afrontar esos desafíos apoyándose tanto en la experiencia práctica como en argumentos científicos claros. Si bien los criterios armonizados se aplican más fácilmente a la clasificación de sustancias individuales de estructura definida (véanse las definiciones en los capítulos 1.2 y 3.10), algunas materias que corresponden a esa categoría se denominan con frecuencia “mezclas complejas”. En casi todos los casos, pueden caracterizarse como una serie homóloga de sustancias con un rango de longitud de la cadena de carbono y del número o grado de sustitución. Se han desarrollado metodologías especiales de ensayo que proporcionan datos para evaluar la peligrosidad intrínseca para organismos acuáticos, la bioacumulación y la degradación. En las diferentes secciones sobre esas propiedades se ofrecen más indicaciones. A los efectos del presente documento guía, esas materias se designarán como “sustancias complejas” o “sustancias multi-componentes”.

---

<sup>1</sup> *Publicaciones de la OCDE sobre el medio, la salud y la seguridad, Serie sobre ensayos y evaluaciones, N° 27, Dirección del Medio Ambiente, Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos, abril de 2001.*

A9.1.5 Cada una de esas propiedades (a saber, toxicidad acuática aguda, toxicidad acuática crónica, degradabilidad, bioacumulación) puede presentar problemas de interpretación complejos, incluso a los expertos. Si bien existen pautas sobre los ensayos internacionalmente convenidos que deberían seguirse para todos y cada uno de los datos nuevos producidos, muchos de los que se usan en la clasificación no se habrán generado con arreglo a esos ensayos normalizados. Incluso cuando se hayan realizado éstos, algunas sustancias, como las complejas, las inestables en disolución acuosa, los polímeros, etc., presentan complejos problemas de interpretación al usarse como parte del sistema de clasificación. Se dispone así de datos para una gran variedad de organismos de ensayo normalizados y no normalizados, tanto marinos como de agua dulce, de duración y efectos variables. Los datos sobre degradación pueden ser bióticos o abióticos y variar en su importancia para el medio ambiente. En muchos productos químicos orgánicos, el potencial de bioacumulación podrá indicarse por el coeficiente de reparto octanol-agua. Ese potencial, sin embargo, puede verse afectado por muchos factores, que deberán también tenerse presentes.

A9.1.6 El objetivo de un sistema globalmente armonizado es claramente que, habiendo convenido un conjunto común de criterios, habría que utilizar también un conjunto de datos comunes para que una vez hecha la clasificación se acepte globalmente. Para que eso ocurra debe haber primero una comprensión común del tipo de datos que se pueden usar al aplicar los criterios, tanto en su naturaleza como en su calidad, y después una interpretación común de los datos al medirse con arreglo a los criterios. Por tal motivo, se ha considerado necesario desarrollar un documento guía transparente que procure expandir y explicar los criterios de tal modo que pueda lograrse una comprensión común de su razón de ser y un enfoque también común de la interpretación de los datos. Esto reviste particular importancia, ya que todo sistema armonizado aplicado al “universo de productos químicos” se basará principalmente en la propia clasificación de fabricantes y proveedores, clasificaciones que tienen que aceptarse en el plano internacional, sin ser siempre objeto de un examen riguroso por las autoridades encargadas de la reglamentación. El presente documento guía, por tanto, intenta informar al lector en varios ámbitos fundamentales y guiarle así de manera coherente en la clasificación, garantizando de ese modo un sistema realmente armonizado y autónomo.

A9.1.7 En primer lugar, se hará una descripción detallada de los criterios, se explicará la razón de haberlos seleccionado y se pasará revista a cómo el sistema funcionará en la práctica (sección A9.2). Dicha sección tratará de las fuentes comunes de datos, de la necesidad de aplicar criterios de calidad, de cómo hacer la clasificación cuando el conjunto de datos sea incompleto o cuando una serie cuantiosa de datos conduzca a una clasificación ambigua, y de otros problemas que se suelen encontrar al efectuar la clasificación.

A9.1.8 En segundo término, se facilitarán consejos técnicos detallados sobre la interpretación de datos obtenidos a partir de bases de datos disponibles, incluido cómo usar datos no normalizados y cómo aplicar los criterios de calidad a las diferentes propiedades. Se describirán y se aconsejarán las soluciones adecuadas a los problemas de interpretación de datos sobre “sustancias difíciles”, es decir, aquellas a las que los métodos de ensayo normalizados o bien no se aplican o bien suscitan complejos problemas de interpretación. Se insistirá en la interpretación de los datos, más bien que en los ensayos, ya que el sistema se basará en todo lo posible en los mejores datos disponibles y en los que se requieren a efectos de regulación. Las cuatro propiedades principales, esto es, toxicidad acuática aguda y crónica (sección A9.3), degradabilidad (sección A9.4) y bioacumulación (sección A9.5), se tratarán por separado.

A9.1.9 El abanico de problemas de interpretación puede ser amplio y, en consecuencia, la interpretación se basará siempre en la capacidad y los conocimientos de las personas encargadas de efectuar la clasificación. No obstante, es posible identificar algunas dificultades habituales y proporcionar una orientación que corresponda a la opinión aceptada de los expertos y que puede servir de ayuda para lograr un resultado fiable y coherente. Esas dificultades pueden agruparse en varias categorías que se solapan entre sí:

- a) La dificultad de aplicar los procedimientos de ensayo corrientes a algunos tipos de sustancia;
- b) La dificultad de interpretar los datos obtenidos tanto de esas sustancias “difíciles de someter a ensayo” como de otras;
- c) La dificultad de interpretar conjuntos de datos diferentes cuando proceden de una gran variedad de fuentes.

A9.1.10 En muchas sustancias orgánicas, los ensayos y la interpretación de datos no presentan problemas cuando se aplican tanto las directrices pertinentes de la OCDE como los criterios de clasificación. Sin embargo, hay varios problemas típicos de interpretación que cabe caracterizar con arreglo al tipo de sustancias sobre las que versan los estudios. Tales sustancias suelen denominarse “sustancias difíciles”.

- a) sustancias poco solubles: son sustancias difíciles de someter a ensayo porque presentan problemas en la preparación de las soluciones y en el mantenimiento y verificación de las concentraciones durante los ensayos de toxicidad acuática. Además, muchos de los datos disponibles para esas sustancias se han obtenido con “soluciones” con concentraciones superiores a la solubilidad en agua, lo que se ha traducido en grandes problemas de interpretación para definir la verdadera C(E)L<sub>50</sub> o CSEO a efectos de clasificación. La interpretación del coeficiente de reparto también puede ser problemática cuando la baja solubilidad en agua y octanol se agrave por sensibilidad insuficiente del método analítico. La solubilidad en agua puede ser difícil de determinar y muchas veces se registra como “inferior al límite de detección”, lo que crea problemas al interpretar los estudios de toxicidad acuática y bioacumulación. En los ensayos de biodegradación, la baja solubilidad puede traducirse en una escasa biodisponibilidad y ser, por tanto, inferior a las tasas de biodegradación esperadas. El método específico de ensayo o la selección de procedimientos pueden revestir así una importancia crucial;
- b) sustancias inestables: las sustancias que se degradan (o reaccionan) rápidamente en condiciones experimentales de ensayo presentan problemas tanto experimentales como de interpretación. Será necesario determinar si se ha empleado la metodología correcta, si el ensayo ha versado sobre la sustancia o bien sobre el producto de degradación/reacción y si los datos obtenidos son relevantes para clasificar la sustancia parental;
- c) sustancias volátiles: las sustancias de esa índole que puedan presentar claramente problemas de ensayo al utilizarse en sistemas abiertos deberían evaluarse para asegurar un mantenimiento adecuado de las concentraciones de exposición. La pérdida de parte de la sustancia durante los ensayos de biodegradación es inevitable cuando se utilizan ciertos métodos de ensayo, lo que hará que se interpreten incorrectamente los resultados;
- d) sustancias complejas o "multi-componentes": estas sustancias, por ejemplo las mezclas de hidrocarburos, muchas veces no pueden disociarse en una disolución homogénea y los componentes múltiples hacen imposible un control. Habrá, por tanto, que considerar el empleo de los datos obtenidos de partes solubles en agua (*Water Accomodated Fractions*-WAF) y la utilización de esos datos en el esquema de clasificación. La biodegradación, la bioacumulación, el coeficiente de reparto y la solubilidad en agua son todos ellos aspectos que presentan problemas de interpretación, donde cada componente de la mezcla puede comportarse de manera diferente;
- e) polímeros: estas sustancias frecuentemente presentan un amplio rango de masas moleculares, de las que sólo una parte son solubles en agua. Se cuenta con métodos especiales para determinar la fracción hidrosoluble y esa información tendrá que usarse para interpretar los datos de los ensayos con arreglo a los criterios de clasificación;
- f) compuestos inorgánicos y metales: estas sustancias, que pueden interactuar con el medio, pueden producir toxicidad acuática variable a tenor de factores tales como el pH, la dureza del agua, etc. También suscitan complejos problemas de interpretación los ensayos de elementos esenciales que son beneficiosos a ciertos niveles. En los metales y los compuestos metálicos inorgánicos, el concepto de degradabilidad, tal como se aplica a los compuestos orgánicos, tiene poco o ningún significado. Del mismo modo, el uso de datos de bioacumulación ha de hacerse con cautela;

- g) sustancias tensioactivas: las sustancias de este tipo pueden formar emulsiones donde es difícil discernir la biodisponibilidad, incluso con una cuidadosa preparación de las soluciones. La formación de micelas puede traducirse en una sobreestimación de la fracción biodisponible, aun cuando se formen aparentemente “soluciones”. Eso plantea bastantes problemas de interpretación en los estudios sobre cada una de las características de solubilidad en agua, coeficiente de reparto, bioacumulación y toxicidad acuática;
- h) sustancias ionizables: son sustancias que pueden cambiar el alcance de la ionización según el nivel de contra-iones en el medio. Los ácidos y las bases, por ejemplo, tendrán un coeficiente de reparto radicalmente distinto en función del pH;
- i) sustancias coloreadas: estas sustancias pueden causar problemas en los ensayos de algas y plantas acuáticas, por apantallamiento de la luz incidente;
- j) impurezas: algunas sustancias contienen impurezas cuyo porcentaje y naturaleza química varían entre los lotes de producción. Pueden surgir problemas de interpretación cuando o bien la toxicidad o bien la solubilidad en agua de las impurezas o ambas a la vez sean superiores a las de la sustancia parental, lo que se presta a influir en los datos de toxicidad de un modo significativo.

A9.1.11 Esos son algunos de los problemas con que se tropieza al establecer la idoneidad de los datos, su interpretación y su aplicación al esquema de clasificación. En las secciones siguientes se dan orientaciones detalladas sobre cómo abordar esos problemas, así como otras cuestiones. La interpretación de los datos de toxicidad acuática aguda y crónica se tratará en la sección A9.3. Se hablará de los problemas específicos de interpretación que suscitan las “sustancias difíciles” citadas, facilitándose algún asesoramiento sobre cuándo y cómo esos datos pueden usarse en el sistema de clasificación. También se hará una descripción general de los datos de los ensayos usados y de las metodologías adecuadas para producirlos.

A9.1.12 Se dispone de toda una serie de datos sobre degradación que han de interpretarse con arreglo a los criterios de degradabilidad rápida. Se necesita así una orientación sobre cómo usar esos datos obtenidos empleando métodos de ensayo no normalizados, incluyendo el uso, cuando estén disponibles, de datos de vidas medias de degradación primaria, tasas de degradación en el suelo y su idoneidad para la extrapolación a las tasas de degradación acuática y tasas de degradación medioambiental. También se hace una breve descripción de las técnicas de estimación para evaluar la degradabilidad en relación con los criterios de clasificación. Esa guía figura en la sección A9.4.

A9.1.13 En la sección A9.5 se describen los métodos con los que cabe determinar el potencial de bioacumulación. En ella figura la relación entre los criterios del coeficiente de reparto y el factor de bioconcentración (FBC), se dan directrices para interpretar los datos existentes y estimar el coeficiente de reparto mediante el empleo de las QSAR cuando no se dispone de datos experimentales, y en particular se abordan los problemas específicos mencionados precedentemente para las sustancias difíciles. También se tratan los problemas que se encuentran en las sustancias de masa molecular alta.

A9.1.14 Otra sección está dedicada a cuestiones generales sobre el empleo de las QSAR en el sistema, es decir, cuándo y cómo usar esas relaciones en cada una de las tres propiedades examinadas. Como planteamiento general, está muy aceptado que deberían utilizarse los datos experimentales, mejor que los de las QSAR, cuando se disponga de ellos. El empleo de los segundos se verá así limitado a cuando no se tengan datos fiables. No todas las sustancias se prestan a una aplicación de las estimaciones de las QSAR, sin embargo, y las indicaciones de la sección A9.6 están dedicadas a ese extremo.

A9.1.15 Por último, hay una sección sobre los problemas especiales que entraña la clasificación de metales y sus compuestos. Claramente, en esos compuestos no cabe aplicar varios de los criterios específicos tales como la biodegradabilidad y el coeficiente de reparto octanol-agua, aunque el principio de ausencia de destrucción por medio de la degradación y la bioacumulación siguen siendo conceptos importantes. Resulta así necesario adoptar un planteamiento diferente. Los metales y sus compuestos pueden sufrir interacciones con el medio que afectan a la solubilidad del ión metálico, a su reparto en el agua y a las especies de ión metálico que existen en ésta. En el agua son generalmente los iones metálicos disueltos los que intervienen

en la toxicidad. La interacción de la sustancia con el medio puede tanto aumentar como disminuir el nivel de los iones y por ende la toxicidad. Resultará así necesario considerar si es probable que se formen iones metálicos a partir de la sustancia y se disuelvan en el agua, y de ser así si se forman con la suficiente rapidez para ser un motivo de preocupación. En la sección A9.7 se presenta un esquema para interpretar los resultados de ese tipo de estudio.

A9.1.16 Si bien el documento guía proporciona consejos útiles sobre cómo aplicar los criterios a una gran variedad de situaciones, no deja de ser sólo una orientación. No cabe esperar que abarque todas las situaciones que se suscitan en la clasificación. Debería, por tanto, contemplarse como un documento vivo que en parte describe los principios fundamentales del sistema, por ejemplo basándose en los peligros más que en el riesgo, y los criterios fijados. También es, en parte, un repertorio de la experiencia acumulada en la utilización del esquema, de tal modo que comprende las interpretaciones que permiten que los criterios aparentemente fijos se apliquen a toda una gama de situaciones no normalizadas.

## **A9.2 El esquema de clasificación armonizado**

### **A9.2.1 Alcance**

Los criterios se desarrollaron teniendo presentes los sistemas existentes de clasificación de peligros, tales como el europeo sobre suministro y utilización de sustancias químicas, los sistemas canadiense y estadounidense sobre plaguicidas, el procedimiento de evaluación de peligros del GESAMP, el dispositivo de la OMI aplicable a los contaminantes marinos, el esquema europeo de transporte por carretera y ferrocarril (RID/ADR) y el *Land Transport Scheme* de los Estados Unidos. Esos sistemas comprenden el suministro y uso posterior de productos químicos, y su transporte por mar, carretera y ferrocarril. Los criterios armonizados se proponen, por tanto, identificar de un modo común las sustancias químicas que presentan peligros, para su utilización en todos esos sistemas. Con el fin de hacer frente a las necesidades de todos los diferentes sectores (transporte, suministro y utilización), fue necesario crear dos sub-clases de clasificación distintas: una para los peligros acuáticos agudos, con tres categorías, y otra para los peligros acuáticos a largo plazo, con cuatro. La primera incluye dos categorías de peligro agudo (toxicidad Aguda 2 y 3) que no se usan normalmente en caso de mercancías embaladas/envasadas. En las sustancias transportadas a granel, hay varias decisiones en materia de reglamentación que sólo se emplean cuando se trata de grandes cantidades. En esas situaciones, por ejemplo cuando hay que decidir sobre el tipo de buque que se usará, se considera importante tener en cuenta todas las categorías de peligro agudo, así como las de peligro a largo plazo. En los párrafos siguientes se describen en detalle los criterios que han de usarse para definir cada una de esas categorías de peligro.

### **A9.2.2 Categorías y criterios de clasificación**

En el párrafo 4.1.2.4 y la tabla 4.1.1 del capítulo 4.1 se indican las categorías de peligro para la toxicidad aguda y crónica y los criterios correspondientes.

### **A9.2.3 Razón de ser**

A9.2.3.1 El sistema armonizado de clasificación reconoce que el peligro intrínseco para los organismos acuáticos viene representado por la toxicidad tanto aguda como crónica o a largo plazo de una sustancia, cuya importancia está determinada en los distintos regímenes reguladores vigentes. Cabe distinguir entre el peligro agudo y el crónico y, por consiguiente, las clases de peligro se definen para ambas propiedades con una gradación en el nivel de peligro identificado. Está claro que el peligro correspondiente a la categoría de toxicidad Crónica 1 es mayor que el de la categoría de toxicidad Crónica 2. Puesto que el peligro agudo y a largo plazo constituyen tipos distintos, no son comparables por su gravedad relativa. Con miras a sentar unas bases para todos los sistemas reguladores, la clasificación de las sustancias en ambas sub-clases de peligro debería hacerse de manera independiente.

A9.2.3.2 Las principales clases de peligro definidas por los criterios se refieren sobre todo al potencial de peligro crónico. Eso refleja la preocupación principal respecto de los productos químicos en el medio ambiente, a saber, que los efectos causados suelen ser sub-letales, es decir, efectos sobre la reproducción y provocados por una exposición a largo plazo. Sin perjuicio de reconocer que el peligro a largo plazo supone

la preocupación principal, en particular para mercancías embaladas/envasadas donde los vertidos en el medio ambiente son de alcance limitado, hay que reconocer también que los datos de toxicidad crónica son costosos de obtener y, por lo general, no están fácilmente disponibles para la mayoría de las sustancias. En cambio, los datos de toxicidad aguda suelen ser fáciles de obtener o pueden generarse con protocolos muy normalizados. Es, por tanto, esa toxicidad aguda la que se ha empleado como propiedad básica para definir el peligro tanto agudo como a largo plazo cuando no se dispone de datos adecuados de ensayos de toxicidad crónica. No obstante, se admite que cuando se disponga de datos de toxicidad crónica, deberán utilizarse estos datos para definir la categoría de peligro a largo plazo.

A9.2.3.3 La combinación de las propiedades de toxicidad crónica y destino intrínseco refleja el posible peligro de una sustancia. Las sustancias que no se degradan rápidamente tienen un potencial mayor de exposición a más largo plazo y, por tanto, deben clasificarse en una categoría más severa que las sustancias que se degradan rápidamente (véase A9.3.3.2.2).

A9.2.3.4 Si bien se reconoce que la toxicidad aguda por sí sola no es un modo lo suficientemente preciso de predecir la toxicidad crónica para poder usarse exclusiva y directamente en el establecimiento de peligros, se considera que en combinación con un potencial de bioacumulación (es decir, con un  $\log K_{ow} \geq 4$  a menos que  $FBC < 500$ ) o bien con una posible exposición a largo plazo (es decir, en ausencia de una degradación rápida), puede usarse como un sustituto apropiado a efectos de clasificación. Las sustancias que experimenten una biodegradación fácil y presenten toxicidad aguda con un grado importante de bioacumulación mostrarán normalmente una toxicidad crónica a concentraciones considerablemente inferiores. Del mismo modo, las sustancias que no se degradan rápidamente tienen un potencial mayor de exposición prolongada, lo que a su vez puede entrañar una toxicidad a largo plazo. Así, por ejemplo, a falta de datos adecuados de ensayos de toxicidad crónica, debería asignarse la categoría Crónica 1 si se cumple cualquiera de los criterios siguientes:

- a)  $C(E)L_{50}$  para cualquier especie acuática apropiada  $\leq 1$  mg/l y un potencial de bioacumulación ( $\log K_{ow} \geq 4$ , a menos que  $FBC < 500$ );
- b)  $C(E)L_{50}$  para cualquier especie acuática apropiada  $\leq 1$  mg/l y una ausencia de degradación rápida.

A9.2.3.5 En las secciones A9.3, A9.4 y A9.5 se dan en detalle las definiciones precisas de los elementos básicos de este sistema.

A9.2.3.6 Para algunas sustancias poco solubles que normalmente se consideran que tienen una solubilidad en agua  $< 1$  mg/l, no se ha detectado ninguna toxicidad aguda en los ensayos realizados al límite de solubilidad. Si en esa sustancia, sin embargo,  $FBC \geq 500$  o, en su defecto,  $\log K_{ow} \geq 4$  (lo que indica un potencial de bioacumulación) y si la sustancia no se degrada rápidamente, se aplica una clasificación que constituye una suerte de red de seguridad, mediante una categoría Crónica 4. En esos tipos de sustancias la duración de la exposición en los ensayos de corta duración puede ser demasiado breve para alcanzar una concentración de estado estacionario. Así, aun cuando no se haya medido una toxicidad aguda en un ensayo de corta duración, subsiste la posibilidad real de que tales sustancias no degradables rápidamente y bioacumulables puedan ejercer efectos crónicos, sobre todo porque esa baja degradabilidad puede conducir a un período de exposición prolongado en el medio ambiente acuático.

A9.2.3.7 Al definir la toxicidad acuática, no cabe ensayar todas las especies presentes en un ecosistema acuático. Hay que escoger, por tanto, especies representativas que abarquen un amplio rango de niveles tróficos y agrupaciones taxonómicas. Los taxones elegidos (peces, crustáceos y plantas acuáticas), que constituyen el conjunto básico de casi todos los perfiles de peligro, representan una serie mínima de datos para una descripción plenamente válida del peligro. Los valores más bajos de toxicidad disponibles normalmente se usarán para definir la categoría de peligro. Debido a la gran diversidad de especies en el medio ambiente, las tres sometidas a ensayos no serán representativas de la totalidad de las mismas y, en consecuencia, por razones de prudencia se toma el valor inferior para definir la categoría de peligro. Al proceder así, se reconoce que la distribución de la sensibilidad de las especies puede alcanzar varios órdenes de magnitud y que habrá así especies más o menos sensibles en el medio. De este modo, cuando los datos son limitados, recurrir a las especies más sensibles de los ensayos permite una definición cautelosa pero aceptable del peligro. Con todo, hay circunstancias en que puede no ser apropiado usar el valor inferior de

toxicidad como base de la clasificación. Eso sólo se producirá cuando sea posible definir la distribución de la sensibilidad con una precisión mayor de lo que normalmente cabría hacer, por ejemplo cuando se disponga de una gran cantidad de datos. Esos datos deberían evaluarse con las precauciones de rigor.

#### **A9.2.4            *Aplicación***

A9.2.4.1            Por lo general, al decidir si una sustancia debería clasificarse, habrá que investigar las bases de datos apropiadas y otras fuentes para obtener los elementos de información siguientes:

- a)    la solubilidad en agua;
- b)    la toxicidad acuática aguda ( $C(E)L_{50S}$ );
- c)    la toxicidad acuática crónica (CSEO y/o  $CE_x$  equivalente);
- d)    los datos de degradación disponibles (y específicamente las pruebas de biodegradabilidad rápida);
- e)    los datos de estabilidad en el agua;
- f)    el factor de bioconcentración en los peces (FBC);
- g)    el coeficiente de reparto octanol-agua ( $\log K_{ow}$ );

Los datos de solubilidad y estabilidad en el agua, aunque no se usen directamente en los criterios, son sin embargo importantes, ya que constituyen una ayuda valiosa para los datos de las otras propiedades (véase A9.1.10).

A9.2.4.2            Para hacer la clasificación, habría que examinar primero los datos disponibles de toxicidad acuática. Será necesario considerar todos los datos utilizables y seleccionar los que cumplan los criterios de calidad necesarios para la clasificación. Si no se dispone de datos que cumplan los criterios de calidad requeridos por los métodos internacionalmente normalizados, habrá que examinar todos los datos que se tengan para determinar si procede una clasificación. Si los datos indican una toxicidad acuática aguda  $C(E)L_{50} > 100$  mg/l para sustancias solubles y la toxicidad acuática crónica es superior a 1 mg/l, entonces la sustancia no se clasificará como peligrosa. Se dan casos en que no se observan efectos en el ensayo y, en consecuencia, se considera una toxicidad acuática superior a la solubilidad en agua, es decir, no existe toxicidad aguda dentro del rango de solubilidad en el medio del ensayo. Cuando esto ocurra, y si la solubilidad en agua en ese medio es  $\geq 1$  mg/l, tampoco habrá que proceder a la clasificación.

A9.2.4.3            Si se dispone de datos sobre la toxicidad acuática crónica, los valores de corte dependerán de que la sustancia sea rápidamente degradable o no. Por consiguiente, en el caso de las sustancias no rápidamente degradables y de aquellas para las que no se disponga de información sobre la degradación, los valores de corte serán superiores que en el caso de las sustancias en que pueda confirmarse la degradabilidad rápida (véanse el capítulo 4.1 y las tablas 4.1.1 y 4.1.2).

A9.2.4.4            Cuando los datos de toxicidad acuática aguda más bajos sean inferiores a 100 mg/l y no se disponga de datos adecuados sobre la toxicidad crónica, será necesario decidir primero en qué intervalo de peligro se inscribe la toxicidad y luego determinar si debería aplicarse la clase crónica y/o aguda. Esto puede lograrse simplemente examinando los datos disponibles sobre el coeficiente de reparto,  $\log K_{ow}$ , y aquellos sobre degradación. Si  $\log K_{ow} \geq 4$  o bien si la sustancia no puede considerarse rápidamente degradable, entonces se aplicará por separado la categoría de peligro a largo plazo y la categoría correspondiente de peligro agudo. Nótese que, aun cuando  $\log K_{ow}$  sea la forma más sencilla de medir un potencial de bioacumulación, es preferible un FBC obtenido experimentalmente. Cuando se disponga de este último, debería usarse en lugar del coeficiente de reparto. En tales circunstancias,  $FBC \geq 500$  indicaría una bioacumulación suficiente para clasificar la sustancia en la categoría apropiada de peligro a largo plazo. Si la sustancia es rápidamente degradable y a la vez tiene un bajo potencial de bioacumulación ( $FBC < 500$  o, en su defecto,  $\log K_{ow} < 4$ ), no debe clasificarse en una categoría de peligro a largo plazo a menos que los datos de toxicidad crónica indiquen otra cosa (véase A9.2.4.3).

**A9.2.4.5** Las sustancias poco solubles, que por lo general son las que presentan una solubilidad en agua en el medio de ensayo  $< 1 \text{ mg/l}$ , en las que no se haya encontrado toxicidad acuática, deberían examinarse más a fondo para determinar si tienen que clasificarse en la categoría de peligro Crónico 4. Así, si la sustancia no es degradable rápidamente y tiene un potencial de bioacumulación ( $\text{FBC} \geq 500$  o, en su defecto,  $\log K_{ow} \geq 4$ ), debería aplicarse esa categoría de peligro Crónico 4.

#### **A9.2.5** *Disponibilidad de datos*

Los datos empleados para clasificar una sustancia pueden obtenerse de la información requerida con fines de reglamentación, así como en las publicaciones pertinentes, aunque existen varias bases de datos internacionalmente reconocidas que pueden constituir un buen punto de partida. Esas bases varían mucho en lo que respecta a su calidad, son más o menos completas y es poco probable que una sola contenga toda la información necesaria para hacer la clasificación. Algunas bases están especializadas en toxicidad acuática y otras en la evolución ambiental. Los proveedores de productos químicos tienen la obligación de hacer las investigaciones y pruebas necesarias para determinar el alcance y calidad de los datos disponibles, y de usarlos para asignar la categoría de peligro apropiada.

#### **A9.2.6** *Calidad de los datos*

**A9.2.6.1** La utilización precisa de los datos disponibles se describe en la sección correspondiente, pero por regla general se preferirán a otros tipos de datos los generados de conformidad con pautas internacionales normalizadas y unas buenas prácticas de laboratorio (BPL). Del mismo modo, es importante hacer la clasificación basándose en los mejores datos disponibles. Así, si no se tienen datos que se ajusten a las normas de calidad indicadas antes, podrá hacerse sin embargo la clasificación siempre que los datos empleados se consideren válidos. Para ayudar a ese proceso se ha desarrollado y utilizado mucho en diferentes foros una guía de evaluación de la calidad de los datos que se ajusta en general a las categorías siguientes:

- a) Datos obtenidos de fuentes oficiales que han sido validados por autoridades reguladoras, tales como las monografías de la UE sobre calidad del agua y los criterios de calidad de agua (*Water Quality Criteria*) de la Agencia para la protección del medio ambiente de los Estados Unidos (US EPA). Esos datos pueden considerarse válidos a efectos de clasificación. Con todo, no debería suponerse que son los únicos disponibles, y habría que trabajar con la información más actualizada. Quizá no se hayan considerado datos recién disponibles;
- b) Datos obtenidos siguiendo directrices reconocidas internacionalmente (por ejemplo, las de la OCDE) o pautas nacionales de calidad equivalente. Salvadas las cuestiones sobre la interpretación de los datos suscitadas en las secciones siguientes, esos datos pueden usarse para la clasificación;
- c) Datos obtenidos de ensayos que, si bien no se ajustan estrictamente a una de las directrices señaladas, se guían por principios y procedimientos científicos aceptados y han sido examinados por colegas de los autores antes de su publicación. Cuando tales datos no hayan consignado todos los detalles experimentales, habrá que emitir una opinión sobre su validez. Normalmente, podrán usarse para la clasificación;
- d) Los datos obtenidos con procedimientos de ensayo que se desvían apreciablemente de las directrices normalizadas y que se consideren poco fiables no deberían usarse en la clasificación;
- e) Datos QSAR: las circunstancias de utilización y la validez de esos datos se examinan en las secciones pertinentes;
- f) Datos obtenidos de fuentes secundarias tales como manuales, reseñas, citas, etc., en los que no cabe evaluar directamente su calidad. Tales datos deberían examinarse cuando no se disponga de otros de calidad 1, 2 y 3 para determinar si cabe usarlos. Convendría que fueran lo suficientemente detallados para poder evaluar la calidad. Al



determinar la aceptabilidad de esos datos a efectos de clasificación, habría que tener presentes las dificultades de los ensayos que puedan haber afectado a la calidad de los datos y el significado del resultado en términos del nivel de peligro identificado (véase A9.3.6.2.3).

**A9.2.6.2** También puede hacerse una clasificación basándose en conjuntos incompletos de datos sobre la toxicidad cuando no se disponga de información de la totalidad de los tres niveles tróficos. En esos casos, se puede considerar la clasificación como “provisional” y sujeta a la obtención ulterior de más información. Por lo general, antes de proceder a una clasificación habrá que considerar todos los datos que se tengan. Cuando no sean de buena calidad, habrá que recurrir a otros de menor calidad. En tales circunstancias, será necesario hacer un juicio de valor sobre el nivel real de peligro. Por ejemplo, cuando se cuente con datos de buena calidad para una especie o taxón determinados, deberían usarse con preferencia sobre otros de menor calidad también disponibles. Sin embargo, no siempre se tienen datos de buena calidad para los conjuntos de datos básicos sobre los niveles tróficos. Si sobre éstos no hay datos de buena calidad será necesario considerar los de calidad inferior. En tal caso, sin embargo, habrá que tener en cuenta las dificultades que puedan haber afectado al logro de un resultado válido. Por ejemplo, los pormenores del ensayo y el diseño experimental pueden ser fundamentales para saber si se pueden usar algunos datos, tales como los relativos a productos químicos hidrolíticamente inestables, mientras que en otras sustancias no revestirán tanta importancia. En la sección A9.3 se hace mayor referencia a estas dificultades.

**A9.2.6.3** Normalmente, la determinación de peligro y, por ende, la clasificación, se basarán en información obtenida directamente de los ensayos con la sustancia de que se trate. Hay ocasiones, sin embargo, en que esto puede crear dificultades en los ensayos o hacer que los resultados estén reñidos con el sentido común. Por ejemplo, algunos productos químicos, aunque sean estables en frasco, reaccionarán rápidamente (o lentamente) en el agua dando lugar a productos de degradación con propiedades diferentes. Cuando esa degradación sea rápida, los datos de los ensayos definirán a menudo el peligro de los productos de degradación, ya que serán éstos sobre los que versará el ensayo. Tales datos podrán usarse para clasificar la sustancia parental del modo habitual. La degradación subsiguiente podrá entonces considerarse para determinar si habría que aplicar la categoría de peligro agudo o crónico. Con todo, hay casos en que una sustancia así ensayada puede degradarse para dar paso a un producto más peligroso. En tales circunstancias, la clasificación de la sustancia parental debería tener presente el peligro del producto de degradación y la velocidad a la que puede formarse en condiciones ambientales normales.

## **A9.3 Toxicidad acuática**

### **A9.3.1 Introducción**

**A9.3.1.1** La base para identificar el peligro de una sustancia para el medio ambiente acuático es la toxicidad que supone aquella para éste. La clasificación dependerá de que se tengan datos de toxicidad para peces, crustáceos y algas o plantas acuáticas. Esos taxones son generalmente aceptados como representantes de la fauna y flora acuáticas a fines de determinación del peligro. Es más probable encontrar datos sobre esos taxones en razón de su aceptación general por las autoridades encargadas de la reglamentación y la industria química. También se utiliza otra información sobre el desempeño en materia de degradación y bioacumulación para precisar mejor el peligro acuático. En esta sección se describen los ensayos apropiados de ecotoxicidad, se indican algunos conceptos básicos para evaluar los datos y usar combinaciones de resultados de ensayos en la clasificación, se resumen las estrategias para las sustancias difíciles y se hace una exposición concisa sobre la interpretación de la calidad de los datos.

### **A9.3.2 Descripción de los ensayos**

**A9.3.2.1** A la hora de clasificar las sustancias en el sistema armonizado, los datos sobre toxicidad de especies marinas y de agua dulce pueden considerarse equivalentes. Con todo, algunos tipos de sustancias, por ejemplo productos químicos orgánicos ionizables o sustancias organometálicas, pueden manifestar toxicidad diferente en agua dulce y en agua de mar. Dado que el propósito de la clasificación es caracterizar el peligro en el medio ambiente acuático, habría que inclinarse por el resultado que mostrase la toxicidad mayor.

**A9.3.2.2** Los criterios del SGA en la determinación de los peligros para la salud y el medio ambiente deberían ser neutrales respecto del método de ensayo, permitiendo enfoques diferentes siempre que sean

científicamente adecuados y validados con arreglo a procedimientos y criterios internacionales ya recogidos en los sistemas existentes para los tipos de peligro de que se trata y produzcan datos mutuamente aceptables. Según el sistema propuesto (OCDE, 1998):

*“La toxicidad aguda normalmente se determinaría a partir de una  $CL_{50}$  en 96 horas para los peces (Directriz 203 de la OCDE o equivalente), de una  $CE_{50}$  en 48 horas para crustáceos (Directriz 202 o equivalente) y/o de una  $CE_{50}$  en 72 o 96 horas para algas (Directriz 201 o equivalente). Esas especies se consideran representativas del conjunto de los organismos acuáticos y los datos relativos a otras especies, como la lenteja de agua *Lemna*, pueden también tomarse en cuenta si la metodología del ensayo es adecuada.”*

Los ensayos de toxicidad crónica suponen por lo general una exposición que persiste o prosigue durante largo tiempo, que puede variar entre unos días y un año o más a tenor del ciclo reproductivo del organismo acuático. Los ensayos de toxicidad crónica pueden servir para evaluar ciertos peligros para el crecimiento, la supervivencia, la reproducción y el desarrollo.

*“Los datos de toxicidad crónica son más escasos que los de toxicidad aguda y el abanico de procedimientos de ensayo está menos normalizado. También cabe usar datos obtenidos con arreglo a las Directrices de la OCDE 210 (Fase temprana de la vida de los peces), 202, parte 2, o 211 (Reproducción de las dafnias) y 201 (inhibición del crecimiento de las algas). También pueden utilizarse otros ensayos validados e internacionalmente aceptados. Convendrá utilizar las NOEC u otras  $C(E)L_x$  equivalentes.”*

En un documento de la OCDE se describen los principales métodos estadísticos para el análisis de datos de ensayos normalizados de la ecotoxicidad (OCDE 2006).

A9.3.2.3 Nótese que varias de las Directrices de la OCDE que se han citado como ejemplos para la clasificación están revisándose o se van a actualizar. Esa labor puede entrañar pequeñas modificaciones en las condiciones de los ensayos. Por ello, el grupo de expertos que desarrolló los criterios de clasificación armonizados introdujo alguna flexibilidad en la duración de los ensayos o incluso en las especies utilizadas.

A9.3.2.4 Las pautas para hacer ensayos aceptables con peces, crustáceos y algas pueden encontrarse en muchas fuentes (OCDE, 1999; EPA, 1996; ASTM, 1999; ISO, UE). La monografía de la OCDE N°. 11, *Detailed Review Paper on Aquatic Toxicity Testing for Industrial Chemicals and Pesticides*, es una buena recopilación de métodos de ensayo representativos de medios pelágicos y de fuentes de información sobre ese tipo de ensayos. Constituye también una fuente para otras metodologías de ensayo apropiadas.

#### A9.3.2.5 *Ensayos con peces*

##### A9.3.2.5.1 Ensayos de toxicidad aguda

Los ensayos de toxicidad aguda suelen hacerse, por lo general, con ejemplares jóvenes de 0,1 a 5 g de peso, durante un período de 96 horas. El efecto que se quiere observar es la mortalidad. Los peces de mayor peso y/o las duraciones inferiores a 96 horas suelen presentar menor sensibilidad. No obstante, para la clasificación, podrían usarse datos de este tipo si no se tienen datos aceptables en las condiciones iniciales o si los resultados de los ensayos con peces de tamaño diferente o duraciones distintas conducen a una clasificación en una categoría de peligro superior. Convendrá utilizar ensayos de conformidad con la Directriz 203 de la OCDE (Peces,  $CL_{50}$  en 96 horas) o equivalente.

##### A9.3.2.5.2 Ensayos de toxicidad crónica

Los ensayos de toxicidad crónica o de larga duración con peces pueden iniciarse con huevos fecundados, embriones, ejemplares jóvenes o adultos activos en el plano reproductivo. En el sistema de clasificación se pueden usar ensayos que se ajusten a la Directriz 210 de la OCDE (Fase temprana de la vida de los peces), o al ensayo sobre el ciclo de vida de los peces (US-EPA 850.1500) o equivalente. La duración puede variar mucho a tenor de la finalidad del ensayo (de 7 días a más de 200). Entre los efectos que hay que observar figuran el éxito de la eclosión, el crecimiento (evolución de la longitud y peso), los resultados del desove y la supervivencia. Técnicamente, la Directriz 210 de la OCDE (Fase temprana de la vida de los

peces) no se refiere a toxicidad “crónica” sino a toxicidad subcrónica en etapas sensibles de la vida. Está muy aceptada como medio de predecir la toxicidad crónica y se usa con fines de clasificación en el sistema armonizado. Los datos de toxicidad en la primera etapa de la vida de los peces son mucho más accesibles que los estudios sobre todo el ciclo de vida o la reproducción.

#### A9.3.2.6 *Ensayos con crustáceos*

##### A9.3.2.6.1 Ensayos de toxicidad aguda

Los ensayos de toxicidad aguda con crustáceos comienzan, por lo general, con ejemplares jóvenes en la primera fase larval. Para las dafnias, se hacen ensayos de 48 horas. Para otros crustáceos, tales como los misidáceos u otros, la duración suele ser de 96 horas. Lo que hay que observar es la mortalidad o, en su defecto, la inmovilización. Ésta se define como falta de respuesta a una punzada suave. Para la clasificación deberían usarse ensayos conformes con la Directriz 202 de la OCDE, parte 1 (toxicidad aguda en dafnia), o USA-EPA OPPTS 850.1035 (toxicidad aguda en misidáceos) o sus equivalentes.

##### A9.3.2.6.2 Ensayos de toxicidad crónica

Los ensayos de toxicidad crónica con crustáceos también suelen empezar con ejemplares jóvenes en la primera fase larval, y prosiguen con la maduración y reproducción. En las dafnias, 21 días bastan para la maduración y reproducción de tres generaciones. Para los misidáceos son necesarios 28 días. Entre los efectos que hay que observar figuran el tiempo necesario para obtener una primera generación, el número de descendientes por hembra, el crecimiento y la supervivencia. En el sistema de clasificación se recomienda que los ensayos se ajusten a la Directriz 202 de la OCDE, parte 2 (reproducción de dafnias), o a la US-EPA 850.1350 (toxicidad crónica en misidáceos) o su equivalente.

#### A9.3.2.7 *Ensayos con algas/plantas*

##### A9.3.2.7.1 Ensayos con algas

Las algas se cultivan y se exponen a la sustancia de ensayo en un medio enriquecido con nutrientes. Los ensayos deberían ajustarse a la Directriz 201 de la OCDE (Inhibición del crecimiento). Los métodos de ensayo normalizados emplean una densidad de células en el inóculo con el fin de lograr un crecimiento exponencial durante la prueba, con una duración, por lo general, de 3 a 4 días.

El ensayo con las algas es un ensayo de corta duración que permite observar la toxicidad tanto aguda como crónica, sólo se usa la  $CE_{50}$  para la clasificación en el sistema armonizado. El efecto que se prefiere observar en ese estudio es la tasa de inhibición del crecimiento de las algas, ya que no depende del diseño del ensayo, mientras que la biomasa depende tanto de la tasa de crecimiento de las especies sometidas a ensayo como de la duración de éste y de otros elementos del diseño del ensayo. Si el efecto experimental se indica sólo como una reducción de la biomasa o no se especifica, entonces este valor puede interpretarse como equivalente.

##### A9.3.2.7.2 Ensayos con macrofitos acuáticos

Las plantas usadas más comúnmente en los ensayos de toxicidad acuática son las lentejas de agua (*Lemna gibba* y *Lemna minor*). Estos ensayos son de corta duración y aunque permiten observaciones de la toxicidad tanto aguda como subcrónica, sólo se emplea la  $CE_{50}$  aguda para la clasificación en el sistema armonizado. Los ensayos duran hasta 14 días y se hacen en un medio enriquecido con nutrientes similares al usado en las algas, pero que puede estar más enriquecido. El efecto observado se basa en el cambio del número de frondas producidas. Deberían usarse ensayos que se ajusten a la Directriz de la OCDE sobre *Lemna* sp. (en preparación) y a la US-EPA 850.4400 (toxicidad para plantas acuáticas, *Lemna*).

### A9.3.3 *Conceptos de toxicidad acuática*

Esta sección trata del uso de los datos de toxicidad aguda y crónica en la clasificación y especialmente de los regímenes de exposición, los ensayos de toxicidad de algas y el empleo de las QSAR. Para un examen más detallado de los conceptos de toxicidad acuática, cabe consultar a Rand (1996).

### A9.3.3.1 *Toxicidad aguda*

A9.3.3.1.1 La toxicidad aguda para los fines de clasificación se refiere a la propiedad intrínseca de una sustancia de ser nociva para un organismo cuando éste se expone a aquélla durante un tiempo corto. Generalmente se expresa en términos de una concentración que es letal para el 50 % de los organismos de ensayo ( $CL_{50}$ ), provoca un efecto adverso medible en 50 % de esos organismos (por ejemplo, inmovilización en el caso de las dafnias), o induce una reducción del 50 % de las respuestas de los organismos ensayo (tratados) en comparación con organismos control (no tratados) (por ejemplo, la tasa de crecimiento en las algas).

A9.3.3.1.2 Las sustancias cuya toxicidad aguda observada es inferior a una parte por millón (1 mg/l) se consideran generalmente muy tóxicas. Su manipulación, utilización o descarga en el medio entrañan un alto grado de peligro y se clasifican en una Categoría de peligro Crónico y/o Agudo 1. Por encima de ese valor, se utiliza una potencia de diez para distinguir las diferentes categorías de toxicidad aguda. Las sustancias que presentan una toxicidad aguda de una a diez partes por millón (1 - 10 mg/l) se clasifican en la Categoría 2, de diez a cien partes por millón (10 - 100 mg/l) en la Categoría 3 de toxicidad aguda y aquellas con más de cien partes por millón se consideran prácticamente no tóxicas.

### A9.3.3.2 *Toxicidad crónica*

A9.3.3.2.1 La toxicidad crónica, a efectos de clasificación, designa la propiedad intrínseca de una sustancia de provocar efectos adversos en organismos acuáticos durante exposiciones que se determinan en relación con el ciclo de vida del organismo. Esa toxicidad crónica se traduce habitualmente en una serie de efectos sub-letales y se expresa, por lo general, en términos de una concentración sin efecto observado (NOEC) o una  $CE_x$  equivalente. Entre los efectos observables suelen figurar la supervivencia, el crecimiento y/o la reproducción. La duración de la exposición en los ensayos de toxicidad crónica puede variar mucho en función del efecto medido y de la especie utilizada en el ensayo.

A9.3.3.2.2 En la clasificación basada en la toxicidad crónica se establece una diferenciación entre las sustancias rápidamente degradables y las no rápidamente degradables. Las sustancias que no se degradan rápidamente se clasifican en la categoría Crónica 1, cuando se determina que la toxicidad crónica es  $\leq 0,01$  mg/l. Por encima de esta categoría se utilizan potencias de diez para distinguir las diferentes categorías de toxicidad crónica. Las sustancias que presentan una toxicidad crónica de entre 0,01 y 0,1 mg/l se clasifican en la categoría Crónica 2 de toxicidad crónica, las que presentan valores de entre 0,1 y 1,0 mg/l se clasifican en la categoría Crónica 3 de toxicidad crónica, y las que tienen valores superiores a 1,0 mg/l se consideran prácticamente no tóxicas. En el caso de las sustancias que no se degradan rápidamente o para las que no hay información sobre la degradación rápida, se utilizan dos categorías crónicas: Crónica 1, cuando la toxicidad crónica es  $\leq 0,1$  mg/l, y Crónica 2, cuando la toxicidad crónica se sitúa entre 0,1 y 1,0 mg/l.

A9.3.3.2.3 Como los datos de toxicidad crónica son menos comunes en ciertos sectores que los de toxicidad aguda, en los sistemas de clasificación el potencial de la primera se identifica, a falta de datos adecuados sobre la toxicidad crónica, mediante combinaciones adecuadas de la toxicidad aguda, la ausencia de degradabilidad y/o la bioacumulación potencial o real. Sin embargo, cuando existan datos adecuados sobre la toxicidad crónica, se utilizarán de preferencia esos datos y no la clasificación basada en la combinación de la toxicidad aguda con la degradabilidad y/o la bioacumulación. En este contexto, se seguirá el procedimiento general siguiente:

- a) Si se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica para los tres niveles tróficos, esos datos podrán utilizarse directamente para determinar una categoría adecuada de peligro crónico;
- b) Si se dispone de datos adecuados sobre la toxicidad crónica respecto de uno o dos niveles tróficos, deberá examinarse si existen datos de toxicidad aguda para el otro o los otros niveles tróficos. En ese caso se establecerá una clasificación posible para el o los niveles tróficos con datos crónicos, que se comparará con la que se haya hecho utilizando los datos de toxicidad aguda para el o los otros niveles. La clasificación definitiva será la que dé el resultado más estricto.

- c) Con el fin de anular o rebajar una clasificación crónica utilizando datos de toxicidad crónica, deberá demostrarse que la(s) CSEO (o la(s) CEx equivalente(s)) utilizadas servirían para eliminar o reducir la preocupación respecto de todos los taxones que dieron lugar a la clasificación basada en los datos agudos combinados con la degradabilidad y/o la bioacumulación. Ello puede lograrse en muchos casos utilizando la CSEO a largo plazo para las especies más sensibles determinadas mediante la toxicidad aguda. Así pues, si la clasificación se ha basado en la CL50 aguda para los peces, generalmente no será posible eliminar o rebajar esa clasificación usando una CSEO a largo plazo obtenida mediante un ensayo de toxicidad en invertebrados. En este caso, la CSEO deberá obtenerse normalmente a partir de un ensayo a largo plazo en peces de la misma especie o de otra de sensibilidad equivalente o superior. Del mismo modo, si la clasificación ha obedecido a la toxicidad aguda de más de un taxón, es probable que se necesite la CSEO de cada taxón. En caso de que una sustancia se clasifique como Crónica 4, deberán proporcionarse suficientes pruebas de que la CSEO o la CEx equivalente de cada taxón es superior a 1 mg/l o superior a la solubilidad en agua de las sustancias de que se trate.

A9.3.3.2.4 Los ensayos con algas o *Lemna* sp. no pueden servir para eliminar o rebajar una clasificación porque:

- a) no se trata de estudios a largo plazo;
- b) la relación entre toxicidad aguda y crónica suele ser baja; y
- c) los valores finales agudos son más consistentes con los de otros organismos.

No obstante, cuando se hace una clasificación en razón únicamente de la toxicidad aguda  $C(E)L_{50}$ , observada en un ensayo único con algas/plantas acuáticas, pero toda una serie de otros ensayos con algas indican que la toxicidad crónica (NOEC) para ese grupo taxonómico se encuentra en el rango de toxicidad correspondiente a una categoría de clasificación menos estricta o es superior a 1 mg/l, tal información podría usarse para considerar la eliminación o la clasificación en una categoría inferior. Actualmente, ese proceder no puede aplicarse a las plantas acuáticas, ya que no se han desarrollado ensayos normalizados de toxicidad crónica.

#### A9.3.3.3 *Regímenes de exposición*

Se emplean cuatro tipos de condiciones de exposición en los ensayos de toxicidad tanto aguda como crónica y en un medio acuático tanto marino como de agua dulce: estático, estático con renovación (semiestático), recirculación y régimen dinámico. La selección del tipo de ensayo que se empleará depende de las características de las sustancias que se sometan a ensayo, de la duración de éste, y de las prescripciones establecidas por las autoridades.

#### A9.3.3.4 *Medio de ensayo para las algas*

Los ensayos con las algas se realizan en medios enriquecidos con nutrientes, y conviene considerar con prudencia el uso de un constituyente común como el EDTA u otros agentes quelantes. Al comprobar la toxicidad de productos químicos orgánicos, se necesitan trazas de un agente quelante como el EDTA para aportar micronutrientes al medio de cultivo. En caso contrario, el crecimiento de las algas puede verse muy reducido y comprometer la utilidad del ensayo. No obstante, los quelantes pueden reducir la toxicidad observada de sustancias metálicas. Por tanto, en compuestos metálicos es conveniente que los datos de los ensayos con una concentración elevada de quelantes o un exceso estequiométrico de los mismos respecto al hierro sean objeto de una evaluación crítica. El agente quelante libre puede enmascarar la toxicidad de metales pesados de manera considerable, en particular cuando se trata de un quelante fuerte como el EDTA. Sin embargo, la ausencia de hierro disponible en el medio puede limitar el crecimiento de las algas y, por consiguiente, los datos procedentes de ensayos hechos con poco o sin hierro y EDTA deberían tratarse con precaución.

#### **A9.3.3.5      *Utilización de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR)***

A efectos de clasificación, y a falta de datos experimentales, la predicción de la toxicidad aguda en peces, dafnias y algas de sustancias no electrolíticas, no electrófilas y por lo demás no reactivas puede basarse en las QSAR (véase la sección A9.6 sobre utilización de las QSAR). Sigue habiendo problemas para sustancias tales como los organofosforados que operan por medio de mecanismos especiales, por ejemplo grupos funcionales que interactúan con receptores biológicos o pueden formar enlaces sulfhidrilos con proteínas celulares. Se han obtenido QSAR fiables a partir de sustancias químicas que actúan mediante un mecanismo de narcosis. Esos productos son no-electrolitos de baja reactividad, tales como hidrocarburos, alcoholes, cetonas y ciertos hidrocarburos clorados alifáticos cuyos efectos biológicos dependen de sus coeficientes de reparto. Todo producto químico orgánico puede producir narcosis. No obstante, si se trata de un electrolito o si contiene grupos funcionales específicos que entrañan igualmente efectos no narcóticos, todo cálculo de toxicidad basado sólo en el coeficiente de reparto subestimaría en gran medida la toxicidad. No se pueden utilizar las QSAR relativas a la toxicidad acuática aguda de compuestos parentales para predecir los efectos de metabolitos o de productos de degradación tóxicos, cuando éstos aparecen al cabo de un tiempo superior a la duración de los ensayos de toxicidad aguda.

#### **A9.3.4      *El peso de la evidencia***

A9.3.4.1      En la clasificación deberían usarse como base fundamental datos de la mejor calidad. La clasificación tendría que apoyarse preferentemente en fuentes primarias. Es esencial que las condiciones de ensayo se describan de modo claro y completo.

A9.3.4.2      Cuando se disponga de varios estudios para un grupo taxonómico, habrá que decidir cuáles son los datos mejores y más sensibles. Tendrá que juzgarse caso por caso la oportunidad de utilizar, en lugar de un estudio conforme a las BPL, otro que no se ajuste a esas prácticas pero que ofrezca una observación de mayor sensibilidad. Por regla general, los resultados que indiquen una toxicidad elevada en ensayos realizados con arreglo a pautas no normalizadas o no conformes a las BPL deberían poder usarse para la clasificación, mientras que los estudios que demuestren muy escasa toxicidad requerirían un examen más a fondo. Las sustancias con las que es difícil hacer ensayos, pueden arrojar resultados aparentes superiores o inferiores a la toxicidad real. En tales casos será necesario recurrir a la opinión de los expertos para la clasificación.

A9.3.4.3      Cuando para un mismo grupo taxonómico se dispone de más de un ensayo aceptable, se suele usar para la clasificación el más sensible (aquel con el C(E)L<sub>50</sub> o la NOEC más bajos). No obstante, esto debe hacerse caso por caso. Cuando se tengan conjuntos mayores de datos (cuatro o más valores) para la misma especie, se puede tomar la media geométrica de los valores de toxicidad como valor representativo de esa última para esa especie. Al hacer el cálculo del valor medio no conviene combinar ensayos de especies diferentes dentro de un grupo taxonómico o realizados en diferentes etapas de la vida o en condiciones o duración distintas.

#### **A9.3.5      *Sustancias difíciles de someter a ensayo***

A9.3.5.1      Los ensayos válidos de toxicidad acuática requieren diluir la sustancia de que se trate en el medio acuático en las condiciones recomendadas por las directrices. Además, deberá mantenerse una concentración biodisponible del producto durante el tiempo que dure el ensayo. Con algunas sustancias es difícil hacer ensayos en sistemas acuáticos, por lo que se han formulado recomendaciones para facilitar esos ensayos (DoE 1996; ECETOC 1996; y US EPA 1996). La OCDE está terminando un documento con directrices para los ensayos de toxicidad aguda de sustancias y mezclas “difíciles” (OCDE, 2000). Ese documento será una buena fuente de información sobre los tipos de sustancias difíciles de someter a ensayo y los pasos necesarios para que cuando se hagan éstos se llegue a conclusiones válidas.

A9.3.5.2      No obstante, existen muchos datos que se han obtenido utilizando en los ensayos metodologías que, si bien no se conforman a lo que se puede considerar hoy en día una buena práctica, reportan, sin embargo, información que sirve para aplicar los criterios de clasificación. Esos datos requieren directrices especiales para su interpretación, aunque en definitiva habrá que recurrir a la opinión de los expertos para determinar su validez. Esas sustancias difíciles de analizar pueden ser poco solubles, volátiles o sujetas a degradación rápida por procesos tales como fototransformación, hidrólisis, oxidación o

degradación biótica. Al hacer ensayos con algas, en los resultados pueden interferir materiales coloreados al atenuar la luz necesaria para el crecimiento de las células. Del mismo modo, sustancias sometidas a ensayo en forma de dispersiones turbias pueden entrañar mediciones falsas de toxicidad. La introducción del material que se somete a ensayo en la columna de agua puede resultar problemático para partículas o sólidos tales como metales. Las fracciones del petróleo obtenidas por destilación también pueden suscitar problemas de carga, así como de interpretación, al decidir las concentraciones apropiadas para determinar los valores de  $C(E)L_{50}$ . El proyecto de documento guía sobre ensayos de toxicidad acuática de sustancias y mezclas difíciles describe las propiedades más comunes de muchos tipos de productos para los que es probable que surjan dificultades durante los ensayos.

- a) Estabilidad: Cuando se espera que las concentraciones de la sustancia química caigan por debajo del 80 % de la concentración nominal, el ensayo, para ser válido, puede requerir regímenes de exposición que aseguren una renovación de la sustancia del ensayo. Son preferibles condiciones semiestáticas o dinámicas. Por ello, se suscitan problemas especiales en los ensayos con algas, donde las directrices prevén, por lo general, ensayos estáticos. Si bien regímenes de exposición alternativos son posibles para crustáceos y peces, esos ensayos se hacen frecuentemente en condiciones estáticas, tal como indican las directrices internacionalmente convenidas. En esos ensayos hay que tolerar un cierto nivel de degradación, así como otros factores pertinentes que han de tenerse en cuenta en los cálculos de las concentraciones tóxicas. En A9.3.5.6 se hacen algunas indicaciones sobre cómo abordar esa situación. Cuando haya degradación, será también importante considerar la influencia de la toxicidad de los productos de degradación sobre la toxicidad registrada en el ensayo. Será necesario recurrir a la opinión de los expertos para decidir si los datos pueden usarse para la clasificación.
- b) Degradación: Si un compuesto se descompone o degrada en las condiciones de ensayo, habría que recabar el parecer de los expertos para calcular la toxicidad y hacer la clasificación, habida cuenta de los productos de descomposición conocidos o probables. Es conveniente conocer las concentraciones de la sustancia parental y de todos los productos de degradación tóxicos importantes. Cuando se espere que los productos de degradación sean relativamente poco tóxicos, estarán indicados unos regímenes de exposición con renovación del medio experimental, con el fin de asegurar que se mantengan los niveles de los compuestos parentales.
- c) Saturación: Para sustancias que sólo tengan un componente, la clasificación deberá basarse únicamente en las respuestas tóxicas observadas en el rango de solubilidad del producto ensayado y no por encima de él. Muchas veces se dispone de datos que indican toxicidad en niveles superiores a la solubilidad del producto en agua y, si bien esos datos se considerarán a menudo como no válidos, es posible hacer alguna interpretación. Estos problemas suelen suscitarse al hacer ensayos con sustancias poco solubles, y en A9.3.5.7 figuran indicaciones sobre cómo interpretar esos datos (véase también el documento guía sobre los ensayos de toxicidad acuática de sustancias y mezclas difíciles).
- d) Perturbación del medio de ensayo: Pueden ser necesarias disposiciones especiales para asegurar la disolución de sustancias con las que es difícil hacer ensayos. Esas medidas no deberían entrañar cambios apreciables en el medio de ensayo cuando sea probable que tales cambios conduzcan a un aumento o disminución de la toxicidad aparente y, por ende, del nivel de clasificación de la sustancia.
- e) Sustancias complejas: Muchas sustancias que figuran en el sistema de clasificación son en realidad mezclas, cuya medición de las concentraciones de exposición resulta difícil y en algunos casos imposible. Sustancias tales como fracciones de destilación del petróleo, polímeros, sustancias con niveles significativos de impurezas, etc., pueden plantear problemas especiales, ya que será difícil definir la concentración tóxica e imposible verificarla. Los procedimientos habituales de ensayo suelen basarse en la formación de una fracción soluble en agua (*Water Soluble Fraction - WSF*) o una

fracción disuelta en agua (*Water Accommodated Fraction - WAF*), indicándose los datos en forma de cantidad de sustancia añadida. Esos datos pueden usarse para aplicar los criterios de clasificación.

A9.3.5.3 Para clasificar compuestos orgánicos, es conveniente disponer de concentraciones de ensayo estabilizadas y medidas analíticamente. Aunque sean preferibles concentraciones medidas, la clasificación podrá basarse en estudios sobre la concentración nominal cuando sean los únicos datos válidos disponibles en ciertas circunstancias. Cuando sea probable que la materia se degrade sustancialmente o se pierda de otra manera en medio acuoso, habrá que tener cuidado al interpretar los datos y la clasificación debería hacerse teniendo en cuenta, de ser pertinente y posible, la pérdida del tóxico durante el ensayo. Por lo demás, los metales presentan su propia serie de dificultades y se tratan por separado. En la tabla A9.3.1 se enumeran varias propiedades de sustancias difíciles de someter a ensayo y su pertinencia para la clasificación.

A9.3.5.4 En las condiciones de ensayo más difíciles, la concentración real de ensayo será probablemente inferior a la concentración de ensayo nominal o prevista. Cuando se estimen toxicidades agudas ( $C(E)L_{50}$ ) < 1 mg/l para una sustancia difícil de analizar, se puede estar razonablemente seguro de que la sustancia se clasificará en la categoría de peligro Agudo 1 (y en la categoría de peligro Crónico 1, si procede). Sin embargo, si la toxicidad estimada es superior a 1 mg/l, es probable que la toxicidad así calculada sea inferior a la toxicidad real. En esas circunstancias habrá que recurrir a la opinión de los expertos para determinar la aceptabilidad de un ensayo con una sustancia difícil de analizar para proceder a su clasificación. Cuando se piense que la índole de la dificultad del ensayo influye de manera apreciable en la concentración real y cuando la toxicidad estimada sea superior a 1 mg/l y no se haya medido la concentración de ensayo, entonces éste debería interpretarse con cautela a efectos de clasificación.

A9.3.5.5 En los párrafos siguientes se dan algunas indicaciones detalladas sobre algunos de esos problemas de interpretación. En ese contexto, debería recordarse que se trata de una orientación y que no se pueden aplicar reglas rápidas y rígidas. Debido a la naturaleza de muchas de las dificultades, habrá que recurrir siempre a la opinión de expertos para determinar si hay información suficiente en un ensayo para juzgar su validez, y también si cabe determinar un nivel de toxicidad adecuado para aplicar los criterios de clasificación.

#### A9.3.5.6 *Sustancias inestables*

A9.3.5.6.1 Si bien idealmente habría que adoptar procedimientos de ensayo que reduzcan al mínimo los impactos de la inestabilidad del medio en el que se realiza el ensayo, en la práctica, en ciertos ensayos será casi imposible mantener una concentración determinada durante todo el tiempo. Las causas corrientes de esa inestabilidad son la oxidación, la hidrólisis, la fotodegradación y la biodegradación. Si bien esas formas de degradación pueden controlarse con más facilidad, esos controles faltan muchas veces en muchos de los ensayos que se hacen. No obstante, en algunos ensayos, particularmente en los que estudian la toxicidad aguda y crónica en peces, se dispone de un conjunto de regímenes de exposición para ayudar a minimizar las pérdidas debidas a inestabilidad, y esto debería tenerse en cuenta al decidir la validez de los datos del ensayo.

A9.3.5.6.2 Cuando la inestabilidad sea un factor para determinar el nivel de exposición durante el ensayo, una condición previa esencial para interpretar los datos será contar con mediciones de las concentraciones de la exposición en momentos dados del ensayo. Si no se cuenta con un análisis de las concentraciones al menos al principio y final del ensayo, no podrá hacerse ninguna interpretación válida y el ensayo no será válido a efectos de clasificación. Cuando se disponga de esas mediciones, habrá que tener presentes varias reglas prácticas para guiar la interpretación:

- a) cuando se disponga de mediciones al principio y al final del ensayo (como es lo normal en los ensayos de toxicidad aguda con dafnias y algas), se podrá calcular la  $C(E)L_{50}$ , con miras a la clasificación, basándose en la media geométrica de las concentraciones al principio y al final del ensayo. Cuando las concentraciones del final queden por debajo del límite de detección analítica, esas concentraciones deberán considerarse como iguales a la mitad de dicho límite de detección;
- b) cuando se disponga de mediciones al principio y al final de los períodos de renovación del medio (como puede ocurrir en los ensayos semiestáticos), habrá que calcular la



media geométrica de cada período de renovación y determinar entonces a partir de esos datos la exposición media para el conjunto de exposiciones;

- c) cuando la toxicidad pueda atribuirse a un producto de degradación y cuando se conozcan sus concentraciones, se podrá calcular la  $C(E)L_{50}$  para la clasificación basándose en la media geométrica de la concentración del producto de degradación, recalculándola para la sustancia parental;
- d) unos principios similares podrán aplicarse a las mediciones en los ensayos de toxicidad crónica.

#### A9.3.5.7 *Sustancias poco solubles*

A9.3.5.7.1 Estas sustancias, entendiéndose generalmente por tales aquellas con una solubilidad en agua  $< 1$  mg/l, son casi siempre difíciles de disolver en el medio de ensayo, y las concentraciones disueltas muchas veces serán también difíciles de medir en el bajo nivel esperado. En muchas sustancias, no se conocerá la solubilidad real en el medio de ensayo y muchas veces se considerará inferior al límite de detección en agua purificada. No obstante, tales sustancias pueden presentar toxicidad, y cuando ésta no se encuentre, habrá que decidir si el resultado puede considerarse válido para la clasificación. La decisión debería pecar de prudente y no subestimar el peligro.

A9.3.5.7.2 Idealmente, habría que hacer ensayos con técnicas de disolución apropiadas y concentraciones medidas con precisión en el rango de solubilidad en agua. Cuando se disponga de datos de ensayos habría que preferirlos a otros. Es normal, sin embargo, especialmente al examinar datos más antiguos, encontrar sustancias de esa índole con niveles de toxicidad superiores a la solubilidad en agua o donde los niveles disueltos quedan por debajo del límite de detección del método analítico. Así, en ambas circunstancias, no es posible verificar las concentraciones de exposición reales utilizando mediciones. Cuando éstas sean los únicos datos disponibles para clasificar, pueden seguirse algunas normas prácticas como orientación general:

- a) cuando se observe toxicidad aguda para concentraciones superiores a la solubilidad del producto en agua, podrá considerarse a efectos de clasificación que la  $C(E)L_{50}$  es inferior o igual a la solubilidad en agua medida. En ese caso, es probable que la sustancia deba clasificarse en las categorías de peligro crónico 1 y/o peligro agudo 1. Al tomar esa decisión, debería prestarse especial atención a la posibilidad de que la sustancia en exceso no disuelta provoque efectos físicos en los organismos de ensayo. Cuando se considere que este hecho es la causa probable de los efectos observados, el ensayo debería reputarse no válido para hacer una clasificación;
- b) cuando no se observe toxicidad aguda en concentraciones superiores a la solubilidad del producto en agua, podrá considerarse que la  $C(E)L_{50}$  a efectos de clasificación es superior a la solubilidad en agua medida. En esas circunstancias, habrá que decidir si la sustancia debe clasificarse en la categoría de peligro crónico 4. Al decidir que la sustancia no presenta toxicidad aguda, habrá que tener en cuenta las técnicas usadas para lograr concentraciones disueltas máximas. Si esas técnicas no se consideran adecuadas, el ensayo deberá reputarse no válido para la clasificación;
- c) cuando la solubilidad en agua sea inferior al límite de detección del método analítico en una sustancia, y se observe toxicidad aguda, podrá considerarse a los efectos de clasificación que la  $C(E)L_{50}$  es inferior al límite de detección analítica. Cuando no se observe toxicidad, podrá considerarse la  $C(E)L_{50}$  superior a la solubilidad en agua. También deberían tenerse en cuenta los criterios de calidad mencionados antes;
- d) cuando se disponga de datos de toxicidad crónica, deberán aplicarse las mismas reglas generales. Del mismo modo, cuando esos datos no puedan validarse en razón de las concentraciones medidas, habrá que recurrir a técnicas apropiadas para obtener las concentraciones máximas disueltas.

#### A9.3.5.8 *Otros factores que contribuyen a la disminución de la concentración*

Otros factores diversos pueden contribuir también a que disminuya la concentración y, si bien algunos pueden evitarse con un diseño correcto del estudio, en algunas ocasiones será necesario interpretar los datos cuando intervengan esos factores:

- a) sedimentación: puede ocurrir durante un ensayo por diversos motivos. Una explicación habitual es que la sustancia no se ha disuelto bien a pesar de la ausencia aparente de partículas, y se produce una aglomeración durante el ensayo que conduce a una precipitación. En esas circunstancias, podrá tomarse, a efectos de clasificación, la  $C(E)L_{50}$  o la CSEO basada en la concentración al final del ensayo. Del mismo modo, puede haber una precipitación mediante una reacción con el medio. Se considerará entonces como un caso de inestabilidad del que ya se ha hablado;
- b) adsorción: puede registrarse en sustancias con características intensas de adsorción tales como las que tienen un valor alto de  $\log K_{ow}$ . Cuando esto ocurre, la pérdida de concentración suele ser rápida y las concentraciones al final del ensayo pueden constituir el mejor valor para caracterizar la exposición;
- c) bioacumulación: pueden producirse mermas por bioacumulación de una sustancia en los organismos de ensayo. Ese hecho puede revestir mucha importancia cuando la solubilidad en agua sea baja y el  $\log K_{ow}$ , por consiguiente, alto. A los efectos de clasificación, se podrá calcular la  $C(E)L_{50}$  o la CSEO basándose en la media geométrica de las concentraciones al principio y al final del ensayo.

#### A9.3.5.9 *Perturbación del medio de ensayo*

A9.3.5.9.1 Las bases y los ácidos fuertes pueden parecer tóxicos ya que pueden modificar el pH. Por lo general, sin embargo, cambios del pH en sistemas acuáticos se previenen normalmente mediante sistemas de tamponamiento en el medio de ensayo. Si no se dispone de datos sobre una sal, ésta debería generalmente clasificarse del mismo modo que el anión o catión, es decir, como el ión que recibe la clasificación más severa. Si la concentración para la que se observa un efecto guarda relación únicamente con uno de los iones, la clasificación de la sal deberá tomar en consideración la diferencia de masa molecular entre ella y el ión y corregir esa concentración multiplicándola por el cociente  $MM_{sal}/MM_{ion}$ .

A9.3.5.9.2 Los polímeros no están normalmente presentes en los sistemas acuáticos. Los polímeros dispersables y otras materias de masa molecular elevada pueden perturbar el sistema de ensayo, interferir con el consumo de oxígeno y provocar efectos mecánicos o secundarios. Esos factores deberán tenerse presentes al considerar los datos de esas sustancias. Muchos polímeros se comportan como sustancias complejas, sin embargo, y tienen una fracción de masa molecular bastante baja que puede lixiviarse a partir de la masa del polímero. De ese particular se habla más adelante.

#### A9.3.5.10 *Sustancias complejas*

A9.3.5.10.1 Las sustancias complejas se caracterizan por toda una gama de estructuras químicas, frecuentemente en series homólogas, pero que presentan valores de solubilidad en agua u otros rasgos fisicoquímicos muy variables. Al agregarse agua, se obtiene un equilibrio entre las fracciones disueltas y no disueltas que serán características de la cantidad de sustancia introducida. Por ese motivo, ensayos con sustancias complejas suelen hacerse en forma WSF o WAF y la  $C(E)L_{50}$  registrada se basará en las concentraciones de carga o nominales. Normalmente no se dispondrá de datos analíticos de apoyo, ya que la fracción disuelta será ella misma una mezcla compleja de componentes. A veces se denomina  $NCL_{50}$  el parámetro de toxicidad, es decir, el nivel letal. El nivel de carga de la WSF o WAF podrá usarse directamente para la clasificación.

A9.3.5.10.2 Los polímeros representan un caso particular de sustancia compleja, que requieren considerar el tipo de polímero y su comportamiento en disolución/dispersión. Los polímeros pueden disociarse en cuanto tales sin cambios (solubilidad real relacionada con el tamaño de las partículas), ser dispersables o disociarse en porciones que consisten en fracciones de baja masa molecular. En ese último

caso, en efecto, el ensayo con un polímero es una prueba de la capacidad de la fracción de masa molecular baja de separarse de la masa polimerizada por lixiviación, y una indicación de si ese lixiviado es tóxico. El polímero podrá así considerarse del mismo modo que una mezcla compleja, en la medida en que la cantidad del mismo que se someta a ensayo constituye el mejor medio de caracterizar el producto de lixiviación resultante, por lo que la toxicidad podrá referirse a esa cantidad.

**Tabla A9.3.1: Clasificación de sustancias difíciles de someter a ensayo**

<b>Propiedad</b>	<b>Índole de la dificultad</b>	<b>Interés para la clasificación</b>
Poco soluble en agua	Obtener/mantener la concentración de exposición necesaria. Analizar la fase de exposición.	Si se observan respuestas tóxicas por encima de la solubilidad aparente, será necesaria la opinión de los expertos para confirmar si esos efectos se deben a una toxicidad química o a un efecto físico; si no se observa ningún efecto, habrá que demostrar que ha alcanzado la saturación total de la sustancia en la fase acuosa.
Toxicidad de baja concentración	Obtener/mantener la concentración de exposición necesaria. Analizar la fase de exposición.	Clasificación sobre la base de una toxicidad < 1 mg/l
Volátil	Mantener y medir la concentración de exposición.	La clasificación debe realizarse sobre la base de medidas fiables de las concentraciones.
Fotodegradable	Mantener la concentración de exposición. Toxicidad de los productos de descomposición.	La clasificación requiere la opinión de los expertos y ha de efectuarse sobre la base de concentraciones medidas. Deberá caracterizarse la toxicidad de los productos de descomposición importantes.
Inestable en disolución acuosa	Mantener la concentración de exposición. Toxicidad de los productos de descomposición. Comparar los valores experimentales de la vida media de degradación determinados a partir de ensayos efectuados con regímenes de exposición diferentes.	La clasificación requiere la opinión de los expertos y ha de efectuarse sobre la base de concentraciones medidas. Deberá caracterizarse la toxicidad de los productos de descomposición importantes.
Oxidable	Obtener, mantener y medir la concentración de exposición. Toxicidad de las estructuras químicas modificadas o de los productos de descomposición. Comparar los valores experimentales de la vida media de degradación determinados a partir de ensayos efectuados con regímenes de exposición diferentes	La clasificación requiere la opinión de los expertos y ha de efectuarse sobre la base de concentraciones medidas. Deberá caracterizarse la toxicidad de los productos de descomposición importantes.
Sujeto a la corrosión /transformación (metales/compuestos metálicos)	Obtener, mantener y medir la concentración de exposición. Comparar los valores experimentales de la vida media de degradación determinados a partir de ensayos efectuados con regímenes de exposición diferentes.	La clasificación requiere la opinión de los expertos y ha de efectuarse sobre la base de concentraciones medidas. Deberá caracterizarse la toxicidad de los productos de descomposición importantes.
Biodegradable	Mantener la concentración de exposición. Toxicidad de los productos de descomposición. Comparar los valores experimentales de la vida media de degradación determinados a partir de ensayos efectuados con regímenes de exposición diferentes.	La clasificación requiere la opinión de los expertos y ha de efectuarse sobre la base de concentraciones medidas. Deberá caracterizarse la toxicidad de los productos de descomposición importantes.
Adsorbente	Mantener la concentración de exposición. Analizar la exposición. Atenuación de la toxicidad debida a una	La clasificación debe basarse en la medición de la concentración del producto disponible.

<b>Propiedad</b>	<b>Índole de la dificultad</b>	<b>Interés para la clasificación</b>
	disponibilidad reducida de la sustancia de ensayo.	
Agente quelante	Distinguir las fracciones queladas y no queladas en el medio.	La clasificación debe utilizar la medición de la concentración del producto biodisponible.
Coloreado	Atenuación de la luz (problema con las algas).	La clasificación debe distinguir los efectos tóxicos de la reducción de crecimiento debida a la atenuación de la luz.
Hidrófobo	Mantener la concentración de exposición a un nivel constante.	La clasificación debe basarse en la concentración medida.
Ionizado	Mantener la concentración de exposición. Toxicidad de los productos de descomposición. Comparar los valores experimentales de la vida media de degradación determinados a partir de ensayos efectuados con regímenes de exposición diferentes	La clasificación requiere la opinión de los expertos y ha de efectuarse sobre la base de concentraciones medidas. Deberá caracterizarse la toxicidad de los productos de descomposición importantes.
Sustancias y preparados multi-componentes	Preparar lotes de ensayo representativos.	Se considera del mismo modo que una mezcla compleja.

### **A9.3.6 Interpretación de la calidad de los datos**

#### **A9.3.6.1 Normalización**

Son muchos los factores que pueden influir en los resultados de los ensayos de toxicidad con organismos acuáticos. Esos factores comprenden características del agua de ensayo, diseño de éste, las características químicas del material del experimento y los rasgos biológicos de los organismos del ensayo. Por lo tanto, al hacer ensayos de toxicidad acuática es importante usar procedimientos normalizados que reduzcan la influencia de esas fuentes de variabilidad externa. El objetivo de la normalización de los ensayos y de la armonización internacional de esas normas es reducir la variabilidad de los ensayos y mejorar la precisión, la reproducibilidad y la coherencia de los resultados.

#### **A9.3.6.2 Jerarquía de los datos**

A9.3.6.2.1 La clasificación deberá basarse en datos primarios de buena calidad. Se preferirán los que se ajusten a las Directrices de la OCDE o sus equivalentes y a las buenas prácticas de laboratorio (BPL). Si bien son preferibles los datos obtenidos con métodos internacionalmente armonizados aplicados a especies normalizadas, también se pueden utilizar resultados de ensayos hechos con métodos nacionales o internacionales ampliamente reconocidos o sus equivalentes, como, por ejemplo, los métodos ISO o ASTM. Los datos de ensayos que parezcan conformarse a directrices aceptadas, pero que no se ajusten a una BPL, pueden usarse en ausencia de datos pertinentes obtenidos con buenas prácticas de laboratorio.

A9.3.6.2.2 Pedersen y *al.* (1995) proponen un sistema de evaluación de la calidad de los datos compatible con muchos otros sistemas actualmente vigentes, incluidos los usados por US-EPA para su base de datos AQUIRE. Véase también Mensink *et al.* (1995) para un estudio de la calidad de los datos. El sistema descrito en Pedersen *et al.* comprende un esquema de evaluación de la fiabilidad que puede utilizarse como modelo para la clasificación en el sistema armonizado. Los tres primeros niveles descritos por Pedersen son los datos preferidos.

A9.3.6.2.3 Los datos que sirven para la clasificación en el sistema armonizado deben proceder de fuentes primarias. No obstante, como muchas naciones y autoridades con competencias en reglamentación harán la clasificación recurriendo al sistema globalmente armonizado, la clasificación debería permitir la utilización de revisiones de autoridades nacionales y grupos de expertos, siempre que dichas revisiones se basen en fuentes primarias. En tales estudios deberían figurar resúmenes de las condiciones de ensayo, con el suficiente detalle para sopesar la información y decidir la clasificación. Una posibilidad es recurrir a estudios hechos por un grupo reconocido, tal como el GESAMP, en el que se usan fuentes primarias.

A9.3.6.2.4 A falta de datos experimentales, se pueden usar las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) validadas para la toxicidad acuática. Sin embargo, siempre que sean fiables, los datos de los ensayos gozarán de preferencia respecto de las previsiones del tipo QSAR.

## **A9.4 Degradación**

### **A9.4.1 *Introducción***

A9.4.1.1 La degradabilidad es una de las principales propiedades intrínsecas de las sustancias que determinan su posible peligro para el medio ambiente. Las sustancias no degradables persisten en el medio y, por consiguiente, tienen el potencial de causar efectos adversos a largo plazo sobre el biotopo. En cambio, las sustancias degradables pueden eliminarse por desagües, en estaciones de tratamiento de aguas residuales o en el medio ambiente.

La clasificación de las sustancias se basa principalmente en sus propiedades intrínsecas. Sin embargo, la mayor o menor degradación dependerá no sólo de la resistencia intrínseca a la degradación de la molécula, sino también de las condiciones reales del medio receptor, como, por ejemplo, el potencial redox, el pH, la presencia de microorganismos adecuados, la concentración de la propia sustancia y la aparición y concentración de otros sustratos. Interpretar las propiedades de degradación en un contexto de clasificación de los peligros acuáticos requiere, por tanto, criterios detallados que equilibren las propiedades intrínsecas de la sustancia y las condiciones vigentes del medio en las conclusiones sobre el potencial de los efectos adversos a largo plazo. El propósito de esta sección es presentar indicaciones para interpretar los datos sobre la degradabilidad de sustancias orgánicas. Las indicaciones se basan en un análisis de los aspectos antes mencionados sobre la degradación en el medio ambiente acuático. Entre las orientaciones que se proponen figura un esquema de decisión detallado para usar los datos existentes de degradación. Los datos de esa índole que figuran en el documento guía son los de biodegradabilidad rápida; los de simulación para la transformación en agua, sedimentos acuáticos y el suelo; los datos sobre la relación DBO<sub>5</sub>/DQO; y las técnicas para estimar la degradabilidad rápida en el medio acuático. También se examinan la degradabilidad anaeróbica, la biodegradabilidad intrínseca, los datos de ensayos de simulación de estaciones de depuración de aguas residuales, los relativos a transformaciones abióticas tales como hidrólisis y fotólisis, los procesos de eliminación como la volatilización y, por último, los datos obtenidos en investigaciones sobre el terreno y estudios de supervisión.

A9.4.1.2 El término degradación se define en el capítulo 4.1 como la descomposición de moléculas orgánicas en moléculas más pequeñas y finalmente en dióxido de carbono, agua y sales. Para los compuestos inorgánicos y los metales, el concepto de degradabilidad tal como se aplica a los compuestos orgánicos no tiene sentido. Más bien, la sustancia puede transformarse por procesos ambientales normales, de suerte que la biodisponibilidad de las especies tóxicas aumenta o disminuye. Por tanto, esta sección trata sólo de sustancias orgánicas u organometálicas. En la sección A9.7 se examina el reparto ambiental desde un medio acuoso hacia otros compartimentos.

A9.4.1.3 Los datos sobre propiedades de degradación pueden provenir de ensayos normalizados o de otros tipos de investigación, o estimarse a partir de la estructura de las moléculas. La interpretación de esos datos de degradación con fines de clasificación requiere a menudo una evaluación detallada de los datos de los ensayos. En esta sección se dan indicaciones y se pueden encontrar más detalles en dos apéndices que describen los métodos disponibles (Apéndice A9.I) y los factores que influyen en la degradación en el medio ambiente acuático (Apéndice A9.II).

### **A9.4.2 *Interpretación de los datos de degradabilidad***

#### **A9.4.2.1 *Degradabilidad rápida***

La clasificación de los peligros de las sustancias se basa normalmente en los datos existentes sobre sus propiedades ambientales. Pocas veces los ensayos suministrarán información cuya finalidad principal sea facilitar una clasificación. Muchas veces se dispone de un amplio rango de datos que no responden necesariamente a los criterios de clasificación. En consecuencia, es necesario disponer de orientaciones para interpretar las pruebas en el contexto de la clasificación de peligros acuáticos. Basándose en los criterios armonizados, a continuación se dan indicaciones para interpretar los datos de degradación en

los tres tipos de información a que se refiere la expresión “degradación rápida” en el medio acuático (véanse A9.1.8, A9.1.9, A9.1.2.3.1 a A9.2.3.4 y la definición del párrafo 4.1.2.11.3 del capítulo 4.1).

#### A9.4.2.2 *Biodegradabilidad fácil*

A9.4.2.2.1 La biodegradabilidad fácil se define en la Directriz 301 de la OCDE (OCDE, 1992). Todas las sustancias orgánicas que se degraden en un nivel superior al del punto umbral en un ensayo de biodegradabilidad fácil normalizado con arreglo a las pautas de la OCDE o en un ensayo similar deberían considerarse susceptibles de biodegradación fácil y, por lo tanto, también degradables rápidamente. En muchos de los datos que figuran en trabajos publicados, sin embargo, no se especifican todas las condiciones que habría que evaluar para demostrar si un ensayo cumple o no los requisitos de un ensayo de biodegradabilidad fácil. Se requiere, por tanto, la opinión de los expertos sobre la validez de los datos antes de usarlos con fines de clasificación. Con todo, antes de llegar a una conclusión sobre la biodegradabilidad fácil de una sustancia sometida a ensayo, deberían considerarse al menos los parámetros siguientes.

##### A9.4.2.2.2 Concentración de la sustancia de ensayo

En los ensayos de biodegradabilidad fácil indicados por la OCDE se usan concentraciones relativamente altas de la sustancia sometida a ensayo (2 a 100 mg/l). Muchas sustancias, sin embargo, pueden ser tóxicas para los inóculos en concentraciones tan elevadas provocando una baja degradación en los ensayos aunque las sustancias puedan ser degradables rápidamente en concentraciones no tóxicas inferiores. Un ensayo de toxicidad con microorganismos (como, por ejemplo, el de la Directriz 209 de la OCDE sobre inhibición de la respiración con lodos activados, el de inhibición de la nitrificación ISO 9509 o el de inhibición de la luminiscencia de bacterias ISO 11348) puede demostrar la toxicidad de la sustancia de ensayo. Cuando sea probable que la inhibición constituya la razón de que una sustancia no se degrade con facilidad, deberían usarse, si están disponibles, los resultados de un ensayo con concentraciones no tóxicas inferiores de dicha sustancia. Cabría entonces establecer, caso por caso, una relación entre esos resultados y los criterios de clasificación sobre la degradación rápida, aunque se prefieran en general resultados de ensayos de degradación obtenidos con aguas superficiales, con una concentración en biomasa realista desde el punto de vista ambiental y concentraciones bajas de la sustancia sometida a ensayo, que serán así realistas.

##### A9.4.2.2.3 Intervalo de tiempo

Entre los criterios armonizados (véase 4.1.2.11.3) figura un requisito general para todos los ensayos de biodegradabilidad fácil, que consiste en alcanzar el nivel umbral en menos de 10 días. Esto no se corresponde con la Directriz 301 de la OCDE, en la que en el intervalo de 10 días se aplica a los ensayos de biodegradabilidad fácil, con la excepción del ensayo MITI I (Directriz 301C de la OCDE). En una prueba en vaso cerrado (Directriz 301D de la OCDE), cabe usar en su lugar un intervalo de 14 días cuando no se hayan logrado mediciones al cabo de 10 días. Asimismo, a menudo sólo se dispone de información limitada en las referencias de los ensayos de biodegradación. Así, en la práctica, si no se dispone de información en el plazo de 10 días, puede utilizarse directamente para evaluar la biodegradabilidad fácil el porcentaje de degradación alcanzado al cabo de 28 días. Esta solución, sin embargo, sólo debería aceptarse para los datos de ensayo existentes y para los ensayos en los que no se pueda aplicar el plazo de 10 días.

Cuando esté suficientemente justificado, deberá suprimirse la condición de los 10 días para las sustancias complejas de componentes múltiples y aplicarse el criterio de los 28 días. Los constituyentes de estas sustancias pueden tener cadenas de diferente longitud, y distintos grados y/o sitios de ramificación o estereoisómeros, incluso en las formas comerciales más purificadas. Someter a ensayo cada componente individual puede ser oneroso y poco práctico. Si se realiza un ensayo con una sustancia compleja de componentes múltiples y se prevé que está teniendo lugar una biodegradación secuencial de las distintas estructuras, no deberá aplicar la condición de los 10 días para interpretar los resultados del ensayo. En cambio, deberá evaluarse caso por caso si un ensayo de la biodegradabilidad de cada sustancia proporcionaría información útil sobre su biodegradabilidad como tal (es decir, sobre la degradabilidad de todos los componentes) o si debería efectuarse en cambio una investigación de la degradabilidad de algunos componentes cuidadosamente seleccionados de la sustancia compleja de componentes múltiples.

#### A9.4.2.3 *DBO<sub>5</sub>/DQO*

La información sobre la demanda bioquímica de oxígeno en 5 días (DBO<sub>5</sub>) se utilizará a efectos de clasificación sólo cuando no se disponga de otros datos cuantitativos de la degradabilidad. Así, se dará preferencia a los datos de ensayos de biodegradabilidad fácil y a los estudios de simulación sobre la degradabilidad en el medio ambiente acuático. El ensayo de DBO<sub>5</sub>, que es un ensayo clásico de biodegradabilidad, ha sido sustituido hoy en día por los ensayos de biodegradabilidad fácil. Por tanto, no debería utilizarse en la actualidad para evaluar la biodegradabilidad fácil de una sustancia. Sin embargo, los datos antiguos pueden aprovecharse cuando no se disponga de otros sobre la biodegradabilidad. En las sustancias cuya estructura química se conozca, se puede calcular la demanda teórica de oxígeno (DTO) y este valor deberá utilizarse en lugar de la demanda química de oxígeno (DQO).

#### A9.4.2.4 *Otra información científica convincente*

A9.4.2.4.1 La degradación rápida en el medio ambiente acuático puede demostrarse con otros datos distintos de los que se mencionan en los apartados a) y b) del párrafo 4.1.2.11.3 del capítulo 4.1, como datos sobre la degradación biótica y/o abiótica. Los datos de degradación primaria sólo podrán usarse cuando se demuestre que los productos de degradación no deben clasificarse en las categorías de peligro para el medio ambiente acuático, es decir, que no cumplen los criterios de clasificación.

A9.4.2.4.2 Para que se cumpla el criterio del párrafo 4.1.2.11.3 c) se requiere que la sustancia se degrade más del 70 % en el medio acuático en 28 días. Si se supone una cinética de orden 1, lo que es razonable para las bajas concentraciones observadas en casi todos los medios ambientes acuáticos, la tasa de degradación será relativamente constante durante ese período de 28 días. Así, se cumplirá el requisito de degradación con una tasa media constante,  $k > -(\ln 0,3 - \ln 1)/28 = 0,043 \text{ día}^{-1}$ . Esto corresponde a una vida media de degradación,  $t_{1/2} < \ln 2/0,043 = 16 \text{ días}$ .

A9.4.2.4.3 Además, como los procesos de degradación dependen de la temperatura, también debería tomarse en cuenta este parámetro al calcular la degradación en el medio. En la evaluación deberían usarse datos de estudios hechos a temperaturas ambientalmente realistas. Cuando haya que comparar datos de estudios realizados a temperaturas diferentes, podrá usarse el planteamiento tradicional Q10, que supone que la tasa de degradación se divide por dos cuando la temperatura disminuye 10 °C.

A9.4.2.4.4 Para determinar si los datos cumplen este criterio, convendrá interpretar los resultados caso por caso. No obstante, más adelante se dan indicaciones para interpretar los diversos tipos de datos que cabe emplear para demostrar una degradación rápida en el medio ambiente acuático. Por lo general, sólo los datos de ensayos de simulación de biodegradación acuática se consideran directamente aplicables. Con todo, cabría considerar también datos de ensayos de simulación de otros compartimentos ambientales, pero esos datos requieren en general un estudio más científico antes de poder ser utilizados.

#### A9.4.2.4.5 *Ensayos de simulación acuática*

Son los ensayos que se hacen en laboratorio, pero simulando condiciones ambientales y empleando muestras naturales como inóculo. A efectos de clasificación podrán usarse directamente resultados de ensayos de simulación acuática cuando esos ensayos simulen condiciones ambientales realistas de aguas superficiales, a saber:

- a) una concentración de la sustancia que sea realista para el medio acuático general (a menudo del orden de µg/l);
- b) un inóculo de un medio acuático pertinente;
- c) una concentración realista del inóculo ( $10^3$  a  $10^6$  células/ml);
- d) una temperatura realista (por ejemplo, 5 a 25 °C); y
- e) una determinación de la degradación última (es decir, la tasa de mineralización o la tasa de degradación individuales para el conjunto de la vía de degradación).

Las sustancias que en esas condiciones se degraden al menos un 70 % en 28 días, es decir, con una vida media de degradación < 16 días, se considerarán degradables rápidamente.

#### A9.4.2.4.6 Estudios sobre el terreno

Paralelamente a los ensayos de simulación en laboratorio, existen investigaciones sobre el terreno o experimentos en mesocosmos. En esos estudios, se puede investigar la evolución y/o los efectos de los productos químicos en distintos medios o nichos ambientales. Los datos sobre la evolución de un producto obtenidos con esos experimentos podrán usarse para evaluar el potencial de degradación rápida. Esto, sin embargo, será muchas veces difícil, ya que requiere que se pueda demostrar una degradación última. Esto puede documentarse preparando balances máxicos que muestren que no se forman intermediarios no degradables y teniendo en cuenta las fracciones eliminadas del sistema acuoso bajo el efecto de otros procesos como la adsorción en los sedimentos o la volatilización a partir del medio ambiente acuático.

#### A9.4.2.4.7 Datos de comprobación

Los datos de comprobación pueden demostrar la eliminación de contaminantes del medio ambiente acuático. Esos datos son, sin embargo, muy difíciles de utilizar a efectos de clasificación. Antes, será necesario responder a las preguntas siguientes:

- a) ¿Es la eliminación un resultado de la degradación, o bien es consecuencia de otros procesos tales como la dilución o distribución entre compartimentos (adsorción, volatilización)?
- b) ¿Se excluye la formación de intermediarios no degradables?

Sólo cuando pueda demostrarse que la eliminación como resultado de la degradación última cumple los criterios de degradabilidad rápida, tales datos podrán usarse para la clasificación. Por lo general, los datos de comprobación deberían únicamente emplearse para respaldar la demostración de una persistencia en el medio acuático o de una degradación rápida.

#### A9.4.2.4.8 Ensayos de biodegradabilidad intrínseca

Las sustancias que se degradan más del 70 % en los ensayos de biodegradabilidad intrínseca (Directriz 302 de la OCDE) tienen un potencial de biodegradación última. Sin embargo, a causa de las condiciones óptimas de esos ensayos, no puede suponerse la biodegradabilidad rápida de sustancias intrínsecamente biodegradables en el medio. Las condiciones óptimas de los ensayos de biodegradabilidad intrínseca estimulan la adaptación de los microorganismos aumentando así el potencial de biodegradación, en comparación con medios naturales. Por lo tanto, en general, unos resultados positivos no deberían interpretarse como una prueba de degradación rápida en el medio<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> En relación con la interpretación de los datos de degradación que cumplan los criterios armonizados de la OCDE para la categoría de peligro crónico 4, el grupo de trabajo permanente de la UE está examinando la posibilidad de utilizar ciertos tipos de datos procedentes de ensayos de biodegradabilidad intrínseca en una evaluación caso por caso, como base para la no clasificación de sustancias que por lo demás cumplen ese criterio de degradación.

Los ensayos de biodegradabilidad intrínseca de que se trata son el ensayo Zahn Wellens (LD OCDE 302B) y el ensayo MITI II (LD OCDE 302 C). Las condiciones de utilización son:

- a) Los métodos no deben emplear microorganismos preexpuestos (preadaptados).
- b) La duración de la adaptación en cada ensayo deberá ser limitada, el punto final del ensayo sólo deberá referirse a la mineralización y el nivel umbral, así como el tiempo necesario para alcanzar ese nivel, deberán ser respectivamente:
  - i) nivel umbral del ensayo MITI II > 60 % en un período de 14 días.
  - ii) nivel umbral del ensayo Zahn Wellens > 70 % en un período de 7 días.



#### A9.4.2.4.9 Ensayos de simulación de estaciones de depuración de aguas residuales

Los resultados de ensayos que simulen las condiciones de funcionamiento de una estación de depuración de aguas residuales (por ejemplo, la Directriz 303 de la OCDE) no pueden utilizarse para evaluar la degradación en el medio ambiente acuático. Los motivos principales de ello son que la biomasa microbiana de una estación de depuración (plantas de tratamientos de aguas residuales) es muy diferente de la biomasa presente en el medio ambiente, que la composición de los sustratos difiere mucho, y que la presencia de materias orgánicas mineralizadas rápidamente en las aguas residuales facilita la degradación de la sustancia de ensayo por co-metabolismo.

#### A9.4.2.4.10 Datos de degradación en el suelo y los sedimentos

Se ha sostenido que para muchas sustancias no adsorbentes (no lipófilas), se encuentran tasas de degradación más o menos idénticas en el suelo y en las aguas superficiales. En las sustancias lipófilas, la tasa de degradación será por lo general más baja en el suelo que en el agua, por causa de la inmovilización parcial provocada por la adsorción. Así, cuando un estudio de simulación haya demostrado que una sustancia se degrada rápidamente en el suelo, es muy probable que eso mismo ocurra en el medio ambiente acuático. Se admite que cuando se observa una degradación rápida en el suelo por vía experimental, se tendrá también una degradación rápida en las aguas superficiales a condición de que:

- a) no se haya registrado ninguna preexposición (preadaptación) de los organismos presentes en el suelo;
- b) se haga el ensayo con una concentración de la sustancia ambientalmente realista; y
- c) la sustancia presente una degradación última en 28 días con una vida media  $< 16$  días, correspondiente a una tasa de degradación  $> 0,043 \text{ días}^{-1}$ .

La misma argumentación se considera válida para datos sobre degradación de sustancias en sedimentos en condiciones aeróbicas.

#### A9.4.2.4.11 Datos de degradación anaeróbica

Los datos sobre la degradación anaeróbica no pueden usarse para decidir si una sustancia debe reputarse como rápidamente degradable, ya que el medio ambiente acuático se suele considerar como el compartimento aeróbico donde viven los organismos acuáticos, tales como los que se emplean para clasificar los peligros acuáticos.

#### A9.4.2.4.12 Hidrólisis

Los datos sobre hidrólisis (por ejemplo, la Directriz 111 de la OCDE) sólo pueden tenerse en cuenta para la clasificación cuando la vida media más pequeña  $t_{1/2}$  determinada en el rango de pH 4 a 9 es inferior a 16 días. Sin embargo, la hidrólisis no es una degradación última y pueden formarse diversos productos de degradación intermedios, de los que algunos únicamente pueden degradarse lentamente. Sólo podrán considerarse los estudios de hidrólisis cuando se demuestre satisfactoriamente que los productos de la hidrólisis no cumplen los criterios de clasificación de peligro para el medio ambiente acuático.

Cuando una sustancia se hidrolice rápidamente (por ejemplo, con  $t_{1/2} < \text{unos pocos días}$ ), ese proceso formará parte de la degradación determinada en los ensayos de biodegradación. La hidrólisis puede ser el proceso inicial de transformación en biodegradación.

#### A9.4.2.4.13 Degradación fotoquímica

La información sobre degradación fotoquímica (por ejemplo, OCDE, 1997) es difícil de usar en la clasificación. La mayor o menor degradación fotoquímica en el medio ambiente acuático dependerá de condiciones locales (como la profundidad del agua, las materias sólidas en suspensión, la turbidez) y el peligro de los productos de degradación por lo general no se conocerá. Lo probable es que pocas veces se disponga de información suficiente para una evaluación detenida basada en la degradación fotoquímica.

#### A9.4.2.4.14 Estimación de la degradación

A9.4.2.4.14.1 Se han establecido ciertas relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) para predecir un valor aproximado de la vida media de hidrólisis, valor que sólo debe tenerse en cuenta a falta de datos experimentales. No obstante, ese valor únicamente puede usarse con mucha prudencia en la clasificación, ya que la hidrólisis no refleja la degradabilidad última (véase el apartado sobre hidrólisis en esta sección). Asimismo, las QSAR desarrolladas hasta ahora tienen una aplicación más bien limitada y sirven únicamente para predecir el potencial de hidrólisis en un número limitado de categorías químicas. Por ejemplo, el programa de datos QSAR bautizado HYDROWIN (versión 1.67, *Syracuse Research Corporation*) sólo puede predecir el potencial de hidrólisis para menos de 20 % de las sustancias que poseen una estructura molecular (precisa) definida y catalogada por la UE (Niemelä, 2000).

A9.4.2.4.14.2 Por lo general, ningún método de estimación cuantitativa (QSAR) para calcular la biodegradabilidad de sustancias orgánicas es todavía suficientemente preciso para predecir la degradación rápida. Con todo, los resultados de esos métodos pueden usarse para predecir que una sustancia no es rápidamente degradable. Por ejemplo, cuando en el Programa de Probabilidad de Biodegradación BOWIN (versión 3.67, *Syracuse Research Corporation*) la probabilidad estimada por métodos lineales o no lineales sea  $< 0,5$ , las sustancias deberían considerarse no degradables rápidamente (OCDE, 1994; Pedersen *et al.*, 1995 y Langenberg *et al.*, 1996). También se puede recurrir a otros métodos (Q)SAR, así como al dictamen de los expertos, por ejemplo cuando se disponga de datos de degradación para compuestos estructuralmente análogos, pero tales dictámenes deberán hacerse con mucho cuidado. Generalmente, se considera que una predicción mediante las QSAR de que una sustancia no es rápidamente degradable resulta preferible para establecer la categoría de la sustancia que hacer una clasificación por defecto cuando no se dispone de datos útiles de degradación.

#### A9.4.2.4.15 Volatilización

Los productos químicos pueden eliminarse de ciertos medios acuáticos por volatilización. El potencial intrínseco de volatilización viene determinado por la constante de la ley de Henry (H) de la sustancia. La volatilización a partir del medio ambiente acuático dependerá mucho de las condiciones ambientales de la masa acuática de que se trate, tales como la profundidad del agua, los coeficientes de intercambio de los gases (que dependen de la velocidad del viento y del caudal del agua) y de la estratificación de la masa hídrica. Como la volatilización sólo refleja la desaparición de una sustancia química de la fase acuosa, la constante de la ley de Henry sólo puede utilizarse como una evaluación de la degradación a efectos de clasificar las sustancias según el peligro que entrañan para el medio ambiente acuático. En este particular, cabría sin embargo estudiar más a fondo la cuestión de las sustancias que se encuentran en fase gaseosa a temperatura ambiente (véase también Pedersen *et al.*, 1995).

#### A9.4.2.5 Ausencia de datos de degradación

Cuando no se disponga de datos útiles sobre la degradabilidad – determinados, bien experimentalmente, bien por estimación – la sustancia debería considerarse no degradable rápidamente.

### A9.4.3 Problemas generales de interpretación

#### A9.4.3.1 Sustancias complejas

Los criterios armonizados para clasificar los productos químicos peligrosos para el medio ambiente acuático se centran en sustancias individuales. Las sustancias con multicomponentes constituyen un tipo de sustancias intrínsecamente complejas. Suelen ser de origen natural y a veces necesitan examinarse. Tal puede ocurrir con sustancias químicas producidas o extraídas a partir de aceites minerales o materias vegetales. Esos complejos químicos se considerarán normalmente sustancias individuales en el contexto de la reglamentación. En la mayoría de los casos, se definen como una serie homóloga de sustancias con un rango variable de longitud de cadena y/o de grado de sustitución. Cuando esto ocurre, no podrá establecerse ninguna diferencia importante de degradabilidad y el nivel de ésta se establecerá mediante ensayos del producto químico complejo. Se podrá hacer una excepción cuando se manifieste una degradación marginal, ya que en ese caso puede que ciertas sustancias individuales se degraden rápidamente y otras no. Esta situación requiere una evaluación más detallada de la degradabilidad de los diferentes componentes de la

sustancia compleja. Si los componentes no degradables rápidamente representan una proporción importante de la sustancia compleja (por ejemplo, más del 20 % o, para un componente peligroso, un contenido aún menor), la sustancia deberá considerarse no degradable rápidamente.

#### A9.4.3.2 *Disponibilidad de la sustancia*

A9.4.3.2.1 La degradación de sustancias orgánicas en el medio ambiente se efectúa sobre todo en medios acuáticos y en las fases acuosas del suelo o de los sedimentos. La hidrólisis, claro está, requiere la presencia de agua, de la que depende por lo demás la actividad de los microorganismos. Asimismo, la biodegradación requiere que éstos estén directamente en contacto con la sustancia. La disolución de esta última en la fase acuosa que rodea a los microorganismos constituye, por tanto, el modo de contacto más directo entre las bacterias y hongos y el sustrato.

A9.4.3.2.2 Los métodos de ensayo normalizados que se utilizan en la actualidad para el estudio de la degradabilidad de las sustancias se han optimizado para sustancias de ensayo fácilmente solubles. Ahora bien, muchas sustancias orgánicas son sólo ligeramente solubles en agua. Como los ensayos normalizados requieren de 2 a 100 mg/l de sustancia de ensayo, quizá no se obtenga una disponibilidad suficiente para sustancias poco hidrosolubles. En tal caso, se cuenta a veces con métodos de ensayo con mezclas permanentes y/o una duración de exposición prolongada, o con ensayos de diseño especial que emplean concentraciones de la sustancia de ensayo inferiores a la solubilidad en el agua.

#### A9.4.3.3 *Duración del ensayo inferior a 28 días*

A9.4.3.3.1 En ocasiones se reconoce una degradación con los ensayos terminados antes del período de 28 días especificado en las normas (véase MITI, 1992). Esos datos pueden utilizarse directamente cuando se obtiene una degradación superior o igual al nivel umbral. Si se obtiene un nivel inferior, los resultados deberán interpretarse con cautela. Una posibilidad es que la duración del ensayo haya sido demasiado corta y que la estructura química se habría degradado en un ensayo de biodegradabilidad de 28 días. Si en un lapso de tiempo corto se produce una degradación sustancial, habrá que comparar esa situación con el criterio  $\text{DBO}_5/\text{DQO} \geq 0,5$  en las condiciones de ensayo de degradación de 10 días. En ese caso, una sustancia podrá considerarse fácilmente degradable (y, por lo tanto, rápidamente degradable), si:

- a) la biodegradabilidad última supera el 50 % al cabo de 5 días; o
- b) la tasa de degradación última constante en ese período es  $> 0,1 \text{ día}^{-1}$ , correspondiente a una vida media de 7 días.

A9.4.3.3.2 Esos criterios se proponen para asegurar una mineralización rápida, aunque el ensayo se termine antes de 28 días y antes de que se alcance el nivel umbral. La interpretación de los datos de ensayo que no se correspondan con los niveles umbral prescritos deberá hacerse con prudencia. Será imprescindible considerar si una biodegradabilidad inferior al nivel umbral se debe a una degradación parcial de la sustancia y no a una mineralización completa. Si la degradación parcial es la explicación probable de la biodegradabilidad observada, la sustancia deberá considerarse como no fácilmente biodegradable.

#### A9.4.3.4 *Biodegradación primaria*

En algunos ensayos, sólo se puede determinar la desaparición del compuesto parental (es decir, la degradación primaria) siguiendo, por ejemplo, la degradación mediante análisis químicos específicos de la sustancia ensayada o del grupo al que pertenezca. Sólo se podrán utilizar los datos de la biodegradabilidad primaria para evidenciar una degradabilidad rápida cuando sea posible demostrar de manera satisfactoria que los productos de degradación formados no cumplen los criterios de clasificación de las sustancias peligrosas para el medio ambiente acuático.

#### A9.4.3.5 *Resultados contradictorios de los ensayos preliminares*

A9.4.3.5.1 Cuando se disponga de varios datos de degradación para una misma sustancia, existirá la posibilidad de que los resultados sean contradictorios. Por lo general, en el caso de una sustancia con la que se hayan hecho ensayos en varias ocasiones con procedimientos de biodegradabilidad apropiados, las

contradicciones podrán resolverse recurriendo al “peso de la evidencia”. Esto significa que si en unas sustancias se han obtenido a la vez resultados positivos (es decir, una degradación superior al nivel umbral) y resultados negativos en ensayos de biodegradabilidad fácil, habrá que utilizar los datos de mejor calidad y los más documentados para determinar la biodegradabilidad fácil de la sustancia. Con todo, unos resultados positivos en ensayos de biodegradabilidad fácil podrán considerarse válidos con independencia de los resultados negativos, si su calidad científica es buena y las condiciones de ensayo están bien documentadas, es decir, si se han cumplido los criterios de las directrices, incluida la utilización de un inóculo no preexpuesto (no adaptado). Ninguno de los diversos ensayos preliminares se presta al estudio de todo tipo de sustancias, y habrá que evaluar con cuidado los resultados obtenidos con procedimientos adecuados para la sustancia de que se trate, antes de decidir cómo usarlos.

A9.4.3.5.2 Así, hay varios factores que pueden explicar unos datos de biodegradabilidad contradictorios en ensayos preliminares:

- a) inóculo;
- b) toxicidad de la sustancia ensayada;
- c) condiciones del ensayo;
- d) solubilidad de la sustancia; y
- e) volatilización de la sustancia.

A9.4.3.5.3 La capacidad del inóculo para degradar la sustancia en el ensayo dependerá de la presencia y cuantía de unos agentes de degradación competentes. Cuando se obtenga el inóculo a partir de un medio que se haya expuesto con anterioridad a la sustancia de ensayo, podrá adaptarse, tal como demuestra una capacidad de degradación superior a la de un inóculo de un medio no expuesto. En la medida de lo posible, el inoculum deberá obtenerse de un medio no expuesto, pero para sustancias que se emplean mucho en grandes cantidades, y liberadas a gran escala o de forma más o menos continua, esto puede resultar difícil o imposible. Cuando se obtengan resultados contradictorios, deberá comprobarse el origen del inóculo a fin de aclarar si se deben a diferencias en la adaptación de la comunidad microbiana.

A9.4.3.5.4 Tal como se dijo anteriormente, muchas sustancias pueden ser tóxicas o ejercer un efecto de inhibición respecto del inóculo en las concentraciones relativamente altas empleadas en los ensayos de biodegradabilidad fácil. Especialmente, en el ensayo MITI modificado (I) (Directriz 301C de la OCDE) y en el ensayo de espirometría manométrica (Directriz 301F de la OCDE) se prescriben concentraciones altas (100 mg/l). En el ensayo en vaso cerrado (Directriz 301D de la OCDE) se prescriben las concentraciones más bajas de la sustancia de ensayo con 2 a 10 mg/l. La posibilidad de efectos tóxicos podrá evaluarse con un control de toxicidad en el ensayo de biodegradabilidad fácil o comparando la concentración del ensayo con los datos de toxicidad para microorganismos, es decir, el ensayo de inhibición de la respiración (Directriz 209 de la OCDE), el de inhibición de la nitrificación (ISO 9509) o, si no se dispone de otros ensayos de toxicidad microbiana, el de inhibición de la bioluminiscencia (ISO 11348). Cuando se encuentren resultados contradictorios, podrán deberse a la toxicidad de la sustancia del ensayo. Si ésta no ejerce efectos inhibidores en concentraciones ambientalmente realistas, podrá usarse para la clasificación la mayor degradación medida en los ensayos preliminares. Si en esos casos se hacen ensayos de simulación, sus datos revestirán especial importancia, ya que puede haberse empleado una concentración baja sin efectos inhibidores, lo que daría una indicación más fidedigna de la vida media de biodegradación de la sustancia en condiciones ambientalmente realistas.

A9.4.3.5.5 Cuando la solubilidad de la sustancia ensayada sea inferior a la de las concentraciones empleadas en un ensayo, ese parámetro podrá ser el factor limitante de la degradación real medida. En esos casos, deberán prevalecer los resultados de los ensayos que empleen las concentraciones más bajas de la sustancia, es decir, esto se aplica frecuentemente con el ensayo en vaso cerrado (Directriz 301D de la OCDE). Por lo general, el ensayo de desaparición de la COD (Directriz 301A de la OCDE) y el preliminar modificado (Directriz 301E) no sirven para comprobar la biodegradabilidad de sustancias poco solubles (por ejemplo, la Directriz 301).

A9.4.3.5.6 Las sustancias volátiles sólo deberían someterse a ensayo en sistemas no abiertos como el ensayo en vaso cerrado (Directriz 301D de la OCDE), el MITI (I) (Directriz 301C) y el de respirometría manométrica (Directriz 301F). Los resultados de otros ensayos deberían evaluarse con cuidado y tenerse en cuenta sólo si cabe demostrar, por ejemplo mediante estimaciones de los balances másicos, que la eliminación de la sustancia de ensayo no es consecuencia de la volatilización.

#### A9.4.3.6 *Variación de los datos de ensayos de simulación*

Para productos químicos con un orden de prioridad elevado, cabe disponer de datos de ensayos de simulación. Muchas veces esos datos proporcionan un rango de vidas medias en medios ambientales como suelo, sedimentos y/o aguas superficiales. Las diferencias observadas en las vidas medias en ensayos de simulación hechos con una misma sustancia pueden reflejar discrepancias en las condiciones de los ensayos, todo lo cual sería pertinente desde el punto de vista del medio ambiente. Para la clasificación conviene elegir una vida media adecuada en el extremo superior de la serie de las medias vidas observadas en esos estudios, aplicando un proceder que se base en el peso de la evidencia y habida cuenta del realismo y la pertinencia de los ensayos con respecto a las condiciones ambientales. En general, los datos de los ensayos de simulación con aguas superficiales son preferibles a los de los ensayos de simulación con sedimentos acuáticos o suelos cuando se trata de evaluar la degradabilidad rápida en el medio ambiente acuático.

#### A9.4.4 *Esquema de la toma de decisiones*

Para facilitar las decisiones en materia de degradabilidad rápida en el medio ambiente acuático y de clasificación de productos químicos peligrosos para ese medio se puede usar el esquema de decisión siguiente como indicación general.

Una sustancia se considerará no degradable rápidamente a menos que se cumpla una de las condiciones siguientes:

- a) se demuestra que la sustancia es fácilmente biodegradable en un ensayo de 28 días sobre ese particular. El nivel umbral del ensayo (70 % del COD o consumo del 60 % de la demanda teórica de oxígeno) deberá alcanzarse en los 10 días siguientes al comienzo de la biodegradación, si los datos disponibles del ensayo permiten evaluar ese resultado. En caso contrario, habrá que evaluar el nivel umbral, de ser posible en un intervalo de tiempo de 14 días o después del final del ensayo; o
- b) se demuestre que la sustancia registra una degradación última en un ensayo de simulación en aguas superficiales<sup>3</sup>, con una vida media < 16 días (correspondiente a una degradación > 70 % en 28 días); o
- c) registra una degradación primaria (biótica o abiótica) en el medio acuático con una vida media < 16 días (correspondiente a una degradación > 70 % en 28 días) y los productos de degradación no cumplen los criterios de clasificación como sustancias peligrosas para el medio ambiente acuático.

Cuando no se disponga de esos datos, la degradación rápida podrá demostrarse si se cumple uno de los criterios siguientes:

- d) se demuestra que la sustancia registra una degradación última en un ensayo de simulación con sedimentos acuáticos o suelos<sup>3</sup>, con una vida media < 16 días (correspondiente a una degradación > 70% en 28 días); o
- e) cuando en aquellos casos en que sólo se disponga de datos sobre la DBO<sub>5</sub> y la DQO, el cociente entre ambas demandas sea  $\geq 0,5$ . El mismo criterio se aplica a los ensayos de biodegradabilidad fácil que duren menos de 28 días, si la vida media es < 7 días.

---

<sup>3</sup> Los ensayos de simulación deberían reflejar condiciones ambientales realistas tales como una baja concentración del producto químico, una temperatura realista y la utilización de una biomasa microbiana ambiente que no se haya sometido a una preexposición al producto químico.

Si no se dispone de ninguno de los datos anteriores se considerará que la sustancia no es rápidamente degradable. Esa decisión se verá corroborada si se cumple al menos uno de los criterios siguientes:

- i) la sustancia no es intrínsecamente degradable en un ensayo de biodegradabilidad intrínseca; o
- ii) se puede predecir que una sustancia se biodegrada lentamente mediante unas QSAR válidas y, por ejemplo, en el *Biodegradation Probability Program*, el resultado de degradación rápida (con un modelo lineal o no lineal) es  $< 0,5$ ; o
- iii) la sustancia se considera que no es rápidamente degradable basándose en información indirecta como, por ejemplo, el conocimiento de sustancias estructuralmente similares; o
- iv) no se dispone de más datos sobre la degradabilidad.

## **A9.5 Bioacumulación**

### **A9.5.1 Introducción**

A9.5.1.1 La bioacumulación es una de las propiedades intrínsecas importantes de las sustancias que determinan el potencial de peligro para el medio ambiente. La bioacumulación de una sustancia en un organismo no supone un peligro por sí misma, pero la bioconcentración y la bioacumulación entrañarán una carga corporal que podrá o no conducir a efectos tóxicos. En el sistema armonizado de clasificación de los peligros que suponen las sustancias para la salud humana y el medio ambiente (OCDE, 1998) figura la expresión “potencial de bioacumulación”. Sin embargo, habría que trazar una distinción entre bioconcentración y bioacumulación. Aquí la bioconcentración se define como el resultado neto de la absorción, transformación y eliminación de una sustancia en un organismo, como consecuencia de una exposición por vía acuática; mientras que la bioacumulación engloba todas las vías de exposición (aire, agua, sedimentos/suelo y alimentos). Por último, la biomagnificación se define como la acumulación y la transferencia de sustancias a través de la cadena alimenticia, produciéndose un aumento de las concentraciones internas en los organismos situados en los niveles más altos de la cadena trófica (Comisión Europea, 1996). Para la mayor parte de los productos químicos orgánicos se piensa que la absorción a partir del agua (bioconcentración) constituye la vía de absorción predominante. La absorción a través de alimentos sólo adquiere importancia en las sustancias muy hidrófobas. Por lo demás, los criterios de clasificación armonizados utilizan el factor de bioconcentración (o el coeficiente de reparto octanol-agua) como medida del potencial de bioacumulación. Por esos motivos, el presente documento guía sólo considera la bioconcentración y no tiene en cuenta la absorción a través de los alimentos o por otras vías.

A9.5.1.2 La clasificación de una sustancia se basa principalmente en sus propiedades intrínsecas. Sin embargo, el grado de bioconcentración dependerá también de factores tales como el grado de biodisponibilidad, la fisiología del organismo de ensayo, el hecho de que se mantenga una concentración de exposición constante, la duración de la exposición, el metabolismo en el interior del organismo de referencia y la excreción. La interpretación del potencial de bioconcentración a efectos de clasificación requiere por tanto, una evaluación de las propiedades intrínsecas de la sustancia, así como condiciones experimentales en las que se haya determinado el factor de bioconcentración (FBC). Basándose en el documento guía, se ha desarrollado un esquema para decidir la aplicación de datos de bioconcentración o del  $\log K_{ow}$ . La presente sección considera las sustancias orgánicas y los compuestos organometálicos. En la sección A9.7 también se examinará la bioacumulación de metales.

A9.5.1.3 Se pueden obtener datos sobre las propiedades de bioconcentración de una sustancia mediante ensayos normalizados o a partir de la estructura de la molécula. La interpretación de esos datos a efectos de clasificación requiere a menudo una evaluación detallada de los mismos. Con el fin de facilitar esa evaluación, se han añadido dos apéndices adicionales. En ellos se describen los métodos disponibles (Apéndice III del anexo 9) y los factores que influyen en el potencial de bioconcentración (Apéndice IV del anexo 9). Por último, figura una lista de métodos experimentales normalizados para determinar la

bioconcentración y  $K_{ow}$  (Apéndice V del anexo 9), juntamente con una lista de referencias (Apéndice VI del anexo 9).

### **A9.5.2 Interpretación de los datos de bioconcentración**

A9.5.2.1 La clasificación de una sustancia en función de los peligros que presenta para el medio ambiente se basa normalmente en los datos existentes sobre sus propiedades medioambientales. En los ensayos, pocas veces se producirán datos con la finalidad principal de facilitar una clasificación. Muchas veces se dispone de todo un rango de datos de ensayos que no se corresponden necesariamente con los criterios de clasificación. En consecuencia, será necesaria una guía para interpretar esos datos en el contexto de la clasificación de peligros.

A9.5.2.2 La bioconcentración de una sustancia orgánica puede determinarse experimentalmente mediante ensayos en los que se mida el FBC como el cociente entre la concentración de la sustancia en el organismo y su concentración en agua, en condiciones de equilibrio, estimándose la bioconcentración con la constante cinética de absorción ( $k_1$ ) y la constante de eliminación ( $k_2$ ) (Directriz 305 de la OCDE, 1996). Por lo general, el potencial de bioconcentración de una sustancia orgánica guarda relación sobre todo con el carácter lipófilo de esa sustancia. Ese carácter se mide con el coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) que, para las sustancias orgánicas lipófilas no iónicas que registran un metabolismo o una transformación mínima en el interior del organismo, está correlacionado con el factor de bioconcentración. Por tanto, se usa a menudo  $K_{ow}$  para estimar la bioconcentración de sustancias orgánicas basándose en la relación empírica entre  $\log$  FBC y  $\log K_{ow}$ . Para casi todas las sustancias orgánicas hay métodos de estimación para calcular  $K_{ow}$ . Los datos sobre las propiedades de bioconcentración de una sustancia pueden así (1) determinarse experimentalmente, (2) estimarse con valores de  $K_{ow}$  determinados experimentalmente, o (3) estimarse con valores de  $K_{ow}$  obtenidos mediante las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR). Más adelante se darán indicaciones para interpretar esos datos, junto con una orientación para evaluar las categorías de productos químicos que requieren especial atención.

#### **A9.5.2.3 Factor de bioconcentración (FBC)**

A9.5.2.3.1 El factor de bioconcentración se define como el cociente ponderado entre la concentración de la sustancia química en un organismo y su concentración en el medio en que se encuentra, en este caso el agua, en estado estacionario. El FBC podrá así determinarse experimentalmente en condiciones correspondientes a un estado estacionario a partir de concentraciones medidas de la sustancia química. No obstante, también podrá calcularse como el cociente entre las constantes de absorción y de eliminación de orden 1, método éste que no requiere condiciones de estado estacionario.

A9.5.2.3.2 Diferentes directrices para los ensayos encaminados a determinar la bioconcentración en peces han sido documentadas y adoptadas, de las que la Directriz 305 de la OCDE (OCDE, 1996) es la que goza de mayor aplicación.

A9.5.2.3.3 En definitiva, a efectos de clasificación, se preferirán valores del FBC de gran calidad obtenidos experimentalmente, datos que tendrán preferencia sobre los de sustitución como, por ejemplo,  $K_{ow}$ .

A9.5.2.3.4 Por datos de gran calidad se entienden aquellos en los que se cumplen los criterios de validez para el método que se explique y describa en el ensayo como, por ejemplo, mantener una concentración constante de exposición, variar el contenido de oxígeno y la temperatura, documentar que se han alcanzado condiciones de estado estacionario, etc. El experimento se considerará como un estudio de gran calidad si proporciona una descripción adecuada (por ejemplo, mediante unas buenas prácticas de laboratorio - BPL) que permita verificar que se cumplen los criterios de validez. Además, deberá utilizarse un método analítico apropiado para cuantificar la sustancia química y sus metabolitos tóxicos en agua y los tejidos del pez (véase la sección 1 del apéndice III para más detalles).

A9.5.2.3.5 Unos valores del FBC inciertos o de baja calidad pueden dar un valor equivocado o demasiado débil de ese factor, por ejemplo cuando se utilizan las concentraciones de la sustancia de ensayo medidas en peces y agua, pero cuando esas medidas se han realizado tras un período de exposición demasiado corto sin que se hayan alcanzado las condiciones de estado estacionario (véase OCDE 306, 1996,

sobre la estimación del tiempo necesario para lograr el estado estacionario). Por tanto, esos datos deberían evaluarse con cuidado antes de usarlos y habría que considerar la posibilidad de emplear en su lugar  $K_{ow}$ .

A9.5.2.3.6 Cuando no se tenga el valor de FBC para peces, podrán usarse datos de gran calidad sobre el valor del FBC de otras especies, (por ejemplo, el FBC encontrado en el mejillón azul, la ostra, o la vieira (ASTM E 1022-94)). Los FBC observados en microalgas deberían usarse con cautela.

A9.5.2.3.7 En sustancias muy lipófilas como, por ejemplo, las que presentan un  $\log K_{ow}$  superior a 6, los valores del FBC obtenidos experimentalmente tienden a disminuir al aumentar  $\log K_{ow}$ . Las explicaciones teóricas de esa no linealidad hacen referencia principalmente a una disminución de la cinética de permeabilidad de la membrana o a un descenso de la solubilidad de las sustancias ensayadas en los lípidos bióticos para moléculas grandes. Se producirá así una disponibilidad baja y una absorción de esas sustancias en el organismo. Pueden intervenir otros factores, anomalías experimentales como que no se alcance un estado estacionario, una reducción de la disponibilidad debido a la adsorción en materias orgánicas presentes en la fase acuosa, y errores analíticos. Habrá que poner especial cuidado al evaluar los datos experimentales del FBC de sustancias muy lipófilas, ya que esos datos adolecerán de un nivel de incertidumbre mucho mayor que los valores del FBC determinados para sustancias menos lipófilas.

A9.5.2.3.8 El FBC en diferentes especies de ensayo

A9.5.2.3.8.1 Los valores del FBC utilizados en la clasificación se basan en mediciones sobre organismos enteros. Como ya se dijo, los datos óptimos para clasificar son valores del FBC obtenidos con el método preconizado por la Directriz 305 de la OCDE u otros métodos internacionalmente equivalentes, en los que se usan peces pequeños. Al ser el cociente superficie branquial/peso mayor en los organismos pequeños que en los grandes, las condiciones de estado estacionario se alcanzarán antes en los primeros que en los segundos. El tamaño de los organismos (peces) utilizados en los estudios de bioconcentración reviste así mucha importancia en lo que atañe a la declaración de la fase de absorción, mientras que el valor del FBC se basa únicamente en concentraciones medidas en peces y en agua, en estado de estado estacionario. De esta manera, si en los estudios de bioconcentración se han utilizado peces grandes, por ejemplo, salmones adultos, habrá que evaluar si el período de absorción fue suficientemente largo para alcanzar un estado de estado estacionario o para poder determinar con precisión una constante cinética de absorción.

A9.5.2.3.8.2 Asimismo, cuando se emplean datos existentes en la clasificación, es posible que los valores del FBC se haya obtenido con peces diferentes u otras especies acuáticas (por ejemplo, almejas), y con distintos órganos en los peces. Así, al comparar esos datos entre sí y con los criterios, será necesaria alguna base común o normalización. Se ha observado que existe una estrecha relación entre el contenido en lípidos de un pez o de un organismo acuático y el valor observado del FBC. Por tanto, al comparar este último en diferentes especies de peces y al convertir esos valores para órganos específicos en valores relativos a todo el cuerpo, el modo de proceder habitual será expresar los valores del FBC en relación con un contenido en lípidos comparable. Si, por ejemplo, se encuentran en trabajos publicados, valores del FBC para todo el cuerpo o para órganos específicos, el primer paso será calcular esos valores respecto del porcentaje de lípidos utilizando el contenido relativo de grasa del pez (véanse los trabajos sobre ese particular o las directrices de ensayos para el contenido de grasa característico de las especies a que se refieran los ensayos) o el órgano. En el segundo paso se calcula el FBC para todo el cuerpo en un organismo acuático típico (por ejemplo, un pez pequeño), suponiendo un contenido medio teórico en lípidos. Muy comúnmente se usa un valor por defecto del 5 % (Pedersen *et al.*, 1995), ya que representa el contenido medio en lípidos de peces pequeños utilizados en la Directriz 305 de la OCDE (1996).

A9.5.2.3.8.3 Por lo general, se recurre al valor del FBC válido más alto correspondiente a esa base lipídica común para determinar el FBC respecto del peso en húmedo, con miras a compararlo con el valor límite de 500 de los criterios de clasificación armonizados (véase la tabla 4.1.1 del capítulo 4.1).

A9.5.2.3.9 Utilización de sustancias marcadas radiactivamente

A9.5.2.3.9.1 La utilización de sustancias de ensayo con un marcaje radiactivo puede facilitar el análisis de las muestras de agua y peces. Sin embargo, a menos que vaya acompañado de un método analítico específico, la medida de la radiactividad total refleja la presencia de la sustancia parental, así como la de uno o varios de sus posibles metabolitos y de carbono quizá metabolizado, que se ha incorporado a las moléculas



orgánicas del tejido del pez. Por tal motivo, los valores del FBC determinados con la ayuda de sustancias de ensayo marcadas suelen estar normalmente sobrestimados.

A9.5.2.3.9.2 Cuando se utilizan sustancias marcadas, el marcaje radiactivo se sitúa casi siempre en la parte estable de la molécula, por cuyo motivo el valor medido del FBC comprende el factor de bioconcentración de los metabolitos. Para algunas sustancias, es el metabolito que presenta mayor toxicidad y que tiene el potencial de bioconcentración más alto. Las mediciones de la sustancia parental, así como los metabolitos, pueden, por tanto, ser importantes para interpretar el peligro acuático (incluido el potencial de bioconcentración) de esas sustancias.

A9.5.2.3.9.3 En los experimentos en los que se emplean sustancias marcadas, se encuentran a menudo concentraciones elevadas de marcadores radiactivos en la vesícula biliar de los peces. Esto se atribuye a la biotransformación en el hígado y a la excreción ulterior de metabolitos en la vesícula (Comotto *et al.*, 1979; Wakabayashi *et al.*, 1987; Goodrich *et al.*, 1991; Toshima *et al.*, 1992). Cuando los peces no comen, el contenido de su vesícula biliar no se vacía en el intestino y pueden acumularse concentraciones altas de metabolitos en la vesícula. El régimen alimenticio puede así tener un efecto pronunciado en el FBC medido. Se han publicado muchos estudios que han recurrido a compuestos marcados y en los que los peces no han sido alimentados. En ellos se han encontrado, por tanto, concentraciones elevadas de materia radiactiva en la vesícula biliar. En esos estudios, la bioconcentración podrá casi siempre haberse sobrestimado. Así, al evaluar experimentos en que se empleen compuestos marcados, es fundamental examinar también el régimen alimenticio.

A9.5.2.3.9.4 Si el FBC, expresado en términos de residuos radiactivos, es  $\geq 1000$ , la Directriz 305 de la OCDE (1996) recomienda encarecidamente, por ejemplo para los plaguicidas, que se identifiquen y cuantifiquen los productos de degradación en los tejidos del pez si representan al menos 10 % de los residuos totales en estado de estado estacionario. Si no se pueden identificar y cuantificar los metabolitos, el cálculo de la bioconcentración deberá basarse en el valor del FBC medido en los componentes marcados. Cuando para sustancias con una fuerte tendencia a la bioacumulación ( $\text{FBC} \geq 500$ ), se disponga únicamente de una parte de los valores del FBC determinados con medidas del compuesto parental y con las de compuestos marcados, convendrá utilizar estos últimos para clasificar esas sustancias.

#### A9.5.2.4 *Coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ )*

A9.5.2.4.1 En las sustancias orgánicas, es preferible utilizar valores de  $K_{ow}$  de gran calidad obtenidos experimentalmente o determinados mediante estudios y designados como “valores recomendados”. Cuando no se disponga de datos experimentales de gran calidad, es posible utilizar, en el proceso de clasificación, relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) validadas, para calcular  $\log K_{ow}$ . Esas QSAR validadas podrán usarse sin modificación de los criterios convenidos si se limitan a productos químicos en los que su aplicabilidad está bien definida. En sustancias como bases y ácidos fuertes, sustancias que reaccionan con el eluyente, o sustancias tensioactivas, debería obtenerse un valor de  $K_{ow}$  estimado a partir de las QSAR o con solubilidades individuales en el *n*-octanol y el agua en lugar de una determinación analítica de  $K_{ow}$  (CEE A.8, 1992; OCDE 117, 1989). En sustancias ionizables deberían hacerse mediciones en su forma no ionizada (ácido o base libre), utilizando simplemente un tamponamiento apropiado, con un pH inferior al pK para un ácido libre o superior al pK para una base libre.

#### A9.5.2.4.2 Determinación experimental de $K_{ow}$

Para determinar experimentalmente  $K_{ow}$ , se describen, en las directrices normalizadas, varios métodos diferentes: en frasco agitado y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), como, por ejemplo, la Directriz 107 de la OCDE (1995), la Directriz 117 (1989), CEE A.8. (1992), EPA-OTS (1982), EPA-FIFRA (1982), ASTM (1993) y el método pHmétrico (Directriz de la OCDE, en preparación). Se recomienda el método en frasco agitado cuando el valor de  $\log K_{ow}$  esté comprendido entre -2 y 4. Ese método sólo se aplica a sustancias prácticamente puras, solubles en agua y en *n*-octanol. Para sustancias muy lipófilas, que se disuelven lentamente en agua, los datos obtenidos con un método de agitación suave suelen ser más fiables. Este último permite, además superar hasta cierto punto las dificultades experimentales relacionadas con la formación de microgotas durante el experimento en frasco agitado, en la medida en que el agua, el octanol y el compuesto del ensayo se lleven a un estado de equilibrio en un reactor suavemente agitado. El método de agitación suave (Directriz de la OCDE, en preparación) permite determinar con

precisión  $K_{ow}$  en compuestos con un valor de  $\log K_{ow}$  de hasta 8,2 (Proyecto de directriz de la OCDE, 1998). Al igual que en el método de agitación en frasco, el método de agitación suave sólo se aplica a sustancias prácticamente puras, solubles en agua y en n-octanol. Se recomienda el método HPLC, que se practica en columnas analíticas cuando el valor de  $\log K_{ow}$  está comprendido entre 0 y 6. Este método es menos sensible a la presencia de impurezas en el compuesto de ensayo que el método de agitación en frasco. Otra técnica para medir  $\log K_{ow}$  es el método en columna (US-EPA 1985).

Como una determinación experimental de  $K_{ow}$  no siempre es posible, por ejemplo en sustancias muy hidrosolubles o muy lipófilas y en los tensioactivos, podrá usarse un  $K_{ow}$  determinado mediante las QSAR.

#### A9.5.2.4.3 Utilización de las QSAR para determinar $\log K_{ow}$

Cuando se dispone de un valor estimado de  $K_{ow}$ , deberá tenerse en cuenta el método de estimación. Se ha desarrollado y siguen desarrollándose muchas QSAR para estimar  $K_{ow}$ . Frecuentemente, cuando no se tienen datos obtenidos experimentalmente, se usan para evaluar el riesgo cuatro programas comercialmente disponibles en PC (CLOGP, LOGKOW (KOWWIN), AUTOLOGP y SPARC). Los programas CLOGP, LOGKOW y AUTOLOGP se basan en la adición de las contribuciones de grupos funcionales, mientras que el programa SPARC recurre a un algoritmo de simulación de la estructura química más teórico. Con carácter general, en los compuestos inorgánicos u organometálicos sólo puede utilizarse el programa SPARC. Se necesitan métodos especiales para estimar  $\log K_{ow}$  en el caso de compuestos tensioactivos, agentes quelantes y mezclas. El programa CLOGP se recomienda en el proyecto conjunto US-EPA/CE sobre validación de los métodos de estimación de las QSAR (US-EPA/EC, 1993). Pedersen *et al.* (1995) recomendaban los programas CLOGP y LOGKOW para la clasificación por su fiabilidad, disponibilidad comercial y facilidad de uso. En la tabla A9.5.1 se recomiendan algunos métodos de estimación para la clasificación.

**Tabla A9.5.1: QSAR recomendadas para estimar  $K_{ow}$**

MODELO	Intervalo de $\log K_{ow}$	Sustancias consideradas
CLOGP	$0 < \log K_{ow} < 9^a$	El programa calcula $\log K_{ow}$ para compuestos orgánicos que contienen átomos de C, H, N, O, halógeno, P y/o S.
LOGKOW (KOWWIN)	$-4 < \log K_{ow} < 8^b$	El programa calcula $\log K_{ow}$ para compuestos orgánicos que contienen átomos de C, H, N, O, halógeno, Si, P, Se, Li, Na, K y/o Hg. También puede proporcionar predicciones para ciertos tensioactivos (tales como los etoxilatos de alcohol, colorantes y sustancias disociadas).
AUTOLOGP	$\log K_{ow} > 5$	El programa calcula $\log K_{ow}$ para compuestos orgánicos que contienen átomos de C, H, N, O, halógeno, P y S. Se están introduciendo mejoras para ampliar el campo de aplicación del programa AUTOLOGP.
SPARC	Mejores resultados que KOWWIN y CLOGP para los compuestos con un $\log K_{ow} > 5$ .	SPARC es un modelo mecanicista basado en principios termodinámicos, más que un modelo determinista basado en conocimientos obtenidos de datos de observación. Por tal motivo difiere de los modelos que utilizan las QSAR (KOWWIN, CLOGP, AUTOLOGP) en que no necesita ningún dato medido de $\log K_{ow}$ para una serie de productos químicos de referencia. De manera general, en los compuestos inorgánicos y organometálicos sólo puede emplearse el SPARC.

<sup>a</sup> Un estudio de validación, realizado por Niemelä y que compara valores de  $\log K_{ow}$  determinados experimentalmente con valores estimados, ha mostrado que el programa predecía con precisión  $\log K_{ow}$  para un gran número de compuestos químicos orgánicos, que presentan un valor de  $\log K_{ow}$  comprendido entre 0 y más de 9 ( $n = 501$ ,  $r^2 = 0,967$ ) (TemaNord 1995: 581).

<sup>b</sup> Según un diagrama de dispersión que representa valores estimados y experimentales de  $\log K_{ow}$  (Syracuse Research Corporation, 1999) y que se refiere a 13058 compuestos, se estima que el programa LOGKOW da resultados válidos para los compuestos con un valor de  $\log K_{ow}$  comprendido entre -4 y 8.

### **A9.5.3      *Clases de productos químicos que necesitan atención especial respecto de los valores del FBC y de $K_{ow}$***

A9.5.3.1      Algunas propiedades fisicoquímicas pueden hacer difícil determinar o medir el FBC. Hay sustancias que no se bioconcentran de un modo consistente con sus otras propiedades fisicoquímicas; por ejemplo, el impedimento estérico o la actividad superficial pueden hacer inapropiada la medición y la utilización de  $\log K_{ow}$ .

#### **A9.5.3.2      *Sustancias difíciles***

A9.5.3.2.1      Con ciertas sustancias es difícil hacer ensayos en los sistemas acuáticos y se han preparado indicaciones para facilitar esos ensayos (DoE, 1996; ECETOC, 1996; y US-EPA, 1996). La OCDE acaba de terminar un documento guía para los ensayos de sustancias difíciles en medio acuático (OCDE, 2000). Ese documento es una buena fuente de información, útil también para estudios de bioconcentración, sobre tipos de sustancias difíciles de someter a ensayos y sobre las etapas necesarias para asegurar conclusiones válidas. Tales sustancias pueden ser poco solubles, volátiles o sujetas a una degradación rápida, a causa de procesos tales como la fototransformación, la hidrólisis, la oxidación o la degradación biótica.

A9.5.3.2.2      Para lograr una bioconcentración de compuestos orgánicos, una sustancia ha de ser soluble en lípidos, estar presente en el agua y estar disponible para atravesar las branquias de los peces. Las propiedades que hagan variar esta disponibilidad modificarán, por tanto, la bioconcentración real de la sustancia respecto del nivel de bioconcentración previsto. Por ejemplo, sustancias fácilmente degradables pueden estar presentes únicamente en el compartimento acuático durante breves períodos de tiempo. Del mismo modo, la volatilización y la hidrólisis reducirán la concentración de una sustancia y el tiempo durante el cual está disponible para concentrarse. Otro parámetro importante que puede reducir la concentración de exposición real de una sustancia es la adsorción, ya sea sobre una materia en forma de partículas o sobre superficies en general. Existe cierto número de sustancias en las que se ha demostrado que se transforman rápidamente en el organismo, conduciendo así a un valor del FBC inferior al esperado. Las sustancias que forman micelas o agregados pueden bioconcentrarse en menor medida de lo que sería previsible con las simples propiedades fisicoquímicas. Tal es también el caso de sustancias hidrófobas contenidas en micelas formadas como consecuencia del uso de dispersantes. Por lo tanto, se desaconseja usar éstos en los ensayos de bioacumulación.

A9.5.3.2.3      Por lo general, en sustancias con las que es difícil hacer ensayos, medir los valores del FBC y de  $K_{ow}$  - basándose en la sustancia parental - es un requisito previo para determinar el potencial de bioconcentración. Asimismo, una documentación adecuada de la concentración del ensayo es una condición para validar un determinado valor del FBC.

#### **A9.5.3.3      *Sustancias poco solubles y complejas***

Debe prestarse especial atención a las sustancias poco solubles. A menudo, su solubilidad es inferior al límite de detección, lo que crea problemas para interpretar el potencial de bioconcentración. En esas sustancias, este potencial debería basarse en la determinación experimental o en su estimación a partir de las QSAR del  $\log K_{ow}$ .

Cuando una sustancia con multicomponentes no sea totalmente soluble en agua, será muy conveniente identificar los componentes de la mezcla en la medida de lo posible y determinar su potencial de bioacumulación con la información disponible sobre los mismos. Cuando los componentes que se bioacumulan constituyan una parte apreciable de la sustancia compleja (por ejemplo, más del 20 % o para componentes peligrosos una proporción incluso inferior), la sustancia compleja debería considerarse bioacumulable.

#### A9.5.3.4 *Sustancias de masa molecular elevada*

Por encima de ciertas dimensiones moleculares, el potencial de bioconcentración de una sustancia disminuye. Esto se debe quizá al impedimento estérico del paso de la sustancia a través de las membranas de las branquias. Se ha propuesto aplicar un valor de corte de 700 para el peso molecular (por ejemplo, Comisión Europea, 1996). Sin embargo, ese límite ha sido criticado ya que excluye a ciertas sustancias con posibles efectos acuáticos indirectos (CSTEE, 1999) y, en su lugar, se ha propuesto un límite de 1000. En general, debería tomarse en consideración la bioconcentración ambiental de posibles metabolitos o de productos de degradación de moléculas de grandes dimensiones. Los datos sobre la bioconcentración de moléculas de masa molecular elevada deben evaluarse con precaución y utilizarse sólo si se consideran válidos, ya se trate del compuesto parental o de sus posibles metabolitos y productos de degradación en el medio ambiente.

#### A9.5.3.5 *Agentes tensioactivos*

A9.5.3.5.1 Los tensioactivos están constituidos por una parte lipófila (casi siempre una cadena alquílica) y una parte hidrófila (grupo polar principal). Con arreglo a la carga de este grupo polar, los tensioactivos se reparten en diferentes categorías: aniónicos, catiónicos, no iónicos o anfóteros. Debido a la variedad de grupos polares principales, los tensioactivos constituyen una categoría estructuralmente diversa de compuestos, definidos más por su actividad superficial que por su estructura química. El potencial de bioacumulación de los tensioactivos debería así considerarse en relación con las diferentes subclases (aniónicos, catiónicos, no iónicos o anfóteros), en lugar de por el grupo en su conjunto. Las sustancias tensioactivas pueden formar emulsiones, en las que es difícil establecer la biodisponibilidad. La formación de micelas puede entrañar una modificación de la fracción biodisponible, incluso si se está aparentemente en presencia de una disolución, lo que suscita problemas a la hora de interpretar el potencial de bioacumulación.

##### A9.5.3.5.2 Factores de bioconcentración determinados experimentalmente

Los valores del FBC medidos en tensioactivos muestran que ese factor puede elevarse cuando la longitud de la cadena alquílica aumenta y dependerá del lugar de emplazamiento del grupo polar principal o de otras características estructurales.

##### A9.5.3.5.3 Coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ )

El coeficiente de reparto octanol-agua no puede determinarse en los tensioactivos usando el método de agitación en frasco o mediante agitación suave, en razón de que se forman emulsiones. Además, las moléculas tensioactivas estarán presentes en la fase acuosa casi exclusivamente en forma de iones, mientras que deberán emparejarse con un contraión para disolverse en el octanol. Por tanto, el valor de  $K_{ow}$  determinado experimentalmente no caracteriza el reparto de tensioactivos iónicos (Tolls, 1998). Por otra parte, se ha demostrado que la bioconcentración de tensioactivos aniónicos y no iónicos aumenta con la lipofilia (Tolls, 1998). Este autor ha mostrado que para algunos tensioactivos, un valor de  $\log K_{ow}$  estimado con el programa LOGKOW puede representar el potencial de bioacumulación; sin embargo, para otros tensioactivos era necesaria alguna ‘corrección’ del valor de  $\log K_{ow}$  estimado con el método de Roberts (1989). Estos resultados ilustran el hecho de que la calidad de la relación entre las estimaciones de  $\log K_{ow}$  y la bioconcentración depende de la categoría y del tipo específico de tensioactivo de que se trate. Por lo tanto, conviene utilizar con circunspección la clasificación del potencial de bioconcentración establecido mediante valores de  $\log K_{ow}$ .

#### A9.5.4 *Datos contradictorios y ausencia de datos*

##### A9.5.4.1 *Datos contradictorios del FBC*

Cuando se dispone de varios datos sobre el FBC para una misma sustancia, se pueden encontrar resultados contradictorios. Por lo general, este hecho en el caso de una sustancia que se haya sometido varias veces a un ensayo de bioconcentración apropiado debería interpretarse mediante el “peso de la evidencia”. Esto significa que si para una sustancia se han obtenido valores experimentales del FBC a la vez  $\geq$  y  $<$  500, habrá que emplear los datos de mayor calidad y mejor documentados para determinar el potencial de bioconcentración de la sustancia. Si aún así existen diferencias, por ejemplo si se dispone de

valores de gran calidad del FBC para diferentes especies de peces, deberá utilizarse en general el valor válido más alto como base de la clasificación.

Cuando se tengan conjuntos de datos en mayor número (4 valores o más) para la misma especie y la misma etapa de vida, podrá usarse la media geométrica de los valores del FBC como valor representativo de esa especie.

#### A9.5.4.2 *Datos de log $K_{ow}$ contradictorios*

Puede haber situaciones en que por disponerse de varios valores de log  $K_{ow}$  para una misma sustancia, se encuentren resultados contradictorios. Si para una sustancia se obtienen a la vez valores de log  $K_{ow} \geq y < 4$ , habrá que usar los datos de mayor calidad y mejor documentados para determinar el potencial de bioconcentración de esa sustancia. Si sigue habiendo diferencias, por lo general se dará preferencia al valor válido más alto. En ese caso, se podría usar como orientación el log  $K_{ow}$  estimado según las QSAR.

#### A9.5.4.3 *Opinión de los expertos*

Si no se dispone de datos experimentales del FBC o de log  $K_{ow}$  o de predicciones para log  $K_{ow}$ , el potencial de bioconcentración en el medio ambiente acuático podrá evaluarse recurriendo a la opinión de los expertos. Ese dictamen podrá basarse en una comparación de la estructura de la molécula con la estructura de otras sustancias para las que se tienen datos experimentales de la bioconcentración o de log  $K_{ow}$  o predicciones de  $K_{ow}$ .

### A9.5.5 *Esquema de la toma de decisiones*

A9.5.5.1 A partir de los análisis y conclusiones precedentes, se ha preparado un esquema que puede facilitar las decisiones acerca de si una sustancia tiene o no potencial de bioconcentración en especies acuáticas.

A9.5.5.2 Para la clasificación se preferirán en última instancia valores del FBC de gran calidad determinados experimentalmente. Los valores de ese factor de poca o dudosa calidad no deberían usarse para la clasificación cuando se disponga de datos de log  $K_{ow}$ , ya que pueden proporcionar un valor falso y demasiado bajo del FBC, debido tal vez a un período de exposición demasiado corto en el que no se hayan alcanzado condiciones de estado estacionario. Si no se tiene el FBC en peces, podrán usarse datos de calidad de ese factor en otras especies (mejillones, por ejemplo).

A9.5.5.3 En sustancias orgánicas, es preferible utilizar valores experimentales de gran calidad obtenidos en estudios y designados como “valores recomendados”. Si no se dispone de estos datos cabe emplear en el proceso de clasificación relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) validadas para log  $K_{ow}$ . Esas relaciones podrán usarse sin modificación en los criterios de clasificación cuando se refieran a productos químicos en los que su aplicabilidad esté bien definida. En sustancias como ácidos y bases fuertes, complejos metálicos y tensioactivos, convendrá utilizar un valor de  $K_{ow}$  estimado con las QSAR o bien solubilidades individuales en *n*-octanol y agua, en lugar de una determinación analítica de  $K_{ow}$ .

A9.5.5.4 Si se tienen datos que no estén validados, habría que recurrir a la opinión de los expertos.

A9.5.5.5 Podrá así decidirse si una sustancia tiene o no potencial de bioconcentración en organismos acuáticos, con arreglo al esquema siguiente:

- a) Valor experimental del FBC válido y de gran calidad → SÍ:
  - i)  $FBC \geq 500$ : la sustancia tiene potencial de bioconcentración
  - ii)  $FBC < 500$ : la sustancia no tiene potencial de bioconcentración
- b) Valor experimental del FBC válido y de gran calidad → NO:
  - i) Valor experimental de log  $K_{ow}$  válido y de gran calidad → SÍ:

- ii)  $\text{Log } K_{ow} \geq 4$ : *la sustancia tiene potencial de bioconcentración*
- iii)  $\text{Log } K_{ow} < 4$ : *la sustancia no tiene potencial de bioconcentración*
- c) Valor experimental del FBC válido y de gran calidad  $\rightarrow$  NO:
  - i) Valor experimental de  $\text{log } K_{ow}$  válido y de gran calidad  $\rightarrow$  NO:
  - ii) Uso de QSAR validadas para estimar un valor de  $\text{log } K_{ow} \rightarrow$  SÍ:
  - iii)  $\text{Log } K_{ow} \geq 4$ : *la sustancia tiene potencial de bioconcentración*
  - iv)  $\text{Log } K_{ow} < 4$ : *la sustancia no tiene potencial de bioconcentración*

## **A9.6 Utilización de las relaciones cuantitativas estructura-actividad QSAR**

### **A9.6.1 Historia**

A9.6.1.1 La utilización de las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) en toxicología acuática se remonta a los trabajos de Overton en Zurich (Lipnick, 1986) y Meyer en Marburgo (Lipnick, 1989a). Esos autores demostraron que la capacidad de las sustancias para producir narcosis en renacuajos y peces pequeños está en proporción directa a sus coeficientes de reparto medido entre el aceite de oliva y el agua. Overton postuló en su monografía de 1901, "*Studien über die Narkose*", que esa correlación refleja una toxicidad que tiene lugar a una concentración o volumen molares estándar, a nivel de un emplazamiento molecular en el organismo (Lipnick, 1991a). Lipnick sostuvo, además, que esto corresponde a la misma concentración o volumen para varios organismos, con independencia de si la absorción se efectúa a través del agua o por inhalación gaseosa. Esta correlación se conoce en anestesia como la teoría de Meyer-Overton.

A9.6.1.2 Corwin Hansch y sus colaboradores en el Pomona College propusieron utilizar el sistema *n*-octanol/agua como sistema de reparto de referencia, y encontraron que estos coeficientes de reparto eran una propiedad aditiva y constitutiva, que pueden ser estimados directamente a partir de la estructura química. Además, descubrieron que podían aplicar el análisis estadístico de regresión a sus conclusiones para obtener modelos de las QSAR. De ese modo, en 1972 dichos autores comunicaron que habían obtenido 137 modelos QSAR, en forma de  $\log (1/C) = A \log K_{ow} + B$ , donde  $K_{ow}$  es el coeficiente de reparto *n*-octanol-agua y  $C$  es la concentración molar de una sustancia química que produce una respuesta biológica estándar por el efecto de compuestos orgánicos simples no reactivos y no electrolíticos en animales enteros, órganos, células o incluso enzimas puras. Cinco de esas ecuaciones, que se aplican a la toxicidad de cinco alcoholes monohídricos simples respecto de cinco especies de peces, presentan pendientes y puntos de interceptación con los ejes casi idénticos, que son prácticamente los mismos que los encontrados por Könemann en 1981, quien al parecer no estaba al tanto de los trabajos anteriores de Hansch. Könemann y otros han demostrado que esas sustancias simples no electrolíticas y no reactivas actúan todas ellas mediante un mecanismo de narcosis dentro del marco de un ensayo de toxicidad aguda en los peces, produciendo una toxicidad mínima o de referencia (Lipnick, 1989b).

### **A9.6.2 Anomalías experimentales que causan una subestimación del peligro**

A9.6.2.1 Otras sustancias no electrolíticas pueden ser más tóxicas que lo que predicen las QSAR, pero no menos, excepto como resultado de una anomalía experimental. Pueden considerarse anomalías los datos obtenidos para compuestos tales como hidrocarburos volátiles, o compuestos muy hidrófobos, en los que la duración del ensayo de toxicidad aguda es insuficiente para que se alcance el estado estacionario entre la concentración en fase acuosa (disolución de ensayo en el acuario) y la localización hidrófoba interna de la acción narcótica. El diagrama de las QSAR que representa el  $\log K_{ow}$  en función de  $\log C$  para esas sustancias simples no electrolíticas y no reactivas pone en evidencia una relación lineal a condición de que ese equilibrio se establezca antes de acabar el ensayo. Más allá de ese punto se observa una relación bilineal, siendo el producto químico más tóxico aquel que presenta el valor más alto de  $\log K_{ow}$  en el que se establece el equilibrio (Lipnick, 1995).

A9.6.2.2 Otro problema de los ensayos es el que plantea el límite de solubilidad en agua. Cuando la concentración tóxica requerida para producir el efecto es superior a la solubilidad en agua del compuesto, no se observará efecto alguno, incluso con una hidrosaturación. Los compuestos en los que la concentración tóxica prevista es próxima a la solubilidad en agua tampoco mostrarán efectos si la duración del ensayo es insuficiente para lograr el estado estacionario. Una situación límite similar se observa en tensioactivos, cuando se prevé toxicidad en una concentración superior a la micelar crítica. Aunque tales compuestos pueden no manifestar toxicidad en esas condiciones cuando se ensayan aislados, sus contribuciones tóxicas a las mezclas siguen estando presentes. En los compuestos con el mismo valor de  $\log K_{ow}$ , las diferencias de la solubilidad en agua reflejan divergencias en la entalpía de fusión referida al punto de fusión. El punto de fusión es un indicador del grado de estabilidad de la red cristalina y su valor se rige por los enlaces de hidrógeno intermoleculares, la falta de flexibilidad conformacional y la simetría. Cuanto más simétrico sea un compuesto más elevado será su punto de fusión (Lipnick, 1990).

### A9.6.3 *Problemas de los modelos QSAR*

A9.6.3.1 Elegir un modelo QSAR apropiado implica que el modelo permitirá una predicción fiable de la toxicidad o la actividad biológica de un producto químico no sometido a ensayo. De manera general, la fiabilidad disminuye con la mayor complejidad de la estructura química, a menos que se hayan obtenido las QSAR para un conjunto estrechamente definido de productos químicos de una estructura similar a la de la sustancia de que se trate. Los modelos QSAR obtenidos con clases estrechamente definidas se emplean corrientemente en el desarrollo de productos farmacéuticos, una vez identificada una nueva cabeza de serie homóloga de los compuestos y cuando haya que hacer pequeñas modificaciones estructurales para optimizar su actividad (y reducir su toxicidad). En términos globales, el objetivo es hacer estimaciones por interpolación más que por extrapolación.

A9.6.3.2 Por ejemplo, si se dispone de datos de  $CL_{50}$  en 96 h de ensayos en peces (*Pimephales promelas*) para etanol, n-butanol, n-hexanol y n-nonanol, se podrán predecir con cierta confianza los efectos para el n-propanol y el n-pentanol. En cambio, sería menos fiable hacer una predicción para el metanol, que es una extrapolación, a menos átomos de carbono que cualquiera de los otros productos químicos sometidos a ensayo. En realidad, el comportamiento del primer miembro de esa serie homóloga suele ser el más anormal y no debería predecirse usando datos de los demás miembros de la serie. Incluso la toxicidad de alcoholes de cadena ramificada puede constituir una extrapolación abusiva, según cuál sea el efecto considerado. Tal extrapolación se vuelve menos fiable en la medida en que la toxicidad guarde relación con la producción de metabolitos para un efecto determinado, en oposición a las propiedades del compuesto parental. También, si la toxicidad se ejerce por intermedio de un mecanismo de enlace con un receptor específico, pueden observarse efectos muy notables con pequeños cambios en la estructura química.

A9.6.3.3 La validez de tales predicciones dependerá en definitiva de los mecanismos moleculares comunes de los compuestos utilizados para establecer el modelo QSAR para un efecto biológico determinado. En muchos casos, por no decir en casi todos, una QSAR no representa un modelo mecanicista, sino simplemente uno correlativo. Un modelo mecanicista realmente válido debe obtenerse con una serie de productos químicos que actúen todos según un mecanismo molecular común, y satisfacer una ecuación con uno o varios parámetros directamente vinculados a una o varias etapas del mecanismo de que se trata. Esos parámetros o propiedades son conocidos más generalmente con el nombre de descriptores moleculares. Es muy conveniente también tener presente que muchos de estos descriptores de uso común pueden no tener una interpretación física directa. En un modelo correlativo, el ajuste estadístico de los datos es probable que sea menos bueno que en uno mecanicista, habida cuenta de esas limitaciones. Los mecanismos no tienen por qué comprenderse del todo, pero lo que se sabe de ellos puede ser suficiente para que la aproximación sea de confianza. En los modelos correlativos, la fiabilidad de las predicciones aumenta con la especificidad con la que cada uno se define, por ejemplo, categorías de electrófilos, tales como acrilatos, en los que el grado de reactividad puede ser similar, y la toxicidad puede estimarse para una sustancia “nueva” usando un modelo basado únicamente en el parámetro  $\log K_{ow}$ .

A9.6.3.4 A título de ejemplo, los alcoholes primarios y secundarios que contienen un enlace doble o triple que se conjugan con el grupo hidroxilo (alcohol alílico o propargílico) son más tóxicos que lo que predice un modelo QSAR para los compuestos saturados correspondientes. Este comportamiento se ha atribuido a un mecanismo proelectrófilo que entraña una activación metabólica del enzima ubicuo alcohol-deshidrogenasa por aldehídos y cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturados, que pueden actuar como electrófilos por medio de

un mecanismo aceptor del tipo Michael (Veith *et al.*, 1989). En presencia de un inhibidor de la alcohol-deshidrogenasa, estos compuestos se comportan como otros alcoholes y no presentan toxicidad excesiva, con arreglo a la hipótesis mecanicista.

A9.6.3.5 La situación se vuelve rápidamente más compleja en cuanto se sale de las series homólogas de compuestos. Considérense, por ejemplo, los derivados bencénicos simples. Una serie de clorobenzenos puede verse como una serie homóloga. Probablemente no habrá mucha diferencia en la toxicidad de los tres isómeros del diclorobenceno, de este modo, un modelo QSAR para los clorobenzenos que se base en datos experimentales para uno de esos isómeros es probable que resulte adecuado. ¿Qué ocurre en caso de sustitución de otros grupos funcionales en el núcleo bencénico? A diferencia de un alcohol alifático, la adición de una función hidróxilo en el núcleo bencénico produce un fenol que ya no es neutro, sino un compuesto ácido ionizable, debido a la estabilización por resonancia de la carga negativa resultante. Por tal motivo, el fenol no actúa como un verdadero agente narcótico. Con la adición al fenol de sustituyentes electrófilos (por ejemplo, átomos de cloro), hay un cambio a compuestos que actúan como desacopladores de la fosforilación oxidativa (por ejemplo, el herbicida dinoseb). La sustitución por un grupo aldehídico conduce a una mayor toxicidad mediante un mecanismo electrófilo, ya que tales compuestos reaccionan con grupos amino como el grupo lisina  $\epsilon$ -amino para producir un aducto de tipo base de Schiff. Del mismo modo, el cloruro de bencilo actúa como un compuesto electrófilo para formar aductos covalentes con un grupo funcional sulfhidrilo. Frente a una predicción de un compuesto no sometido a ensayo, la reactividad química de éstos y otros muchos grupos funcionales y su interacción recíproca debería estudiarse con cuidado, documentando en lo posible la información con trabajos publicados (Lipnick, 1991b).

A9.6.3.6 Habida cuenta de esas limitaciones en la utilización de las QSAR para hacer predicciones, es preferible recurrir a las informaciones sobre los efectos inducidos por los grupos funcionales como medio de establecer prioridades, más que como un sustituto de los ensayos, a menos que se disponga de datos mecanicistas sobre el propio compuesto no sometido a ensayo. En realidad, la incapacidad de predecir los efectos de una exposición a residuos conocidos en el medio ambiente puede bastar por sí misma para suscitar ensayos o el desarrollo de un nuevo modelo QSAR para una categoría de productos químicos que requieran esa información. Cabe obtener un modelo QSAR mediante análisis estadísticos, por ejemplo, un análisis de regresión, de ese conjunto de datos. Como primer paso, puede utilizarse  $\log K_{ow}$ , que es el descriptor molecular empleado más corrientemente.

A9.6.3.7 Por el contrario, la obtención de un modelo QSAR mecanicista requiere comprender o hacer hipótesis de trabajo del mecanismo molecular y de qué parámetro o parámetros serían adecuados para hacer el modelo. Es importante tener en cuenta que este proceder difiere de una hipótesis sobre el modo de acción, que se refiere a la respuesta biológica/fisiológica pero no al mecanismo molecular.

#### **A9.6.4 Utilización de las QSAR en la clasificación de los peligros acuáticos**

A9.6.4.1 Las siguientes propiedades intrínsecas son relevantes desde el punto de vista de la clasificación de las sustancias respecto del medio acuático.

- a) Coeficiente de reparto octanol-agua,  $\log K_{ow}$ ;
- b) Factor de bioconcentración, FBC;
- c) Degradabilidad abiótica y biodegradación;
- d) Toxicidad acuática aguda para peces, dafnias y algas;
- e) Toxicidad a largo plazo para peces y dafnias.

A9.6.4.2 Los datos de los ensayos siempre deben preferirse a las predicciones QSAR, a condición de que sean válidos, recurriendo a éstas para llenar las lagunas de los datos a efectos de clasificación. Como la fiabilidad y el dominio de aplicación de las QSAR disponibles son diversos, hay diferentes restricciones para la predicción de cada uno de estos efectos. No obstante, si un compuesto ensayado pertenece a una clase química o a un tipo de estructura (véase más arriba) por las cuales hay buenas razones para pensar que la predicción a partir del modelo QSAR es fiable, valdrá la pena comparar esta predicción con los datos



experimentales, ya que no es inusual emplear este planteamiento para detectar algunas de las anomalías experimentales (volatilización, duración insuficiente del ensayo para alcanzar el equilibrio, y el límite de solubilidad en agua) en los datos medidos y que podrían falsear éstos, lo que en la mayoría de los casos conduciría a una clasificación de la toxicidad de las sustancias inferior a la verdadera.

A9.6.4.3 Cuando dos o más QSAR sean aplicables o parezca que lo son, será útil comparar las predicciones de estos modelos, del mismo modo que los datos predichos deberían compararse con los medidos (como ya se dijo antes). Si no existe discrepancia entre estos modelos, el resultado permite tener mayor confianza en la validez de las predicciones. También, claro está, puede significar que estos modelos se desarrollaron con datos sobre sustancias y métodos estadísticos similares. En cambio, si las predicciones son muy diferentes, el resultado tendrá que examinarse más a fondo. Existe siempre la posibilidad de que ninguno de los modelos utilizados proporcione una predicción válida. Como primer paso, habría que examinar las estructuras y propiedades de las sustancias químicas empleadas para obtener cada uno de los modelos predictivos con el fin de determinar si alguno de los modelos se basa en sustancias similares a la sustancia que se somete a predicción. Cuando un conjunto de datos contenga una sustancia análoga apropiada que haya servido para establecer el modelo, convendrá comparar el valor medido en la base de datos para esa sustancia con la predicción del modelo. Si los resultados concuerdan globalmente con el modelo, éste será probablemente el de mayor fiabilidad. Del mismo modo, si ninguno de los modelos contiene datos de ensayo para una sustancia análoga a la que hay que clasificar, se recomienda someter ésta a ensayos experimentales.

A9.6.4.4 La Agencia para la protección medioambiental de los Estados Unidos (EPA) ha insertado recientemente en su sitio web un proyecto de documento titulado “*Development of Chemical Categories in the HPV Challenge Program*”. Este documento propone la utilización de categorías de productos químicos para “... compilar voluntariamente un conjunto de datos de selección de la información (SIDS) para la totalidad de productos químicos que figuran en la lista de las sustancias químicas fabricadas en gran cantidad en los Estados Unidos (HPV), con el fin de proporcionar los datos selectivos básicos necesarios para hacer una evaluación inicial de las propiedades fisicoquímicas, el comportamiento/destino medioambiental y los efectos de esos productos en la salud humana y el medio ambiente” (EPA, 1999). Esta lista consiste en unas “... 2800 sustancias químicas producidas en gran cantidad, catalogadas en 1990 como parte del inventario de productos químicos que se hizo a tenor de la ley sobre el control de las sustancias químicas tóxicas (Toxic Substances Control Act)”.

A9.6.4.5 Una de las aproximaciones propuestas consiste en “cuando sea científicamente justificable”, considerar productos químicos muy relacionados entre sí como un grupo o categoría, más que someterlos a ensayos como sustancias individuales. En tal caso, no será necesario ensayar cada producto para cada efecto del SIDS. Estos ensayos limitados podrían justificarse siempre que “el conjunto último de datos permita evaluar efectos no explorados, idealmente por interpolación entre los miembros de una categoría”. Los procedimientos utilizados para definir estas categorías y desarrollar los datos correspondientes están descritos dentro del proyecto de documento US EPA.

A9.6.4.6 Una segunda aproximación que potencialmente necesita menos datos (US EPA, 2000a), consiste en “aplicar los principios SAR (relaciones estructura-actividad) a un producto químico individual muy relacionado con uno o varios compuestos mejor conocidos (“sustancias análogas”)”. Una tercera aproximación consistiría en utilizar “una combinación de esos dos procedimientos mediante análogos o por aproximación por categorías para productos químicos aislados semejante al adoptado en ECOSAR (US EPA, 2000b), un programa informático basado en las SAR, que genera valores de ecotoxicidad”. El documento también presenta de manera detallada la historia de la utilización de las SAR en el programa EPA sobre nuevos productos químicos e indica la vía que hay que seguir para recoger y analizar los datos que habrá que emplear en la aproximación por SAR.

A9.6.4.7 El Consejo nórdico de ministros publicó un informe (Pedersen *et al.*, 1995) titulado *Environmental Hazard Classification*, que comprende información sobre acopio e interpretación de datos, así como una sección (5.2.8) sobre estimaciones QSAR de la solubilidad en agua y toxicidad acuática aguda. En él también se examina cómo estimar las propiedades fisicoquímicas, incluido el log  $K_{ow}$ . A efectos de clasificación, se recomiendan métodos de estimación para predecir la “toxicidad acuática aguda mínima” para “compuestos neutros, orgánicos, no reactivos y no ionizables como alcoholes, cetonas, éteres, halogenuros de alquilo y de arilo, que pueden también usarse para hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos

halogenados aromáticos y alifáticos, así como sulfuros y disulfuros”, tal como se indica en un documento guía anterior de la OCDE (OCDE, 1995). El documento del Consejo nórdico incluye disquetes con una aplicación informática de algunos de estos métodos.

A9.6.4.8 El Centro europeo de ecotoxicología y toxicología de productos químicos (ECETOC) ha publicado un informe titulado *QSARs in the Assessment of the Environmental Fate and Effects of Chemicals* que describe la utilización de las QSAR para “...comprobar la validez de los datos o llenar lagunas con miras a definir las prioridades, evaluar los riesgos y clasificar las sustancias” (ECETOC, 1998). Las QSAR se describen como medio de predecir el comportamiento/destino medioambiental y la toxicidad acuática. En el informe se señala la necesidad de disponer de un conjunto coherente de datos para un determinado efecto, que correspondan a una gama bien definida de estructuras químicas (dominios químicos), con el que se constituye una serie de datos de simulación. En el documento se examinan también las ventajas de los modelos mecanicistas, la utilización del análisis estadístico en el desarrollo de las QSAR y los métodos de evaluación de los “casos aberrantes”.

#### A9.6.4.9 *Coeficiente de reparto octanol-agua, (log $K_{ow}$ )*

A9.6.4.9.1 Se dispone de aplicaciones informáticas tales como CLOGP (US EPA, 1999), LOGKOW (US EPA, 2000a) y SPARC (US EPA, 2000b) para calcular directamente log  $K_{ow}$  a partir de la estructura química. CLOGP y LOGKOW se basan en la adición de las contribuciones de los grupos funcionales, mientras SPARC lo hace con un algoritmo más teórico que simula la estructura química. Debería procederse con cautela al emplear valores calculados para compuestos que pueden experimentar hidrólisis en agua o alguna otra reacción, ya que estas transformaciones han de tenerse presentes al interpretar los datos de toxicidad acuática en los ensayos con estos productos reactivos. Sólo el modelo SPARC puede emplearse de modo general para compuestos inorgánicos u organometálicos. En compuestos tensioactivos, agentes quelantes y mezclas serán necesarios medios especiales para estimar log  $K_{ow}$  o la toxicidad acuática.

A9.6.4.9.2 Cabe calcular valores de log  $K_{ow}$  para el pentaclorofenol y compuestos similares, en su forma tanto ionizada como no ionizada (neutra). En principio eso mismo puede hacerse para ciertas moléculas reactivas (como el cloruro de bencilo), a condición de tener igualmente en cuenta su reactividad y su hidrólisis ulterior. Del mismo modo, en estos fenoles ionizables, pKa es un segundo parámetro. Es posible recurrir a modelos específicos para calcular los valores de log  $K_{ow}$  para compuestos organometálicos, pero estos modelos tendrán que aplicarse con cautela, ya que algunos de estos compuestos existen realmente en forma de pares de iones en el agua.

A9.6.4.9.3 En compuestos extremadamente lipófilos cabe realizar mediciones del log  $K_{ow}$  de hasta 6 a 6.5, mediante agitación en vaso, que pueden ampliarse hasta 8 con el método de agitación suave (Bruijn *et al.*, 1989). Estos cálculos se consideran útiles, incluso en caso de extrapolación más allá de lo que cabe medir con cualquiera de tales métodos. Naturalmente, habrá que tener presente que si los modelos QSAR de toxicidad, etc., se basan en productos químicos con valores más bajos de log  $K_{ow}$ , la propia predicción será una extrapolación; en realidad, se sabe que cuando hay bioconcentración, la relación con log  $K_{ow}$  se vuelve no lineal para valores superiores. En compuestos con valores bajos de log  $K_{ow}$ , también pueden aplicarse las contribuciones de los grupos funcionales, pero este método no es muy útil para evaluar la nocividad, ya que en esas sustancias, en particular aquellas sustancias con valores negativos del log  $K_{ow}$ , poco o ningún reparto puede tener lugar en localizaciones lipofílicas y, tal como señala Overton, estas sustancias producen toxicidad mediante efectos osmóticos (Lipnick, 1986).

#### A9.6.4.10 *Factor de bioconcentración (FBC)*

A9.6.4.10.1 Si se dispone de valores del FBC determinados experimentalmente, deberán usarse para la clasificación. Las mediciones de la bioconcentración han de hacerse usando muestras puras, con concentraciones de ensayo inferiores a la solubilidad en agua y con una duración del ensayo adecuada para lograr un estado de estado estacionario entre la concentración en el agua y aquella en los tejidos del pez. Asimismo, en ensayos de bioconcentración de larga duración, la correlación con los valores de log  $K_{ow}$  se estabiliza y acaba por disminuir. En condiciones ambientales, la bioconcentración de productos químicos muy lipófilos tiene lugar al principio mediante una absorción combinada desde los alimentos y el agua, basándose la bioacumulación sólo en la absorción alimentaria a partir de un log  $K_{ow} \approx 6$ . En otro caso, cabe utilizar los valores de log  $K_{ow}$  en asociación con un modelo QSAR para predecir el potencial de

bioacumulación de los compuestos orgánicos. Las desviaciones respecto a esas QSAR tienden a reflejar el grado de las diferencias en la metabolización de las sustancias en el pez. Así, algunos productos químicos como los ftalatos, pueden concentrarse apreciablemente menos de lo previsto. También conviene ser prudente al comparar las predicciones de los valores del FBC con los datos obtenidos con compuestos marcados radiactivamente, donde la concentración en el tejido así detectada puede representar una mezcla del compuesto parental y de los metabolitos, o incluso de un compuesto parental o un metabolito enlazado de manera covalente.

A9.6.4.10.2 Preferentemente se usarán valores experimentales de  $\log K_{ow}$ . Sin embargo, valores obtenidos en el pasado con el método de agitación en vaso y superiores a 5,5 no son fiables y, en muchos casos, será mejor usar algún promedio de valores calculados o rehacer las mediciones con el método de agitación suave (Bruijn *et al.*, 1989). Cuando haya dudas razonables sobre la precisión de los datos medidos, se recurrirá a los valores calculados de  $\log K_{ow}$ .

#### A9.6.4.11 *Degradabilidad abiótica y biodegradación*

Las QSAR que sirven para evaluar la degradación abiótica en fases acuosas son relaciones lineales de energía libre (LFER), estrechamente definidas para clases específicas de sustancias y mecanismos. Por ejemplo, se dispone de esas relaciones para la hidrólisis de cloruros de bencilo con varios sustituyentes en el núcleo aromático. Esos modelos LFER tienden a ser muy fiables cuando se tienen los parámetros necesarios para los sustituyentes en cuestión. La fotodegradación, es decir, la reacción con las especies reactivas producidas por los rayos UV, puede extrapolarse a partir de estimaciones para el compartimento aéreo. Si bien estos procesos abióticos no suelen entrañar una degradación completa de los compuestos orgánicos, constituyen a menudo puntos de partida importantes y pueden ser limitantes en lo que atañe a la velocidad de degradación. Las QSAR para calcular la biodegradabilidad son modelos específicos para cada compuesto (OCDE, 1995) o modelos que utilizan las contribuciones de los grupos funcionales, como el programa BIODEG (Hansch y Leo, 1995; Meylan y Howard, 1995; Hilal *et al.*, 1994; Howard *et al.*, 1992; Boethling *et al.*, 1994; Howard y Meylan, 1992; Loonen *et al.*, 1999). Si bien el campo de aplicación de los modelos validados específicos de una categoría de compuestos es muy estrecho, el de los modelos de las contribuciones de los grupos funcionales es potencialmente mayor, pero se limita a los compuestos que contienen las subestructuras cubiertas por el modelo. Estudios de validación han sugerido que las predicciones de biodegradabilidad proporcionadas por los modelos que utilizan las contribuciones de los grupos funcionales actualmente disponibles pueden servir para prever la “no-biodegradabilidad fácil” (Pedersen *et al.*, 1995; Langenberg *et al.*, 1996; US EPA, 1993) y, por tanto, en relación con la clasificación del peligro acuático, la “no-degradabilidad rápida”.

#### A9.6.4.12 *Toxicidad acuática aguda en peces, dafnias y algas*

La toxicidad acuática aguda de productos químicos orgánicos no reactivos y no electrolíticos (toxicidad de referencia) puede predecirse por su valor de  $\log K_{ow}$  con bastante confianza, siempre que no se haya detectado la presencia de grupos funcionales electrófilos, proelectrófilos o que actúen según un mecanismo especial (véase más arriba). Siguen planteándose problemas para aquellos tóxicos específicos, en los que ha de seleccionarse el modelo QSAR apropiado de manera empírica. Como faltan todavía criterios sencillos para identificar los modos de acción pertinentes, habrá que recabar la opinión de los expertos para elegir un modelo conveniente. Así, si se utiliza una relación QSAR inapropiada, el error de las previsiones puede alcanzar varios órdenes de magnitud y, en el caso de la toxicidad de referencia, arrojar un resultado que peca más bien por defecto que por exceso.

#### A9.6.4.13 *Toxicidad a largo plazo para peces y dafnias*

Los valores calculados de toxicidad crónica en peces y dafnias no deberían usarse para anular una clasificación basada en datos de toxicidad aguda experimental. Sólo se dispone de unos pocos modelos validados para calcular la toxicidad a largo plazo en peces y dafnias. Estos modelos se basan únicamente en las correlaciones del  $\log K_{ow}$ , y se limitan en su aplicación a compuestos orgánicos no reactivos y no electrolíticos, y no sirven para sustancias con modos específicos de acción en condiciones de exposición prolongada. Una estimación fiable de los valores de toxicidad crónica dependerá de la discriminación correcta entre mecanismos específicos y no específicos de toxicidad; en otro caso, la predicción de toxicidad puede estar equivocada en varios órdenes de magnitud. Conviene advertir que, aun

cuando para muchos compuestos, un exceso de toxicidad<sup>4</sup> en un ensayo de toxicidad crónica se corresponde con un exceso de toxicidad en un ensayo de toxicidad aguda, esto no siempre es así.

## **A9.7 Clasificación de metales y compuestos metálicos**

### **A9.7.1 Introducción**

A9.7.1.1 El sistema armonizado de clasificación de sustancias es un sistema basado en los peligros y la base de la identificación de este último es la toxicidad acuática de las sustancias y la información sobre el comportamiento en materia de degradación y bioacumulación (OCDE, 1998). Como el presente documento se ocupa sólo de los peligros asociados a una determinada sustancia cuando ésta se disuelve en el medio acuoso, la exposición a esta fuente se ve limitada por la solubilidad en agua y la biodisponibilidad de la sustancia para las especies presentes en el medio acuático. Así, los sistemas de clasificación de peligro para los metales y los compuestos metálicos se limitan a los peligros que presentan estos productos cuando están disponibles (es decir, cuando existen como iones metálicos disueltos, por ejemplo como  $M^+$  en presencia de  $M-NO_3$ ), y no tienen en cuenta exposiciones a metales y compuestos metálicos no disueltos en el medio acuoso, pero que pueden sin embargo estar biodisponibles, como ocurre con los metales presentes en los alimentos. Este capítulo no tiene en cuenta el anión asociado (por ejemplo,  $CN^-$ ) a compuestos metálicos, que pueden ser tóxicos u orgánicos y comportar peligros debidos a la persistencia o a la bioacumulación. En estos compuestos metálicos también deberán considerarse los peligros de los aniones asociados.

A9.7.1.2 La cantidad de iones metálicos que pueden estar presentes en disolución después de añadir el metal y/o sus compuestos vendrá en buena parte determinada por dos parámetros: la medida en que puede disolverse, es decir, su solubilidad en agua, y hasta qué punto puede reaccionar con el medio para transformarse en formas hidrosolubles. La velocidad y la extensión de este último proceso, conocido como “transformación” a los efectos del presente documento, pueden variar mucho entre diferentes compuestos y el propio metal, y es un factor importante para determinar la clase apropiada de peligro. Cuando se disponga de datos sobre la transformación, deberían tenerse presentes al establecer la clasificación. En el anexo 10 figura el protocolo para determinar la velocidad del proceso.

A9.7.1.3 De manera general, la tasa a la que una sustancia se disuelve no se considera relevante para determinar su toxicidad intrínseca. No obstante, en metales y muchos compuestos metálicos inorgánicos poco solubles, las dificultades para lograr la disolución con las técnicas habituales son tan grandes que los dos procesos de solubilización y de transformación no se pueden distinguir. La velocidad y la extensión de la transformación deberán tenerse en cuenta cuando el compuesto sea tan poco soluble que las cantidades disueltas después de unas tentativas normales de solubilización no superen la  $C(E)L_{50}$ . La transformación se verá afectada por varios factores, en particular las propiedades del medio en términos de pH, dureza del agua, temperatura, etc. Además de esas propiedades, otros factores como el tamaño y la superficie específica de las partículas sometidas a ensayo, la duración de exposición al medio y, claro está, el área de la superficie o la cantidad de la sustancia en el medio, desempeñarán todos ellos un papel en la determinación de la cantidad de iones metálicos disueltos en el agua. Por regla general, los datos de transformación sólo podrán considerarse fiables a efectos de clasificación si los ensayos se han hecho de conformidad con el protocolo normalizado que figura en el Anexo 10.

A9.7.1.4 Ese protocolo se propone normalizar las principales variables, con el fin de permitir relacionar directamente la cantidad de iones disueltos con la carga (cantidad) de sustancia añadida. Es esta carga la que determina la cantidad de iones metálicos equivalente a la  $C(E)L_{50}$  disponible, que se puede utilizar a continuación para determinar la categoría de peligro apropiada en la clasificación. En el anexo 10 se describe la metodología de ensayo. La estrategia que hay que seguir para utilizar los datos procedentes del protocolo de ensayo y la información necesaria para el funcionamiento de esa estrategia se describen más adelante.

A9.7.1.5 Al considerar la clasificación de los metales y compuestos metálicos, ya sean fácilmente solubles o poco solubles, hay que tener en cuenta varios factores. Tal como se definió en el capítulo 3.10, el término “degradación” se refiere a la descomposición de moléculas orgánicas. En los compuestos inorgánicos y los metales, el concepto de degradabilidad, tal como se ha considerado y utilizado en las

---

<sup>4</sup> Toxicidad en exceso,  $T_e = (\text{toxicidad de referencia según predicción})/\text{toxicidad observada}$ .

sustancias orgánicas, tiene poco o ningún significado. Más bien, la sustancia puede transformarse mediante procesos naturales en el medio ambiente, aumentando o disminuyendo la biodisponibilidad de las especies tóxicas. Igualmente, el  $\log K_{ow}$  no puede ser considerado como una medida del potencial de acumulación. No obstante, la idea de que una sustancia o un metabolito o un producto de reacción tóxicos pueden no desaparecer rápidamente del medio ambiente y/o acumularse en los organismos vivos se aplica tanto a los metales y compuestos metálicos como a las sustancias orgánicas.

A9.7.1.6 La especiación de la forma soluble puede verse afectada por el pH, la dureza del agua y otras variables, y producir formas particulares del catión metálico que son más o menos tóxicas. Además, los iones metálicos pueden volverse no disponibles en la columna de agua por diversos procesos (mineralización y migración/disipación, por ejemplo). A veces, estos procesos pueden ser lo bastante rápidos como para considerarse análogos a una degradación al evaluar la clasificación crónica. No obstante, la migración/disipación del ión metálico desde/en la columna de agua a otros compartimentos ambientales no significa necesariamente que ya no esté biodisponible ni que se vuelva indisponible de modo permanente.

A9.7.1.7 La información sobre el grado de migración/disipación de un ión metálico desde/en la columna de agua, o sobre hasta qué punto un metal ha sido o puede convertirse en una forma que sea menos o nada tóxica, no suele estar disponible en un rango lo suficientemente amplio de condiciones ambientales relevantes; así, será necesario hacer varias suposiciones para facilitar la clasificación. Estas suposiciones podrán modificarse si los datos disponibles indican otra cosa. En el primer caso, habría que suponer que los iones metálicos, una vez en el agua, no migran/se disipan rápidamente desde/en la columna de agua y, por tanto, tales compuestos no satisfacen los criterios. Tal suposición se basa en que, aun cuando pueda producirse la especiación, las especies seguirán disponibles en condiciones ambientales relevantes. Puede que no ocurra siempre así, como ya se dijo, por lo que habría que examinar con cuidado toda información que sugiriera cambios en la biodisponibilidad en el transcurso de 28 días. La bioacumulación de metales y compuestos metálicos inorgánicos es un proceso complejo y los datos de bioacumulación deberían emplearse con cautela. La aplicación de los criterios de bioacumulación tendrá que hacerse caso por caso, tomando debidamente en cuenta todos los datos disponibles.

A9.7.1.8 Puede hacerse otra suposición más, que representa una aproximación prudente, a saber, que a falta de cualquier dato de solubilidad, ya sea medido o calculado, de un determinado compuesto metálico, la sustancia será lo bastante soluble como para causar toxicidad al nivel de la  $C(E)L_{50}$ , y podrá así clasificarse del mismo modo que otras sales solubles. También en este caso esto no siempre ocurre y sería aconsejable generar datos de solubilidad apropiados.

A9.7.1.9 El presente capítulo se ocupa de los metales y los compuestos metálicos. En el contexto de este documento guía, esos productos se caracterizan como sigue y, por tanto, los compuestos organometálicos quedan fuera del ámbito de esta sección:

- a) los metales,  $M^0$ , en su estado elemental no son solubles en agua pero pueden transformarse para que adquieran la forma disponible. Esto significa que un metal en el estado elemental puede reaccionar con el agua o con un electrolito acuoso diluido para formar productos catiónicos o aniónicos solubles, y en el proceso el metal se oxidará o se transformará, pasando del estado neutro o de un grado de oxidación cero a otro de mayor oxidación;
- b) en un compuesto metálico simple, como un óxido o sulfuro, el metal existe ya en el estado oxidado, por lo que la oxidación del metal es poco probable que se produzca cuando el compuesto se introduce en un medio acuoso.

No obstante, si bien la oxidación quizá no varíe, la interacción con el medio puede producir formas más solubles. Un compuesto metálico moderadamente soluble puede considerarse como un compuesto para el cual es posible calcular un producto de solubilidad, y que producirá por disolución una pequeña cantidad de la forma disponible. Con todo, hay que reconocer que la concentración final de la disolución puede verse influida por factores tales como el producto de solubilidad de algunos compuestos metálicos precipitados durante el ensayo de transformación/disolución, por ejemplo el hidróxido de aluminio.

## **A9.7.2      *Aplicación de los datos de toxicidad acuática y solubilidad a la clasificación***

### **A9.7.2.1      *Interpretación de los datos de toxicidad acuática***

A9.7.2.1.1      Los estudios de toxicidad acuática efectuados con arreglo a un protocolo reconocido deberían normalmente aceptarse como válidos a los efectos de clasificación. La sección A9.3 también debería consultarse para los problemas genéricos que se suscitan comúnmente al evaluar cualquier dato de toxicidad acuática con fines de clasificación.

#### **A9.7.2.1.2      Complejación y especiación de los metales**

A9.7.2.1.2.1      La toxicidad de un determinado metal en disolución parece depender sobre todo (pero no exclusivamente) de la cantidad de iones metálicos libres disueltos. Factores abióticos, como la alcalinidad, la fuerza iónica y el pH, pueden actuar sobre la toxicidad de los metales de dos maneras: i) influyendo en la especiación química del metal en el agua (y afectando con ello a la disponibilidad) y ii) modulando la absorción y la fijación del metal disponible por los tejidos biológicos.

A9.7.2.1.2.2      Cuando la especiación es importante, quizá sea posible modelar las concentraciones de las diferentes formas del metal, incluidas aquéllas susceptibles de provocar toxicidad. Los métodos analíticos para cuantificar las concentraciones de exposición y capaces de distinguir entre las fracciones de la sustancia de ensayo, que se complejen o no se complejen, pueden no estar siempre disponibles o no resultar económicos.

A9.7.2.1.2.3      La complejación de los metales con ligandos orgánicos e inorgánicos en el medio de ensayo y ambientes naturales puede estimarse con modelos de especiación de metales. Los modelos de especiación de metales que incluyen el pH, la dureza, el carbono orgánico disuelto (COD) y sustancias inorgánicas, tales como MINTEQ (Brown y Allison, 1987), WHAM (Tipping, 1994) y CHESS (Santore y Driscoll, 1995) para calcular las fracciones de los iones metálicos que se complejan y no se complejan. Alternativamente, también el *Biotic Ligand Model* (BLM) permite calcular la concentración del ión metálico responsable del efecto tóxico a nivel del organismo. El modelo BLM ha sido sólo validado hasta ahora para un contado número de metales, organismos y efectos (Santore y Di Toro, 1999). Los modelos y las fórmulas utilizadas para caracterizar la complejación de metales en el medio deberían siempre indicarse claramente para permitir su transposición al medio natural (OCDE, 2000).

### **A9.7.2.2      *Interpretación de los datos de solubilidad***

A9.7.2.2.1      Al considerar los datos de solubilidad disponibles, habrá que evaluar su validez y aplicabilidad a la identificación del peligro de los compuestos metálicos. Concretamente, convendrá conocer el pH en el que se han obtenido los datos.

#### **A9.7.2.2.2      Evaluación de los datos existentes**

Los datos existentes revestirán una de estas tres formas. En algunos metales bien estudiados, se dispondrá de productos y/o datos de solubilidad para los diversos compuestos metálicos inorgánicos. También es posible que se conozca la relación entre el pH y la solubilidad. Sin embargo, en muchos metales o compuestos metálicos, es probable que la información disponible sea sólo descriptiva, con la mención, por ejemplo, de poco soluble. Por desgracia, parece haber indicaciones muy escasas (y coherentes) sobre el rango de solubilidad que corresponde a estos términos descriptivos. Cuando únicamente se disponga de ese tipo de información probablemente será necesario obtener los datos de solubilidad aplicando el protocolo de transformación/disolución (Anexo 10).

#### **A9.7.2.2.3      Ensayo preliminar de evaluación de la solubilidad de compuestos metálicos**

A falta de datos de solubilidad, es posible, en los compuestos metálicos, utilizar un simple ensayo preliminar de evaluación, basado en la cantidad de sustancia añadida (tasa de carga) más alta en 24 h, tal como se describe en el protocolo de transformación/disolución (Anexo 10). La función de este ensayo preliminar es identificar los compuestos metálicos que presentan una disolución o una transformación rápida, de modo que son indistinguibles de las formas solubles y pueden, por tanto, clasificarse basándose en la

concentración de iones disueltos. Cuando se disponga de datos de ese ensayo preliminar detallado en el protocolo de transformación/disolución, debería usarse la solubilidad máxima obtenida en el rango de pH del ensayo. Cuando esto no ocurra, debería comprobarse que esta solubilidad máxima se ha obtenido con referencia a modelos termodinámicos de especiación adecuados o con otros métodos apropiados (véase A9.7.2.1.2.3). Nótese que este ensayo sólo sirve para compuestos metálicos.

#### A9.7.2.2.4 Ensayo completo para evaluar la solubilidad de metales y compuestos metálicos

El primer paso en esta parte del estudio consiste, al igual que en el ensayo preliminar, en evaluar el o los valores de pH con los que debería hacerse el estudio. Normalmente, el ensayo deberá haberse realizado con el pH que maximice la concentración de los iones metálicos disueltos en la disolución. En tales casos, el pH podrá elegirse del modo indicado para el ensayo preliminar.

Basándose en los datos del ensayo completo, será posible generar una concentración de los iones metálicos en la disolución al cabo de 7 días para cada una de las cargas (es decir, 1 mg/l para el nivel de carga o cantidad de sustancia añadida “bajo”, 10 mg/l para el nivel “medio” y 100 mg/l para el nivel “alto”) utilizadas en el ensayo. Si el propósito de éste es evaluar el peligro de la sustancia a largo plazo, podrá prolongarse a 28 días en el caso de un nivel bajo de carga, con un pH apropiado.

#### A9.7.2.3 Comparación de los datos de toxicidad acuática y solubilidad

La decisión de si la sustancia se clasificará o no podrá hacerse comparando los datos de toxicidad acuática con los de solubilidad. Si se supera la  $C(E)L_{50}$ , con independencia de si los datos de toxicidad y disolución se refieren o no al mismo pH y si son los únicos datos disponibles, entonces la sustancia debería clasificarse. Si se dispone de otros datos de solubilidad que indiquen que la concentración de la disolución no sobrepasará la  $C(E)L_{50}$  en todo el rango del pH, en tal caso la sustancia no debería clasificarse en su forma soluble. Esto puede requerir datos adicionales, bien de ensayos ecotoxicológicos, bien de modelos apropiados de biodisponibilidad-efecto.

### A9.7.3 Evaluación de la transformación en el medio ambiente

A9.7.3.1 La transformación medioambiental de una especie química de un metal en otra del mismo metal no constituye una degradación en el sentido de aplicación de este término a compuestos orgánicos, y puede aumentar o disminuir la disponibilidad y biodisponibilidad de las especies tóxicas. No obstante, bajo el efecto de procesos geoquímicos naturales, los iones metálicos pueden migrar/disiparse desde/en la columna de agua. Los datos relativos al tiempo de residencia en la columna de agua y a los procesos que se producen en la interfase agua-sedimento (es decir, deposición y removilización) son bastante numerosos, pero no han sido integrados en una verdadera base de datos. No obstante, utilizando los principios y supuestos examinados antes en la sección A9.7.1, será posible incorporar esta aproximación a la clasificación

A9.7.3.2 Es muy difícil dar orientaciones para esas evaluaciones, que normalmente se tratarán caso por caso. Así y todo, deberían tenerse en cuenta los elementos siguientes:

- a) Los cambios en la especiación si dan lugar a formas no disponibles, considerando el potencial de reversión;
- b) La transformación en un compuesto metálico bastante menos soluble que el compuesto metálico inicial.

Se recomienda, con todo, adoptar algunas precauciones (véanse A9.7.1.5 y A9.7.1.6).

#### **A9.7.4            *Bioacumulación***

A9.7.4.1            Aunque el log  $K_{ow}$  permite predecir bien el FBC de ciertos tipos de compuestos orgánicos, tales como las sustancias orgánicas no polares, es irrelevante para sustancias inorgánicas como los compuestos metálicos inorgánicos.

A9.7.4.2            Los mecanismos por los que se rigen las tasas de absorción y depuración de los metales son muy complejos y variables, y hoy por hoy no se cuenta con ningún modelo general para describirlos. Por ello, habrá que evaluar la bioacumulación de los metales en función de los criterios de clasificación procediendo caso por caso y recurriendo al dictamen de los expertos.

A9.7.4.3            Si bien el FBC es un indicador del potencial de bioacumulación, pueden surgir varias complicaciones al interpretar los valores medidos del FBC en metales y compuestos metálicos inorgánicos. Para algunos metales y compuestos metálicos inorgánicos la relación entre la concentración en agua y el FBC en algunos organismos acuáticos se invierte, y los datos de bioconcentración deberían emplearse con cuidado. Esto es particularmente relevante en metales que sean biológicamente esenciales. Estos metales están activamente regulados en los organismos para los que son esenciales. Como las necesidades nutricionales del organismo pueden ser superiores a las de la concentración ambiental, esa regulación activa puede traducirse en un FBC mayor y en una relación inversa entre este factor y la concentración del metal en el agua. Cuando las concentraciones ambientales sean bajas, cabe esperar un FBC alto como consecuencia natural de la absorción del metal para satisfacer las necesidades nutricionales y, en esos casos, este fenómeno podrá considerarse un hecho normal. Asimismo, si la concentración interna está regulada por el organismo, entonces el FBC medido puede disminuir cuando aumenta la concentración externa. Cuando esta última es tan elevada que supera un nivel umbral o supera la capacidad del mecanismo de regulación, puede resultar nociva para el organismo. Además, aunque un metal puede ser esencial en un determinado organismo quizá no lo sea en otros. Por tanto, cuando el metal no sea esencial o cuando la bioconcentración de un metal esencial supere los niveles nutricionales, deberá prestarse especial atención al potencial de bioconcentración y a los problemas ambientales.

#### **A9.7.5            *Aplicación de los criterios de clasificación a metales y compuestos metálicos***

##### **A9.7.5.1            *Introducción a la estrategia de clasificación de metales y compuestos metálicos***

A9.7.5.1.1            Seguidamente se describen los sistemas de clasificación de metales y compuestos metálicos que se resumen en forma de diagrama en la figura A9.7.1. Esos sistemas disponen de varias etapas, en las que los datos se utilizan para tomar decisiones. El objetivo de los esquemas de clasificación no es generar datos nuevos. A falta de información válida, será necesario usar todos los datos disponibles y recurrir a la opinión de los expertos.

En las secciones siguientes, la referencia a la  $C(E)L_{50}$  remite a la información de los datos que se usarán para seleccionar la categoría de clasificación del metal o compuesto metálico.

A9.7.5.1.2            Al considerar los datos de  $C(E)L_{50}$  de compuestos metálicos, es importante asegurarse de que la información de los datos que se use para justificar la clasificación se expresa mediante el peso de la molécula del compuesto metálico que hay que clasificar. Esto se conoce con el nombre de corrección en función del peso molecular. Así, si bien casi todos los datos de los metales se expresan, por ejemplo, en mg de metal/l, ese valor tendrá que ajustarse al peso correspondiente del compuesto metálico. Por tanto:

$$C(E)L_{50} \text{ de un compuesto metálico} = C(E)L_{50} \text{ del metal} \times (\text{Masa molecular del compuesto metálico} / \text{masa atómica del metal})$$

También podrá ser necesario ajustar los datos de la NOEC a la masa molecular correspondiente de los compuestos metálicos.



#### A9.7.5.2 *Estrategia de clasificación de los metales*

A9.7.5.2.1 Cuando la  $C(E)L_{50}$  de los iones metálicos considerados sea superior a 100 mg/l, no hará falta seguir con el esquema de clasificación para el metal de que se trate.

A9.7.5.2.2 Cuando la  $C(E)L_{50}$  de los iones metálicos considerados sea  $\leq 100$  mg/l, habrá que examinar los datos disponibles sobre la velocidad y la extensión de la producción de iones a partir del metal. Para que sean válidos y puedan utilizarse, estos datos deberán haberse obtenido con el protocolo de transformación/disolución (Anexo 10).

A9.7.5.2.3 Cuando no se disponga de esos datos, es decir, no se tenga información clara suficientemente válida que muestre que no habrá una transformación en iones metálicos, debería aplicarse la clasificación de seguridad (Categoría Crónica 4), por considerar que la toxicidad de esas formas metálicas solubles es un motivo suficientemente preocupante.

A9.7.5.2.4 Cuando se disponga de datos procedentes del protocolo de disolución, los resultados deberían usarse para facilitar la clasificación con arreglo a las normas siguientes:

##### A9.7.5.2.4.1 Ensayo de transformación de 7 días

Si la concentración de iones metálicos disueltos al cabo de 7 días (o antes) supera la  $C(E)L_{50}$ , la clasificación por defecto del metal se sustituirá por la clasificación siguiente:

- a) Si la concentración de iones metálicos disueltos para el nivel bajo de cantidad añadida del producto del ensayo es superior o igual a la  $C(E)L_{50}$ , el metal se clasificará en la categoría de peligro Agudo 1. Se clasificará también en la categoría de peligro Crónico 1, a menos que se tenga la prueba de una migración/disipación rápida desde/en la columna de agua hacia otros compartimentos ambientales y de una ausencia de bioacumulación;
- b) Si la concentración de iones metálicos disueltos para el nivel medio de cantidad añadida del producto del ensayo es superior o igual a la  $C(E)L_{50}$ , el metal se clasificará en la categoría de peligro Agudo 2. También se clasificará en la categoría de peligro Crónico 2, a menos que se tenga la prueba de una migración/disipación rápida desde/en la columna de agua hacia otros compartimentos ambientales y de una ausencia de bioacumulación;
- c) Si la concentración de iones metálicos disueltos para el nivel alto de cantidad añadida del producto del ensayo es superior o igual a la  $C(E)L_{50}$ , el metal se clasificará en la categoría de peligro Agudo 3. Se clasificará también en la categoría de peligro Crónico 3, a menos que se tenga la prueba de una migración/disipación rápida desde/en la columna de agua hacia otros compartimentos ambientales y de una ausencia de bioacumulación.

##### A9.7.5.2.4.2 Ensayo de transformación de 28 días

Si el proceso descrito en A9.7.5.2.4.1 conduce a una clasificación en la categoría de peligro crónico 1, no será necesaria ninguna evaluación suplementaria, ya que el metal se clasificará independientemente de toda información suplementaria.

En todos los demás casos, cabe obtener datos complementarios con el ensayo de disolución/transformación, con miras a demostrar que la clasificación puede modificarse. Si en sustancias clasificadas en las categorías de peligro Crónico 2, 3 o 4, la concentración de iones metálicos disueltos para el nivel bajo de sustancia añadida del producto sometido a ensayo al cabo de 28 días, es inferior o igual a la NOEC a largo plazo, la clasificación podrá suprimirse.

### A9.7.5.3 *Estrategia de clasificación de los compuestos metálicos*

A9.7.5.3.1 Cuando la  $C(E)L_{50}$  de los iones metálicos considerados sea  $> 100$  mg/l, no hará falta seguir con el sistema de clasificación para el compuesto metálico de que se trate.

A9.7.5.3.2 Si la solubilidad es  $\geq C(E)L_{50}$ , la clasificación deberá hacerse en función del ión soluble.

A9.7.5.3.2.1 Todos los compuestos metálicos que presenten una solubilidad en agua (medida, por ejemplo, con el ensayo preliminar de disolución de 24 h o estimada con el producto de solubilidad) superior o igual a la  $C(E)L_{50}$  del ión metálico disuelto, se considerarán compuestos metálicos fácilmente solubles. Conviene ser prudente cuando la solubilidad se acerque al valor de toxicidad aguda, pues las condiciones en las que se mide la solubilidad pueden diferir sensiblemente de las del ensayo de toxicidad aguda. En tal caso, será preferible utilizar los resultados del ensayo preliminar de disolución.

A9.7.5.3.2.2 Los compuestos metálicos fácilmente solubles se clasificarán basándose en la  $C(E)L_{50}$  (corregida en caso necesario por el peso molecular):

- a) Si la  $C(E)L_{50}$  del ión metálico disuelto es  $\leq 1$  mg/l, el compuesto se clasificará en la categoría de peligro Agudo 1. También se clasificará en la categoría de peligro Crónico 1, a menos que se tenga la prueba de una migración/disipación rápida desde/en la columna de agua hacia otros compartimentos ambientales y de una ausencia de bioacumulación;
- b) Si la  $C(E)L_{50}$  del ión metálico disuelto es  $> 1$  mg/l, pero  $\leq 10$  mg/l, el compuesto se clasificará en la categoría de peligro Agudo 2. También se clasificará en la categoría de peligro Crónico 2, a menos que se tenga la prueba de una migración/disipación rápida desde/en la columna de agua hacia otros compartimentos ambientales y de una ausencia de bioacumulación;
- c) Si la  $C(E)L_{50}$  del ión metálico disuelto es  $> 10$  mg/l, pero  $\leq 100$  mg/l, el compuesto se clasificará en la categoría de peligro Agudo 3. También se clasificará en la categoría de peligro Crónico 3, a menos que se tenga la prueba de una migración/disipación rápida desde/en la columna de agua hacia otros compartimentos ambientales y de una ausencia de bioacumulación.

A9.7.5.3.3 *Si la solubilidad es  $< C(E)L_{50}$ , el compuesto se clasificará por defecto en la categoría de peligro Crónico 4*

A9.7.5.3.3.1 En el contexto de los criterios de clasificación, los compuestos metálicos poco solubles se definen como los que presentan una solubilidad conocida (medida, por ejemplo, con el ensayo preliminar de disolución de 24 h o estimada con el producto de solubilidad) inferior a la  $C(E)L_{50}$  del ión metálico soluble. En los casos en que las formas solubles del metal de los compuestos metálicos poco solubles presenten un  $C(E)L_{50}$  inferior o igual a 100 mg/l y la sustancia pueda considerarse como poco soluble, deberá aplicarse la clasificación por defecto basada en razones de seguridad (Crónica 4).

#### A9.7.5.3.3.2 Ensayo de transformación de 7 días

En compuestos metálicos poco solubles clasificados por defecto y por motivos de seguridad, también podrá usarse información disponible de los ensayos de transformación/disolución de 7 días. En esos ensayos deberán figurar los niveles de transformación para cantidades añadidas del producto bajas, medias y altas.

Si la concentración de los iones metálicos disueltos al cabo de 7 días (o menos) sobrepasa la  $C(E)L_{50}$ , la clasificación por defecto de los metales se sustituirá por la siguiente:

- a) Si la concentración de iones metálicos disueltos para bajas cantidades del producto del ensayo es superior o igual a la  $C(E)L_{50}$ , el compuesto se clasificará en la categoría de peligro Agudo 1. También se clasificará en la categoría de peligro Crónico 1, a menos que se tenga la prueba de una migración/disipación rápida desde/en la columna de agua hacia otros compartimentos ambientales y de una ausencia de bioacumulación;
- b) Si la concentración de iones metálicos disueltos para cantidades medias del producto del ensayo es superior o igual a la  $C(E)L_{50}$ , el compuesto se clasificará en la categoría de peligro Agudo 2. También se clasificará en la categoría de peligro Crónico 2, a menos que se tenga la prueba de una migración/disipación rápida desde/en la columna de agua hacia otros compartimentos ambientales y de una ausencia de bioacumulación;
- c) Si la concentración de iones metálicos disueltos para cantidades altas del producto del ensayo es superior o igual a la  $C(E)L_{50}$ , el compuesto se clasificará en la categoría de peligro Agudo 3. También se clasificará en la categoría de peligro Crónico 3, a menos que se tenga la prueba de una migración/disipación rápida desde/en la columna de agua hacia otros compartimentos ambientales y de una ausencia de bioacumulación;

#### A9.7.5.3.3.3 Ensayo de transformación de 28 días

Si el proceso descrito en A9.7.5.3.3.2 conduce a una clasificación en la categoría de peligro Crónico 1, no será necesaria ninguna evaluación suplementaria, ya que el compuesto metálico se clasificará independientemente de toda información suplementaria.

En todos los demás casos, cabe obtener datos complementarios con el ensayo de disolución/transformación de 28 días, con miras a demostrar que la clasificación puede modificarse. Si en compuestos poco solubles clasificados en las categorías de peligro Crónico 2, 3 o 4, la concentración de iones metálicos disueltos a baja cantidad del producto sometido a ensayo al cabo de 28 días, es inferior o igual a la NOEC a largo plazo, la clasificación podrá suprimirse.

#### A9.7.5.4.1 *Tamaño y superficie de las partículas*

A9.7.5.4.1 El tamaño o, sobre todo, la superficie de las partículas del producto constituye un parámetro crucial, puesto que toda variación de la dimensión o de la superficie de las partículas sometidas a ensayo puede provocar una modificación importante de las cantidades de iones metálicos liberadas en un intervalo de tiempo dado. Así, este tamaño o superficie de partícula se fija para el ensayo de transformación, lo que permite que las clasificaciones comparativas se basen únicamente en la cantidad del producto del ensayo. Normalmente, los datos de clasificación obtenidos utilizarán el tamaño más pequeño de las partículas comercializadas para determinar el grado de transformación. Puede haber casos en los que los datos obtenidos para una determinada forma de polvo metálico no se consideren apropiados para clasificar ese mismo producto en forma masiva. Por ejemplo, cuando pueda demostrarse que el polvo sometido a ensayo es estructuralmente una materia diferente (al presentar tal vez una estructura cristalográfica distinta) y/o cuando se haya obtenido mediante un procedimiento especial y no pueda obtenerse del metal masivo, la clasificación de éste podrá basarse en el ensayo a partir del tamaño o superficie de partícula más representativa, si se dispone de tales datos. El polvo podrá clasificarse por separado a tenor de los datos obtenidos de él. Sin embargo, en circunstancias normales, no se prevé que para un mismo metal se formulen más de dos propuestas de clasificación.

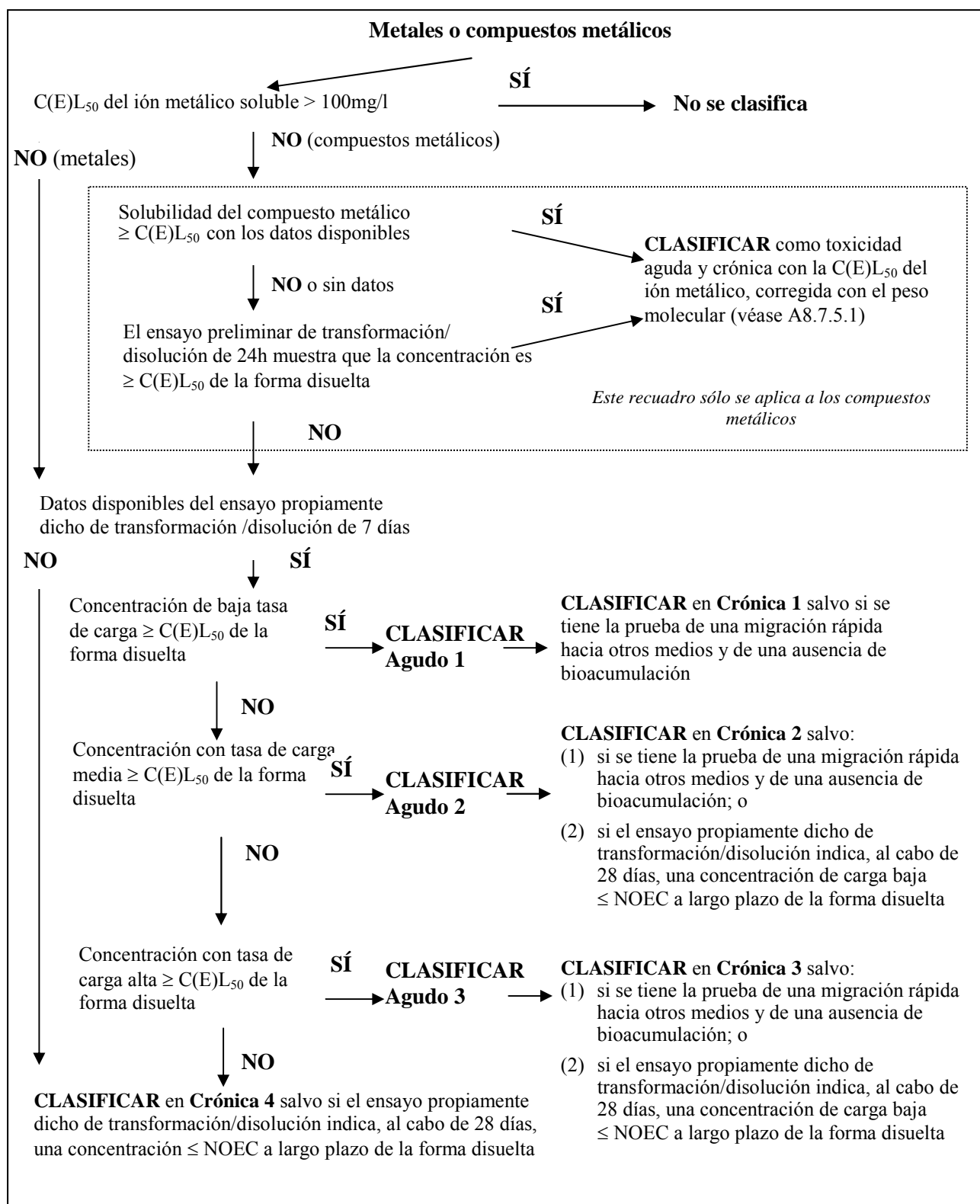
A9.7.5.4.2 Con los metales que presenten un tamaño de partícula inferior al diámetro por defecto de 1 mm pueden hacerse ensayos caso por caso. Cabe citar el ejemplo de metales en polvo obtenidos con una técnica de producción diferente o que dan lugar a una velocidad de disolución (o de reacción) más alta que la forma masiva, lo que conduce a una clasificación más severa.

A9.7.5.4.3 Los tamaños de las partículas del ensayo dependerán de la sustancia que se vaya a evaluar y se indican en la tabla siguiente:

<b>Tipo</b>	<b>Dimensión de la partícula</b>	<b>Comentarios</b>
Compuestos metálicos	Menor dimensión representativa comercializada	Nunca superior a 1 mm
Polvos metálicos	Menor dimensión representativa comercializada	Puede ser necesario tener en cuenta diferentes fuentes si los polvos presentan propiedades cristalográficas/ morfológicas diferentes.
Metales masivos	1 mm	El valor por defecto podrá modificarse si hay justificación suficiente.

A9.7.5.4.4 Para algunas formas metálicas, será posible, con el protocolo de transformación/disolución (OCDE, 2001), obtener una correlación entre la concentración del ión metálico al cabo de un determinado tiempo y la superficie de partícula de las formas ensayadas. En tales casos, cabría estimar la concentración de iones metálicos disueltos del metal con diferentes partículas, por el procedimiento basado en la superficie crítica propuesta por Skeaff *et. al.* (2000) (véase la referencia en el Apéndice VI, parte 5, Metales y compuestos metálicos). Es decir, a partir de esa correlación y de una relación con los datos de toxicidad apropiados, será posible determinar una superficie crítica de la sustancia correspondiente a la  $C(E)_{L_{50}}$  y convertir luego esa superficie para los niveles de cantidad de ensayo bajo, medio o alto utilizados en la identificación de los peligros. Si bien no se utiliza normalmente en la clasificación, esta aproximación puede, sin embargo, aportar información útil para el etiquetado y las decisiones ulteriores.

**Figura A9.7.1: Estrategia de clasificación de metales y compuestos metálicos**





## Anexo 9

### APÉNDICE I

#### Determinación de la degradabilidad de las sustancias orgánicas

1. Las sustancias orgánicas pueden degradarse por procesos abióticos o bióticos, o por una combinación de ambos. Para determinar la degradabilidad se dispone de cierto número de protocolos o de ensayos normalizados. Sus principios generales se describen a continuación. No se trata en modo alguno de presentar un balance exhaustivo de los métodos de ensayo de degradabilidad, sino sólo de situar esos métodos en el contexto de la clasificación de los peligros para el medio ambiente acuático.

#### 2. Degradabilidad abiótica

2.1 La degradación abiótica comprende la transformación química y la fotoquímica. Habitualmente, las transformaciones abióticas producen otros compuestos orgánicos, pero no una mineralización completa (Schwarzenbach *et al.*, 1993). Una transformación química se define como una transformación que tiene lugar en ausencia de luz y sin la mediación de organismos, mientras que las transformaciones fotoquímicas necesitan luz.

2.2 Entre los procesos de transformación química observados en un medio acuoso, cabe citar la hidrólisis, la sustitución nucleófila, la eliminación y las reacciones de oxidación y reducción (Schwarzenbach *et al.*, 1993). La hidrólisis se considera a menudo como la más importante de ellas y es el único proceso de transformación química para el que se dispone generalmente de directrices internacionales de ensayos. Los ensayos de degradación abiótica de productos químicos se basan casi siempre en la determinación de las tasas de transformación en condiciones estándar.

#### 2.3 Hidrólisis

2.3.1 Por hidrólisis se entiende la reacción de los nucleófilos  $H_2O$  u  $OH^-$  con un producto químico, en la que un grupo (saliente) se intercambia con un grupo  $OH^-$ . Muchos compuestos, especialmente los derivados de ácidos, pueden hidrolizarse. La hidrólisis puede ser abiótica o biótica, aunque aquí sólo se considerará la primera. Se efectúa por diversos mecanismos a diferentes pH (hidrólisis neutra o hidrólisis catalizada por un ácido o por una base); la velocidad de hidrólisis puede depender mucho del valor del pH.

2.3.2 Para evaluar la hidrólisis abiótica se dispone de dos ensayos, a saber, la Directriz 111 de la OCDE sobre “Hidrólisis en función del pH” (correspondiente a OPPTS 835.2110) y el método OPPTS 835.2130 (Hidrólisis en función del pH y de la temperatura). La Directriz 111 de la OCDE permite determinar la velocidad de hidrólisis global para diferentes valores del pH en agua pura tamponada. El ensayo se divide en dos partes, esto es, en un ensayo preliminar realizado con sustancias químicas cuya velocidad de hidrólisis se desconoce y un ensayo más detallado, hecho con sustancias que se sabe que son inestables hidrolíticamente en agua y con sustancias para las que el ensayo preliminar ha mostrado una hidrólisis rápida. En el ensayo preliminar se mide la concentración del compuesto químico en las soluciones tamponadas a pH comprendido en el rango que se encuentra habitualmente en el medio ambiente (pH de 4, 7 y 9), a 50 °C, al cabo de 5 días. Si la concentración del producto químico ha disminuido menos del 10 %, se considera hidrolíticamente estable en agua y si no es así se puede efectuar el ensayo detallado. El ensayo detallado consiste en determinar la tasa de hidrólisis global para tres valores de pH (4, 7 y 9), midiendo la concentración del producto químico en función del tiempo. Se determina la velocidad de hidrólisis a diferentes temperaturas para poder realizar interpolaciones o extrapolaciones a las temperaturas observadas en el medio ambiente. El ensayo OPPTS 835.2130 es casi idéntico al de la Directriz 111 de la OCDE, estribando principalmente la diferencia en el tratamiento de los datos.

2.3.3 Nótese que además de la hidrólisis, las constantes de velocidad de hidrólisis determinadas por ese tipo de ensayos abarcan todas las demás transformaciones abióticas que pueden producirse en ausencia de luz, en las condiciones de ensayo dadas. Se ha encontrado una buena concordancia entre la tasa de hidrólisis en aguas naturales y en aguas puras (OPPTS 835.2110).

## **2.4 Fotólisis**

2.4.1 Actualmente no existe directriz de la OCDE sobre la fotodegradación en el medio acuático, aunque se dispone de un documento guía sobre la fotólisis directa acuática (OCDE, 1997). Se supone que ese documento formará la base de una directriz que se publicará posteriormente. Según las definiciones establecidas en el documento guía, la fototransformación de compuestos en agua puede revestir la forma de una fototransformación primaria o secundaria, donde la primaria (fotólisis) puede desglosarse a su vez en fotólisis directa e indirecta. La fototransformación directa (fotólisis) ocurre cuando el producto químico absorbe luz y como resultado directo se transforma. La fototransformación indirecta se produce cuando otras especies excitadas transfieren energía, electrones o átomos de hidrógeno al producto químico, provocando así una transformación (fotólisis sensibilizada). La fototransformación secundaria sucede cuando se producen reacciones entre el producto químico y especies reactivas de corta vida, tales como radicales hidroxilos, peróxidos o bien oxígeno singlete que se forman en presencia de luz mediante reacciones de especies excitadas como ácidos húmicos o fúlvicos o bien nitratos.

2.4.2 Las únicas directrices actualmente disponibles sobre la fototransformación de las sustancias químicas en agua son, por tanto, la OPPTS 835.2210 (*Direct photolysis rate in water by sunlight*) y la OPPTS 835.5270 (*Indirect photolysis screening test*). El ensayo OPPTS 835.2210 sigue un enfoque por etapas. En la primera se calcula la constante de la tasa de fotólisis directa máxima (vida media mínima) a partir de una medida de la absortividad molar. En la segunda etapa hay dos fases. En la 1, el producto se fotoliza con luz solar y se obtiene una constante de velocidad aproximada. En la fase 2, se determina una constante de velocidad más precisa usando un actinómetro que cuantifica la intensidad de la luz a la que se ha expuesto realmente el producto químico. Una vez medidos estos parámetros, se puede calcular la tasa de fotodegradación directa real para diferentes temperaturas y distintas latitudes. La velocidad de degradación sólo se aplicará a la capa superficial de la masa de agua, por ejemplo a los primeros 50 cm o menos, y únicamente cuando el agua sea pura y saturada en aire, lo que, claro está, no sucede siempre en el medio ambiente. Sin embargo, los resultados pueden ampliarse a otras condiciones ambientales mediante un programa informático que integre la atenuación de la luz en aguas naturales y otros factores relevantes.

2.4.3 El ensayo preliminar OPPTS 835.5270 se refiere a la fotólisis indirecta de productos químicos en aguas que contengan sustancias húmicas. El principio en que se basa es que en aguas naturales expuestas a la luz solar natural, la tasa de fototransformación medida englobaría las tasas de fototransformación directa e indirecta, mientras que la fototransformación directa sólo se produce en agua pura. Por consiguiente, la diferencia entre la velocidad de fotodegradación directa en agua pura y la fotodegradación total en agua natural es la suma de la fotólisis indirecta y de la fotodegradación secundaria, según las definiciones que figuran en el documento guía del Anexo 9. En la práctica, en el ensayo se emplean sustancias húmicas comerciales para constituir un agua húmica sintética que imita el agua natural. Adviértase que la velocidad de transformación indirecta obtenida, únicamente es válida para la estación y la latitud en la que se haya determinado, y que es imposible extrapolar los resultados a otras latitudes y estaciones del año.

## **3. Degradabilidad biótica**

3.1 Se presenta sólo un breve panorama de los métodos de ensayo. Para más información, consúltase el documento de síntesis de la OCDE sobre los ensayos de biodegradabilidad (OCDE, 1995).

### **3.2 Biodegradabilidad fácil**

3.2.1 Varias organizaciones han preparado ensayos normalizados para determinar la biodegradabilidad fácil de sustancias orgánicas, como la OCDE (Directrices 301A-F), la UE (Ensayos C.4), la OPPTS (835.3110) y la ISO (9408, 9439, 10707).

3.2.2 Los ensayos de biodegradabilidad fácil son ensayos rigurosos que dejan poco margen para que se produzca una biodegradación y aclimatación. Las condiciones de ensayo básicas que garantizan esas especificaciones son:

- a) concentración elevada de la sustancia de ensayo (2 a 100 mg/l);
- b) la sustancia de ensayo es la única fuente de carbono y energía;



- c) baja y media concentración de inóculo (entre  $10^4$  y  $10^8$  células/ml);
- d) no se permite ninguna preadaptación del inóculo;
- e) período de ensayo de 28 días, con un intervalo de tiempo de 10 días (salvo para el método MITI modificado I (Directriz 301C de la OCDE), en el que ha de producirse la degradación;
- f) temperatura de ensayo  $< 25^\circ\text{C}$ ; y
- g) niveles umbral de 70% (eliminación del COD) o 60% (evolución de la demanda de  $\text{O}_2$  o de la producción de  $\text{CO}_2$ ), que demuestren una mineralización completa (supone que el resto de carbono de la sustancia de ensayo se ha integrado en la biomasa para su crecimiento).

3.2.3 Un resultado positivo en un ensayo de biodegradabilidad fácil indicará que la sustancia se degradará rápidamente en el medio ambiente (Directrices de la OCDE).

3.2.4 También los ensayos clásicos de  $\text{DBO}_5$  (por ejemplo, el ensayo C5 de la UE) pueden demostrar que una sustancia es fácilmente biodegradable. En esos casos, la demanda bioquímica de oxígeno relativa en un período de 5 días se compara con la demanda teórica de oxígeno (DTO) o, cuando no se dispone de ésta, con la demanda química de oxígeno (DQO). El ensayo sólo dura cinco días y, por consiguiente, el nivel umbral, establecido en el 50 % definido en los criterios de clasificación de peligro propuestos, es inferior al de los ensayos de biodegradabilidad fácil.

3.2.5 El ensayo preliminar de la biodegradabilidad en agua de mar (Directriz 306 de la OCDE) puede considerarse como un método paralelo a los ensayos de biodegradabilidad fácil en ese medio. Las sustancias cuya tasa de degradación alcance el nivel umbral en la Directriz 306 de la OCDE (eliminación del COD  $> 70\%$  o consumo de la DTO  $> 60\%$ ) pueden considerarse fácilmente biodegradables, ya que el potencial de degradación es normalmente menor en agua de mar que en agua dulce.

### **3.3 *Biodegradabilidad intrínseca***

3.3.1 Los ensayos de biodegradabilidad intrínseca están concebidos para evaluar si una sustancia tiene algún potencial de degradación. Ejemplos de esos ensayos son las Directrices 302A-C de la OCDE, los ensayos C.9 y C.12 de la UE y el ensayo ASTM E 1625-94.

3.3.2 Las condiciones básicas de ensayo que favorecen la evaluación del potencial de biodegradación intrínseca son:

- a) una exposición prolongada de la sustancia de ensayo al inóculo, permitiendo la adaptación antes del final del período de ensayo;
- b) una alta concentración de microorganismos;
- c) una relación favorable sustancia/biomasa.

3.3.3 Un resultado positivo en un ensayo de biodegradabilidad intrínseca indica que la sustancia ensayada no persistirá indefinidamente en el medio ambiente, pero que no se puede contar con una biodegradación rápida y completa. Un resultado que demuestre una mineralización superior al 70 % indica un potencial de biodegradación última, una degradación de más del 20 % revela una biodegradación primaria intrínseca, y un resultado inferior al 20 % indica que la sustancia es persistente. Así, un resultado negativo significa que hay que suponer una no-biodegradabilidad (persistencia) de la sustancia (Directrices de la OCDE).

3.3.4 En muchos ensayos de biodegradabilidad intrínseca sólo se mide la desaparición de la sustancia de ensayo. Ese resultado mostrará únicamente la biodegradabilidad primaria, y no una

mineralización completa. Pueden así formarse productos de degradación más o menos persistentes. La biodegradación primaria de una sustancia no indica que habrá degradabilidad última en el medio ambiente.

3.3.5 Los ensayos de biodegradabilidad intrínseca de la OCDE son muy diferentes en sus planteamientos, y especialmente el ensayo MITI II (Directriz 302C de la OCDE) utiliza una concentración de inóculo que es sólo tres veces superior a la del ensayo de biodegradabilidad fácil MITI I correspondiente (Directriz 301C de la OCDE). Del mismo modo, el ensayo Zahn-Wellens (Directriz 302B de la OCDE) es un ensayo de biodegradabilidad intrínseca relativamente “débil”. Sin embargo, aunque el potencial de degradación en esos ensayos no sea muy superior al de los ensayos de biodegradabilidad fácil, los resultados no podrán extrapolarse a las condiciones de los ensayos de biodegradabilidad fácil y al medio ambiente acuático.

### **3.4                    *Ensayos de simulación acuática***

3.4.1 Un ensayo de simulación es el que intenta estimar la biodegradación en un medio acuático específico. Como ejemplos de ensayos de simulación normalizada de degradación en el medio ambiente acuático cabe mencionar el método ISO/DS14592 de lotes de agitación en matraces con agua superficial o suspensiones agua superficial/sedimento (Nyholm y Toräng, 1999), el ASTM E 1279-89(95) (de biodegradación mediante un método de desaparición en matraz agitado) y el ensayo similar OPPTS 835.3170. Estos métodos se suelen denominar ensayos de eliminación en río.

3.4.2 Las características de los ensayos que aseguran una simulación de las condiciones del medio ambiente acuático son:

- a) la utilización de una muestra de agua y sedimentos naturales como inóculo; y
- b) una baja concentración de la sustancia de ensayo (1 a 100 µg/l) que asegure una cinética de degradación de primer orden.

3.4.3 Se recomienda utilizar compuestos de ensayo marcados radiactivamente para facilitar la determinación de la degradación última. Si sólo se determina la desaparición de la sustancia de ensayo mediante el análisis químico, únicamente se establecerá la degradabilidad primaria. De la observación de la cinética de degradación será posible deducir la constante de velocidad de esta última. Debido a la baja concentración de la sustancia de ensayo, se supone que prevalece una cinética de degradación de primer orden.

3.4.4 El ensayo también puede realizarse con sedimento natural simulando las condiciones en el compartimento del sedimento. Además, cabe determinar la degradación abiótica en las condiciones de ensayo esterilizando muestras.

### **3.5                    *Ensayos de simulación de estaciones de depuración de aguas residuales***

También se dispone de ensayos para simular la degradabilidad en una instalación de tratamiento de aguas residuales, como la Directriz 303A de la OCDE (Unidad de tratamiento mediante lodos activados), el ensayo ISO 11733 (Ensayo de simulación de lodos activados) y el ensayo C.10 de la UE. Recientemente se ha propuesto un nuevo ensayo de simulación que utiliza concentraciones bajas de contaminantes orgánicos (Nyholm *et al.*, 1996).

### **3.6** *Degradabilidad anaeróbica*

3.6.1 Los métodos de ensayo para evaluar la biodegradabilidad anaeróbica determinan el potencial intrínseco de biodegradación de la sustancia de ensayo en condiciones anaeróbicas. Entre esos métodos, cabe citar los ensayos ISO 11734:1995(E), ASTM E 1196-92 y OPPTS 835.3400.

3.6.2 El potencial de degradación anaeróbica se determina en un período de hasta ocho semanas y con las condiciones de ensayo siguientes:

- a) ejecución del ensayo en recipientes sellados en ausencia de O<sub>2</sub> (inicialmente en una atmósfera de N<sub>2</sub> puro);
- b) utilización de lodo de digestión anaeróbica;
- c) temperatura de ensayo de 35 °C; y
- d) determinación de la presión en la fase gaseosa del recipiente (formación de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>).

3.6.2 La degradación última vendrá determinada por la producción de gas. Sin embargo, también cabe calcular la degradación primaria midiendo la sustancia parental restante.

### **3.7** *Degradación en suelos y sedimentos*

3.7.1 Muchas sustancias terminan en el compartimento suelo y/o sedimento, por lo que puede ser importante evaluar su degradabilidad en estos compartimentos. Entre los métodos de ensayo normalizados, cabe citar la Directriz 304A de la OCDE sobre la biodegradabilidad intrínseca en el suelo, que se corresponde con el ensayo OPPTS 835.3300.

3.7.2 Las características especiales del ensayo que permiten determinar la degradabilidad intrínseca en el suelo son:

- a) la utilización de muestras de suelos naturales, sin inoculación adicional;
- b) empleo de una sustancia de ensayo marcada radiactivamente; y
- c) determinación de la evolución del CO<sub>2</sub> marcado.

3.7.4 El ensayo OPPTS 835.3180 (*Biodegradación en microcosmos agua-sedimento*) constituye un método normalizado para determinar la biodegradación en los sedimentos. Se recogen microcosmos que contengan sedimento y agua procedentes de los lugares de ensayo y se introducen los compuestos de ensayo en el sistema. Se mide la desaparición del compuesto parental (es decir, la biodegradación primaria) y, si cabe, la aparición de metabolitos y la biodegradación última.

3.7.5 Actualmente se están preparando dos nuevas directrices de la OCDE sobre transformación aeróbica y anaeróbica en el suelo (Directriz de la OCDE, 1999a) y en sistemas sedimentarios acuáticos (Directriz de la OCDE, 1999b). Los experimentos se proponen determinar la tasa de transformación de la sustancia de ensayo y la naturaleza y velocidad de formación y desaparición de los productos de transformación en condiciones medioambientales realistas, incluida una concentración también realista de la sustancia de ensayo. En función del método analítico empleado para determinar la transformación de esa sustancia, podrá evaluarse, la mineralización completa o la degradabilidad primaria.

### 3.8 *Métodos para estimar la biodegradabilidad*

3.8.1 En los últimos años se ha estudiado la posibilidad de estimar las propiedades ambientales de sustancias y también los métodos para predecir el potencial de biodegradabilidad de sustancias orgánicas (por ejemplo el Programa de probabilidad de biodegradabilidad de Syracuse Research Corporation, BIOWIN). En la revisión de estos métodos por la OCDE (1993) y Langenberg *et al.*, (1996) se llega a la conclusión de que los métodos basados en la contribución de grupos funcionales son los más eficaces. Entre ellos, el programa (BIOWIN) es el que tendría la mayor aplicación. Ofrece una estimación cualitativa de la probabilidad de biodegradación lenta o rápida, en presencia de una población mixta de microorganismos ambientales. Sus posibilidades de aplicación han sido estudiadas por el proyecto conjunto US EPA/CE sobre la evaluación de las (Q)SAR (OCDE, 1994) y por Pedersen *et al.*, (1995). Esta última evaluación se examina brevemente más abajo.

3.8.2 Un conjunto de validación constituido por datos experimentales de biodegradación ha sido seleccionado entre datos procedentes de los ensayos MITI (1992), excluyendo las sustancias para las que no se disponía de datos de degradación suficientemente precisos y de las sustancias ya utilizadas en el desarrollo del programa. El conjunto de validación comprendía entonces 304 sustancias cuya biodegradabilidad fue estimada con el módulo de estimación no lineal (el más fiable) del programa y los resultados se compararon con los datos experimentales. Se predijo una degradabilidad “rápida” para 162 sustancias, pero sólo 41 de ellas (25 %) mostraron efectivamente una degradación fácil en el ensayo MITI I. Se había previsto que 142 sustancias se degradarían “lentamente”, lo que se confirmó para 138 sustancias (97 %) que no resultaban fácilmente degradables en el ensayo MITI I. Se concluyó que sólo era posible utilizar el programa con fines de clasificación sólo cuando no se pueden obtener datos experimentales de degradación y cuando el programa predijera una degradación “lenta” de la sustancia. En este caso, la sustancia podrá considerarse no degradable rápidamente.

3.8.3 A la misma conclusión se llegó en el proyecto conjunto US EPA/CE sobre evaluación de las (Q)SAR utilizando datos experimentales y datos del tipo QSAR para sustancias nuevas notificadas en la UE. La evaluación se basaba en un análisis de las predicciones realizadas con las QSAR para 115 sustancias nuevas ensayadas experimentalmente en ensayos de biodegradabilidad fácil. Únicamente 9 de las sustancias que figuraban en ese análisis eran fácilmente biodegradables. La metodología QSAR empleada no está totalmente especificada en el informe final del proyecto conjunto US EPA/CE (OCDE, 1994), pero es probable que la mayoría de las predicciones se hicieran con métodos que después se han integrado en el *Biodegradation Probability Program*.

3.8.4 También se recomienda en el Documento guía técnico de la UE (CE, 1996) utilizar con prudencia la biodegradabilidad estimada en este último programa, ya que si en él se predice una biodegradación rápida, ese resultado no deberá tomarse en consideración, aunque sí, en cambio, la predicción de una biodegradación lenta (CE, 1996).

3.8.5 Así, una utilización prudente de los resultados del *Biodegradation Probability Program* puede satisfacer los requisitos para evaluar la biodegradabilidad de algunas de las muchas sustancias para las que no se dispone de datos experimentales de degradación.

## **Anexo 9**

### **APÉNDICE II**

#### **Factores que influyen en la degradabilidad en el medio ambiente acuático**

##### **1. Introducción**

1.1 Los criterios de clasificación de la OCDE sólo consideran los peligros para el medio ambiente acuático. Sin embargo, la clasificación de los peligros se basa principalmente en datos obtenidos de ensayos en condiciones de laboratorio que pocas veces son similares a las condiciones del medio ambiente. Así, la interpretación de los datos de los ensayos de laboratorio para predecir los peligros en el medio ambiente acuático deberá ser considerada.

1.2 En un estudio de la OCDE (OCDE, 1995) se ha hecho una interpretación detallada de los resultados de los ensayos sobre biodegradabilidad de sustancias orgánicas.

1.3 Las condiciones en el medio ambiente suelen ser muy diferentes de aquellas en los sistemas de ensayo normalizados, lo que hace difícil extrapolar los datos de estos ensayos al medio ambiente. Entre las diferencias, las siguientes influyen de manera significativa en la degradabilidad:

- a) Factores relativos a los organismos (presencia de microorganismos competentes);
- b) Factores relativos al sustrato (concentración de la sustancia y presencia de otros sustratos); y
- c) Factores relativos al medio (condiciones fisicoquímicas, presencia de nutrientes, biodisponibilidad de la sustancia).

Estos aspectos se examinan a continuación.

##### **2. Presencia de microorganismos competentes**

2.1 La biodegradación en el medio ambiente acuático depende de la presencia de microorganismos competentes en número suficiente. Las comunidades microbianas naturales consisten en una biomasa muy diversa y cuando se introduce una sustancia “nueva” con una concentración suficiente, la biomasa puede adaptarse para degradar esta sustancia. Es frecuente que la adaptación de la población microbiana venga provocada por el crecimiento de degradadores específicos, que por naturaleza son competentes para degradar la sustancia. No obstante, también pueden intervenir otros procesos, como la inducción enzimática, el intercambio de material genético y el desarrollo de una tolerancia a la toxicidad.

2.2 La aclimatación tiene lugar durante una fase de adaptación, que corresponde al lapso de tiempo desde el comienzo de la exposición hasta el inicio de una degradación apreciable. Parece obvio que la duración de la fase de adaptación dependerá de la presencia inicial de microorganismos degradadores competentes. Esto dependerá una vez más del historial de la comunidad microbiana, es decir, de si la comunidad ha estado antes expuesta a la sustancia. Esto significa que cuando una sustancia xenobiótica se ha usado y emitido de manera omnipresente durante varios años, aumentará la probabilidad de encontrar microorganismos degradadores competentes. Así ocurrirá especialmente en medios que reciben emisiones, como por ejemplo, instalaciones de depuración de aguas residuales por tratamiento biológico. A menudo se encuentran resultados de degradación más coherentes en los ensayos con inóculos procedentes de aguas contaminadas que ensayos con inóculos de aguas no contaminadas (OCDE, 1995; Nyholm e Ingerslev, 1997).

2.3 Son varios los factores que determinan que el potencial de adaptación en el medio ambiente acuático pueda compararse con el potencial en ensayos de laboratorio. Entre otras cosas, la adaptación dependerá de:

- a) el número inicial de microorganismos degradadores competentes en la biomasa microbiana (proporción y número);
- b) presencia de superficies de fijación;
- c) concentración y disponibilidad del sustrato; y
- d) presencia de otros sustratos.

2.4 La duración de la fase de adaptación dependerá del número inicial de microorganismos degradadores competentes y, para las sustancias tóxicas, de la capacidad de supervivencia y de recuperación de estos. En los ensayos normalizados de biodegradabilidad fácil, las muestras de inóculo se toman en las instalaciones de depuración de aguas residuales. Al ser la carga de los contaminantes normalmente superior a la que existe en el medio ambiente, la proporción y el número de microorganismos degradadores competentes serán quizá más importantes que en un medio ambiente acuático menos contaminado. Resultará, sin embargo, difícil estimar hasta qué punto la fase de adaptación durará más en el medio ambiente acuático que en un ensayo de laboratorio, probablemente debido al número inicial menor de microorganismos degradadores competentes.

2.5 En períodos de tiempo largos, la concentración inicial de degradadores competentes no importa mucho, ya que su número aumentará cuando esté presente un sustrato adecuado a concentraciones suficientes. No obstante, si lo que interesa es la degradabilidad en un período de tiempo corto, habrá que considerar la concentración inicial de microorganismos degradadores competentes (Scow, 1982).

2.6 La presencia de flóculos, agregados y microorganismos adheridos puede también mejorar la adaptación, por ejemplo mediante el desarrollo de nichos microbianos que contengan poblaciones compuestas de microorganismos. Esto reviste importancia cuando se considera la capacidad de adaptación de estos microorganismos en medios diversos, como estaciones de depuración de aguas residuales, sedimentos o suelos. Sin embargo, el número total de microorganismos en los ensayos de biodegradabilidad fácil y en el medio ambiente acuático es del mismo orden de magnitud:  $10^4$  a  $10^8$  células/ml en los ensayos de biodegradabilidad fácil y  $10^3$  a  $10^6$  células/ml o más en aguas superficiales (Scow, 1982). Así, es probable que ese factor revista poca importancia.

2.7 Cuando se examina la extrapolación a condiciones ambientales, puede ser útil distinguir entre ecosistemas oligotróficos y eutróficos. Los microorganismos que se desarrollan en condiciones oligotróficas son capaces de mineralizar sustratos orgánicos a concentraciones bajas (fracciones de mg de carbono/l) y normalmente presentan mayor afinidad por el sustrato pero tasas de crecimiento más lentas y tiempos de generación más largos que los organismos en condiciones eutróficas (OCDE, 1995). Además, las poblaciones de ecosistemas oligotróficos son incapaces de degradar sustancias químicas en concentraciones superiores a 1 mg/l y pueden incluso inhibirse a concentraciones altas. Por el contrario, las poblaciones de ecosistemas eutróficos necesitan concentraciones más elevadas de sustratos antes de que comience la mineralización y se desarrollan a concentraciones más elevadas que las poblaciones de ecosistemas oligotróficos. Además, el umbral inferior de degradación en el medio ambiente acuático dependerá de que la población microbiana esté bajo condiciones oligotróficas o eutróficas. No está claro, sin embargo, si ambas poblaciones constituyen especies diferentes o si hay sólo dos modos de vida, el oligotrófico y el eutrófico (OCDE, 1995). Casi todos los contaminantes llegan al medio ambiente acuático directamente mediante la eliminación de aguas residuales y, por consiguiente, esos ecosistemas receptores son mayormente eutróficos.

2.8 Del análisis anterior se puede concluir que la probabilidad de que estén presentes microorganismos degradadores competentes es mayor en ecosistemas muy expuestos, es decir, que reciben continuamente sustancias (lo que sucede con mayor frecuencia con productos químicos fabricados en gran cantidad que en aquellos producidos en pequeña cantidad). Estos ecosistemas suelen ser eutróficos y la degradación, por tanto, necesitará concentraciones relativamente altas de sustancias para que pueda empezar. Por lo demás, las aguas puras pueden carecer de especies competentes, en particular de las capaces de degradar sustancias químicas que sólo se depositan en el medio ambiente ocasionalmente, tales como las producidas en pequeña cantidad.

### **3. Factores relativos al sustrato**

#### **3.1 *Concentración de la sustancia de ensayo***

3.1.1 En casi todos los ensayos de laboratorio, la sustancia de ensayo se aplica a concentraciones muy altas (2 a 100 mg/l) en comparación con las concentraciones esperadas en el medio ambiente acuático (del orden de  $\mu\text{g/l}$ ). Por lo general, el crecimiento de los microorganismos no estará asegurado cuando el sustrato esté presente en concentraciones inferiores a 10  $\mu\text{g/l}$ ; y en concentraciones más bajas, incluso no se satisfarán las necesidades en energía para mantener la población (OCDE, 1995). Ese umbral inferior se explica quizá por una falta de estímulo suficiente para desencadenar una respuesta enzimática (Scow, 1982). Esto significa en general que las concentraciones de muchas sustancias presentes en el medio acuático son tales que esas sustancias difícilmente constituyen un sustrato primario para los microorganismos degradadores.

3.1.2 Además, la cinética de degradación dependerá de la concentración de la sustancia ( $S_0$ ) en comparación con la constante de saturación ( $K_s$ ) descrita en la ecuación de Monod. La constante de saturación es la concentración de sustrato en la que se observa una tasa de crecimiento específico que representa 50 % de la tasa de crecimiento máximo. Con concentraciones del sustrato muy inferiores a la constante de saturación, que es la situación normal en casi todos los ecosistemas acuáticos, la degradación podrá describirse mediante una cinética de primer orden o bien una cinética logística (OCDE, 1995). Cuando prevalezca (por ejemplo, en aguas oligotróficas) una densidad baja de microorganismos (inferior a  $10^3$ - $10^5$  células/ml), la población crecerá a tasas que disminuyen continuamente, lo que es típico de cinéticas logísticas. Con una densidad mayor de microorganismos (por ejemplo, en aguas eutróficas), la concentración del sustrato no será lo bastante elevada como para asegurar el crecimiento de células y se aplicará una cinética del primer orden, es decir, que la velocidad de degradación será proporcional a la concentración de la sustancia. En la práctica, puede ser imposible distinguir entre ambos tipos de cinética de degradación, en razón de la incertidumbre de los datos (OCDE, 1995).

3.1.3 En conclusión, es probable que las sustancias en concentraciones bajas (es decir, por debajo de 10  $\mu\text{g/l}$ ) no se degraden como sustratos primarios en el medio ambiente acuático. En concentraciones más altas, las sustancias fácilmente degradables probablemente se degradarán como sustratos primarios en el medio ambiente, con una tasa de degradación más o menos proporcional a la concentración de la sustancia. A continuación se examina la degradación de sustancias como sustratos secundarios.

#### **3.2 *Presencia de otros sustratos***

3.2.1 En los ensayos normalizados, se aplica la sustancia de ensayo como sustrato único de los microorganismos, mientras que en el medio ambiente están presentes muchos otros sustratos. En las aguas naturales se encuentran a menudo concentraciones de carbono orgánico disuelto comprendidas entre 1 y 10 mg C/l, es decir, hasta mil veces superior a la concentración de un contaminante. Con todo, buena parte de ese carbono orgánico será relativamente persistente, aumentando la fracción de materia orgánica persistente con la distancia a la orilla.

3.2.2 En las aguas naturales las bacterias se alimentan principalmente de elementos de exudación procedentes de las algas. Estos elementos se mineralizan muy rápidamente (en unos minutos), lo que demuestra que existe un fuerte potencial de degradación en las comunidades naturales de microorganismos. Además, en las aguas naturales al competir los microorganismos por diversos sustratos, hay una presión selectiva entre ellos, lo que favorece el desarrollo de especies oportunistas capaces de alimentarse de sustratos rápidamente mineralizables, mientras que se impide el desarrollo de especies más especializadas. Experiencias basadas en el aislamiento de bacterias capaces de degradar diversos xenobióticos han demostrado que el desarrollo de estos organismos suele ser relativamente lento y que sobreviven gracias a fuentes de carbono complejas, en competencia con bacterias de desarrollo más rápido. Cuando hay microorganismos competentes en el medio, su número aumentará si se libera el sustrato xenobiótico específico de manera continua y alcanza una concentración en el medio suficiente para favorecer el crecimiento. No obstante, casi todos los contaminantes orgánicos del medio ambiente acuático están presentes en concentraciones bajas y sólo se degradarán como sustratos secundarios, sin apoyar el crecimiento.

3.2.3 Por otra parte, la presencia de sustratos rápidamente mineralizables en concentraciones altas puede facilitar una transformación inicial de la molécula xenobiótica por co-metabolismo. La sustancia co-metabolizada podrá quedar entonces disponible para registrar una mayor degradación y mineralización. Así, la presencia de otros sustratos puede aumentar las posibilidades de que una sustancia se degrade.

3.2.4 Se puede entonces concluir que la presencia de una diversidad de sustratos en aguas naturales y, entre ellos, de sustratos rápidamente mineralizables puede, por un lado, entrañar una presión selectiva que impida que se desarrollen microorganismos competentes degradadores de microcontaminantes. Por otro lado, puede facilitar una mayor degradación mediante un co-metabolismo inicial, seguido de una mineralización más intensa. La importancia relativa de esos procesos en condiciones naturales variará con las condiciones ambientales y la sustancia, por lo que no se puede generalizar.

#### **4. Factores relacionados con el medio ambiente**

4.1 Las variables ambientales rigen más bien la actividad microbiana general que los procesos de degradación específicos. Sin embargo, el significado de esa influencia varía entre los diferentes ecosistemas y las especies microbianas (Scow, 1982).

##### **4.2 *Potencial redox***

Uno de los factores ambientales más importantes que influyen en la degradabilidad es probablemente la presencia de oxígeno. El contenido de éste y el potencial redox asociado determinan la presencia de diferentes tipos de microorganismos en el medio ambiente acuático con organismos aeróbicos presentes en la fase acuosa, en la capa superior de sedimentos y en ciertas zonas de las estaciones de depuración de aguas residuales, y con organismos anaeróbicos presentes en sedimentos y zonas de las estaciones de depuración. En casi todas las partes de la fase acuosa rigen condiciones aeróbicas, y la predicción de la biodegradabilidad debería basarse en los resultados de ensayos aeróbicos. No obstante, en algunos medios acuáticos, el contenido de oxígeno puede ser muy bajo en algunas épocas del año, debido a la eutrofización y a la descomposición de la materia orgánica. En esas épocas, los organismos aeróbicos no serán capaces de degradar un producto químico, pero pueden verse sustituidos por procesos anaeróbicos si el producto químico del que se trata es degradable en condiciones anaeróbicas.

##### **4.3 *Temperatura***

Otra variable importante es la temperatura. Casi todos los ensayos de laboratorio se hacen a una temperatura entre 20 y 25°C (ensayos normalizados de biodegradabilidad fácil en condiciones aeróbicas), pero los ensayos anaeróbicos pueden efectuarse a 35 °C, temperatura que imita mejor las condiciones de un digestor de lodos. La actividad microbiana se produce en el medio ambiente a temperaturas comprendidas entre menos de 0 °C y 100 °C. No obstante, las temperaturas óptimas se encuentran probablemente en el rango comprendido entre 10 y 30 °C y, aproximadamente, la tasa de degradación se duplica cada 10 °C de aumento de temperatura en ese rango (de Henau, 1993). Fuera de ese intervalo óptimo, la actividad de los degradadores se reduce drásticamente, aunque algunas especies especializadas (bacterias termófilas y psicrófilas) pueden crecer. Al extrapolar las condiciones de laboratorio, habría que tener en cuenta que algunos medios ambientes acuáticos están cubiertos de hielo durante largos períodos del año y que durante la época invernal sólo cabe esperar una degradación mínima o incluso nula.

##### **4.4 *pH***

Se pueden encontrar microorganismos activos en todo el rango de pH observado en el medio ambiente. Sin embargo, en las poblaciones bacterianas, unas condiciones ligeramente alcalinas favorecen la actividad, correspondiendo el rango óptimo de pH entre 6 y 8. Con un pH inferior a 5, la actividad metabólica de las bacterias disminuye mucho. Para los hongos en general, unas condiciones ligeramente ácidas propician la actividad, con un rango óptimo de pH entre 5 y 6 (Scow, 1982). Así, la actividad óptima de degradación de los microorganismos se situará probablemente en el rango de pH comprendido entre 5 y 8, que es el que suele prevalecer en el medio ambiente acuático.



#### **4.5                    *Presencia de nutrientes***

La presencia de nutrientes inorgánicos (nitrógeno y fósforo) es a menudo un requisito necesario para el crecimiento microbiano. Con todo, estos nutrientes son pocas veces los factores que limitan la actividad de los microorganismos en el medio ambiente acuático, al verse limitado muchas veces el crecimiento de los microorganismos por el sustrato. No obstante, la presencia de nutrientes influye en el desarrollo de productores primarios y, una vez más, en la disponibilidad de elementos de exudación fácilmente mineralizables.



## Anexo 9

### APÉNDICE III

#### Principios básicos de los métodos experimentales y de estimación para determinar el FBC y el $K_{ow}$ de sustancias orgánicas

#### 1. Factor de bioconcentración (FBC)

##### 1.1 Definición

El factor de bioconcentración se define como la relación entre la concentración de la sustancia química en la biota y su concentración en el medio circundante, en este caso el agua, en estado de equilibrio. Puede medirse directamente por vía experimental en condiciones de equilibrio o calcularse como la relación entre las constantes cinéticas de absorción y eliminación de primer orden, método éste que no necesita condiciones de equilibrio.

##### 1.2 Métodos apropiados para la determinación experimental del FBC

1.2.1 Se han documentado y adoptado diferentes directrices para ensayos para determinar experimentalmente la bioconcentración en peces; la que se aplica con carácter más general es la Directriz 305 de la OCDE (OCDE, 1996) y la guía normalizada ASTM (ASTM E 1022-94). La Directriz 305 (1996) se revisó y sustituyó a la versión anterior 305A-E (1981). Aunque se prefieran regímenes de ensayo dinámicos (OCDE 305, 1996), también se permiten regímenes semiestáticos (ASTM E 1022-94), siempre que se cumplan los criterios de validez sobre mortalidad y mantenimiento de las condiciones de ensayo. En las sustancias lipófilas ( $\log K_{ow} > 3$ ), se prefieren los métodos dinámicos.

1.2.2 Los principios de las Directrices OCDE 305 y ASTM son similares, pero sus condiciones experimentales difieren, especialmente en:

- a) el método de suministro del agua de ensayo (estático, semiestático o dinámico);
- b) el requisito de realizar un estudio de depuración;
- c) el método matemático para calcular el FBC;
- d) la frecuencia del muestreo: número de mediciones en agua y de muestras de peces;
- e) la necesidad de medir el contenido en lípidos del pez;
- f) la duración mínima de la fase de absorción.

1.2.3 Por lo general, el ensayo consiste en dos fases: una fase de exposición (absorción) y otra de post-exposición (depuración). Durante la primera, grupos separados de peces de una especie se exponen al menos a dos concentraciones de la sustancia de ensayo. Es obligatoria una fase de exposición de 28 días, a menos que se haya llegado a un estado de equilibrio en ese período. El tiempo necesario para alcanzar las condiciones de equilibrio puede así establecerse basándose en la correlación entre  $K_{ow}$  y  $k_2$  (por ejemplo,  $\log k_2 = 1,47 - 0,41 \log K_{ow}$  (Spacie y Hamelink, 1982) o  $\log k_2 = 1,69 - 0,53 \log K_{ow}$  (Gobas *et al.*, 1989)). El tiempo previsto (d) para alcanzar, por ejemplo 95% del régimen estacionario, puede calcularse así mediante  $-\ln(1-0.95)/k_2$ , siempre que la bioconcentración siga una cinética de primer orden. Durante la fase de depuración, los peces se transfieren a un medio exento de sustancia de ensayo. La concentración de ésta en el pez deberá analizarse durante las dos fases del ensayo. El FBC se expresa como una función del peso húmedo total del pez mojado. Al igual que para muchas sustancias orgánicas, existe una relación apreciable entre el potencial de bioconcentración y su lipofilia, asimismo hay una relación clara entre el contenido en lípidos del pez y la bioconcentración observada de tales sustancias. Por tanto, para reducir esta fuente de variabilidad en los resultados de los ensayos con las sustancias muy lipófilas, la bioconcentración deberá expresarse en relación con el contenido en lípidos además de con el peso corporal total (Directriz 305 de la OCDE (1996), ECETOC (1995)). Ambas indicaciones se basan en el supuesto de que la bioconcentración puede representarse aproximadamente por un proceso de primer orden (modelo con un solo compartimento)

y, por ende, en que  $FBC = k_1/k_2$  ( $k_1$  es la tasa de absorción de primer orden y  $k_2$  la tasa de depuración también de primer orden, descritas mediante una aproximación log-lineal). Si la depuración obedece a una cinética bifásica, es decir, si cabe identificar dos velocidades de depuración distintas, la aproximación  $k_1/k_2$  puede subestimar significativamente el FBC. Cuando se indique una cinética de segundo orden, el FBC podrá estimarse con la relación:  $C_{pez}/C_{agua}$ , siempre que se haya alcanzado el “estado estacionario” del sistema pez-agua.

1.2.4 Además de informaciones detalladas sobre la preparación y el almacenamiento de las muestras, habrá que disponer, para cuantificar la sustancia en la disolución de ensayo y en el material biológico, de un método analítico apropiado de precisión, exactitud y sensibilidad conocidas. Si faltan esos elementos, será imposible determinar un FBC verdadero. La utilización de sustancias de ensayo marcadas radiactivamente puede facilitar el análisis de las muestras de agua y los peces. Sin embargo, a menos que se combine con un método analítico específico, la medición de la radiactividad total puede reflejar la presencia de la sustancia parental, de los posibles metabolitos y del carbono quizá metabolizado, que se hayan incorporado a las moléculas orgánicas de los tejidos del pez. Para determinar el verdadero valor del FBC, será esencial distinguir claramente la sustancia parental de los posibles metabolitos. Si en el ensayo se utilizan materiales marcados radiactivamente, será posible analizar el marcaje isotópico total (es decir, el parental y los metabolitos) o purificar las muestras de tal suerte que se pueda analizar por separado el compuesto parental.

1.2.5 Si el  $\log K_{ow}$  es superior a 6, los valores medidos del FBC tienen tendencia a disminuir cuando incrementa el  $\log K_{ow}$ . Las explicaciones teóricas de esta no-linealidad hacen referencia principalmente a una biotransformación, a una reducción de la cinética de permeabilidad de las membranas o a una disminución de la solubilidad de los lípidos bióticos en las moléculas grandes. También pueden intervenir anomalías experimentales, tales como el que no se alcance el equilibrio, una disminución de la biodisponibilidad debida a la absorción por materias orgánicas presentes en la fase acuosa, y errores analíticos. Además, deberán tomarse precauciones al evaluar los datos experimentales del FBC para sustancias con un  $\log K_{ow}$  superior a 6, ya que esos datos adolecerán de una incertidumbre mucho mayor que los valores del FBC determinados para sustancias con un  $\log K_{ow}$  inferior a 6.

## 2. **$\log K_{ow}$**

### 2.1 ***Definición y consideraciones generales***

2.1.1 El logaritmo del coeficiente de reparto *n*-octanol/agua ( $\log K_{ow}$ ) es una medida de la lipofilia de una sustancia. Como tal,  $\log K_{ow}$  es un parámetro clave para evaluar el destino/comportamiento ambiental. Muchos procesos de reparto son dirigidos por el  $\log K_{ow}$ , por ejemplo la absorción en suelos y sedimentos y la bioconcentración en organismos.

2.1.2 La base de la relación entre la bioconcentración y el  $\log K_{ow}$  es la analogía del proceso de reparto entre la fase lipídica del pez y el agua, con el de reparto entre el *n*-octanol y el agua. La utilización de  $K_{ow}$  se justifica por la capacidad del octanol para representar de manera satisfactoria a los lípidos de los tejidos del pez. Existe una relación muy significativa entre  $\log K_{ow}$  y la solubilidad de las sustancias en aceite de hígado de bacalao y en la trioleína (Niimi, 1991). La trioleína es uno de los triglicéridos más abundantes que se encuentran en los lípidos de peces de agua dulce (Henderson y Tocher, 1987).

2.1.3 La determinación del coeficiente de reparto *n*-octanol-agua ( $K_{ow}$ ) es indispensable para establecer los datos básicos que han de presentarse en la notificación de sustancias nuevas y de sustancias existentes prioritarias en la UE. Como la determinación experimental del  $K_{ow}$  no siempre es posible, por ejemplo en sustancias muy hidrosolubles y muy lipófilas, se puede utilizar un valor de  $K_{ow}$  obtenido con las QSAR. No obstante, deberá procederse con suma cautela al usar las QSAR en sustancias donde la determinación experimental no es posible (tensioactivos, por ejemplo).

## 2.2 *Métodos apropiados para determinar experimentalmente valores de $K_{ow}$*

2.2.1 Para determinar experimentalmente valores de  $K_{ow}$  se describen dos métodos diferentes, por agitación en matraz y por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en las guías normalizadas, en particular la Directriz 107 de la OCDE (1995), la 117 (1983), y los documentos CEE A.8. (1992), EPA-OTS (1982), EPA-FIFRA (1982) y ASTM (1993). Los datos obtenidos con el método de agitación en matraz o con HPLC, de conformidad con las directrices normalizadas, no son los únicos recomendados. En las sustancias muy lipófilas, que se disuelven lentamente en agua, los datos obtenidos con un método de agitación suave suelen ser más fiables (De Bruijn *et al.*, 1989; Tolls y Sijm, 1993; proyecto de directriz de la OCDE, 1998). El método de agitación suave es actualmente objeto de un ensayo de intercalibración (ring-test), con miras a la redacción definitiva de una directriz de la OCDE.

### 2.2.2 *Método de agitación en matraz*

El principio básico de este método consiste en medir la disolución de la sustancia en dos fases diferentes, agua y *n*-octanol. Para determinar el coeficiente de reparto, deberá lograrse el equilibrio entre todos los componentes que interactúan en el sistema, tras lo cual se determinará la concentración de las sustancias disueltas en las dos fases. El método de agitación en matraz puede aplicarse cuando  $\log K_{ow}$  esté comprendido entre -2 y 4 (Directriz 107 de la OCDE, 1995). Ese método se aplica sólo a sustancias prácticamente puras, solubles en agua y *n*-octanol, y debería practicarse a una temperatura constante ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), en el intervalo de 20 a 25  $^\circ\text{C}$ .

### 2.2.3 *Método HPLC*

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se lleva a cabo en columnas analíticas guarnecidas de una fase sólida disponible comercialmente, que contiene hidrocarburos de cadena larga (por ejemplo,  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{18}$ ) químicamente unidas superficialmente a la sílice. Las sustancias inyectadas en una de esas columnas migran a velocidades diferentes en razón de los distintos grados de partición entre la fase móvil acuosa (móvil) y la fase hidrocarbonada (estacionaria). El método HPLC no debe aplicarse a ácidos y bases fuertes, complejos metálicos, materiales tensioactivos o sustancias que reaccionan con el eluyente. Cabe aplicarlo, en cambio, cuando el valor del  $\log K_{ow}$  esté comprendido entre 0 y 6 (Directriz 117 de la OCDE, 1989). Este método es menos sensible a la presencia de impurezas en el compuesto de ensayo que el método de agitación en matraz.

### 2.2.4 *Método de agitación suave*

El método de agitación suave permite una determinación exacta y precisa del  $K_{ow}$  en compuestos cuyo  $\log K_{ow}$  sea de hasta 8,2 (De Bruijn *et al.*, 1989). En el caso de compuestos muy lipófilos, el método de agitación en matraz tiene tendencia a producir anomalías (formación de microgotas) mientras que el método HPLC necesita una extrapolación por encima del rango de calibración para obtener una estimación del  $K_{ow}$ .

Con el fin de determinar un coeficiente de reparto, el agua, el *n*-octanol y el compuesto de ensayo se equilibran entre sí, tras lo cual se determina la concentración del compuesto en las dos fases. Las dificultades experimentales asociadas a la formación de microgotas durante el experimento de agitación en matraz pueden, hasta cierto punto, superarse con la agitación suave, ya que el agua, el octanol y el compuesto de ensayo se equilibran en un reactor sometido a una agitación lenta. Esa agitación crea un flujo más o menos laminar entre el octanol y el agua, mejorándose el intercambio entre las fases, sin que se formen microgotas.

### 2.2.5 *Método de generador en columna*

Otro método muy versátil para medir el  $\log K_{ow}$  es el método de generador en columna. En él, tal como indica su nombre, se usa un generador en columna para repartir la sustancia de ensayo entre las fases octanol y agua. La columna se guarnece con un soporte sólido y se satura con una concentración fija de la sustancia de ensayo en *n*-octanol. La sustancia se eluye a partir de la columna del generador saturada en octanol con agua. La disolución acuosa que sale de la columna representa la concentración de equilibrio de la sustancia de ensayo que se ha repartido entre la fase octanol y la fase acuosa. La ventaja principal de este

método sobre el de agitación en matraz es que evita completamente que se formen microemulsiones. Por lo tanto, es un método especialmente útil para medir el  $K_{ow}$  de sustancias con un  $\log K_{ow}$  superior a 4,5. (Doucette y Andren, 1987 y 1988; Shiu *et al.*, 1988), y conviene también en sustancias en las que el  $\log K_{ow}$  es inferior a 4,5. Su inconveniente es que requiere un equipo complejo. En *Toxic Substances Control Act Test Guidelines* (US EPA 1985) figura una detallada descripción del método de generador en columna.

### 2.3 *Utilización de las QSAR para determinar el $\log K_{ow}$* (véase también la sección A9.6, sobre este particular)

2.3.1 Son muchas las QSAR que se han elaborado y siguen elaborándose para estimar el  $K_{ow}$ . Los métodos comúnmente usados se basan en constantes de fragmentación. Ese procedimiento se basa en una simple adición de la lipofilia de los diferentes fragmentos de una determinada molécula. En ausencia de datos obtenidos experimentalmente, hay tres programas para PC comercialmente disponibles que se recomiendan en el documento guía técnico (TGD) de la Comisión Europea sobre evaluación de riesgos, (Comisión Europea, 1996) parte III.

2.3.2 El programa CLOGP (Daylight Chemical Information Systems, 1995) se desarrolló inicialmente para diseñar medicamentos. El modelo se basa en el procedimiento de cálculo de Hansch y Leo (Hansch y Leo, 1979). El programa calcula el  $\log K_{ow}$  para compuestos orgánicos que contienen C, H, N, O, halógenos, P y/o S. Ese valor, en cambio, no puede calcularse para sales y compuestos con cargas formales (excepto compuestos nitro y óxidos nitrogenados). Los resultados de los cálculos del  $\log K_{ow}$  para sustancias ionizables, como fenoles, aminas y ácidos carboxílicos, representan la forma neutra o desionizada y dependerán del pH. Por lo general, el programa proporciona estimaciones claras para el rango de  $\log K_{ow}$  comprendido entre 0 y 5 (Comisión Europea, 1996, parte III). Sin embargo, un estudio de validación hecho por Niemelä (1993), que comparó valores de  $\log K_{ow}$  determinados experimentalmente con valores estimados, mostraba que el programa predice con precisión el  $\log K_{ow}$  para un gran número de sustancias orgánicas con un valor de  $\log K_{ow}$  comprendido entre menos de 0 y más de 9 ( $n = 501$ ,  $r^2 = 0,967$ ). En un estudio similar de validación sobre más de 7000 sustancias, los resultados obtenidos con el programa CLOGP (versión PC 3.32, versión EPA 1.2) eran  $r^2 = 0,89$ , desviación estándar = 0,58,  $n = 7221$ . Esas validaciones muestran que el programa CLOGP puede emplearse para estimar valores fiables de  $\log K_{ow}$  cuando no se tienen datos experimentales. En compuestos quelantes y tensioactivos, se considera que el programa CLOGP es de fiabilidad limitada (OCDE, 1993). No obstante, por lo que atañe a los tensioactivos aniónicos (LAS), se ha propuesto un método con correcciones para estimar valores CLOGP ajustados (Roberts, 1989).

2.3.3 El programa LOGKOW o KOWWIN (Syracuse Research Corporation) utiliza fragmentos estructurales y factores de corrección. Calcula el  $\log K_{ow}$  para compuestos orgánicos que contengan los átomos siguientes: C, H, N, O, halógenos, Si, P, Se, Li, Na, K y/o Hg. También permite calcular el  $\log K_{ow}$  para compuestos con cargas formales (tales como los óxidos nitrogenados y los compuestos nitro). El cálculo del  $\log K_{ow}$  para sustancias ionizables, como fenoles, aminas y ácidos carboxílicos, representa la forma neutra o desionizada y sus valores dependerán así del pH. El programa LOGKOW (Pedersen *et al.*, 1995) puede proporcionar predicciones para ciertos tensioactivos (por ejemplo, alcoholes etoxilados (Tolls, 1998), colorantes y sustancias disociadas). Generalmente, el programa ofrece estimaciones claras en el rango de  $\log K_{ow}$  entre 0 y 9 (TemaNord 1995:581). Al igual que el programa CLOGP, LOGKOW ha sido validado (tabla 1) y se recomienda para la clasificación, por su fiabilidad, disponibilidad comercial y facilidad de uso.

2.3.4 AUTOLOGP (Devillers *et al.*, 1995) ha sido establecido a partir de un conjunto heterogéneo de datos recogidos de la bibliografía, que comprende 800 sustancias orgánicas. Calcula valores de  $\log K_{ow}$  para sustancias orgánicas que contienen átomos de C, H, N, O, halógenos, P y S. No puede efectuar el cálculo para las sales. Tampoco pueden ser calculados los  $\log K_{ow}$  de algunos compuestos con cargas formales, a excepción de los compuestos nitro. El programa es capaz de calcular los valores de  $\log K_{ow}$  para sustancias ionizables como fenoles, aminas y ácidos carboxílicos, aunque deberían tenerse en cuenta las dependencias del pH. Se está mejorando el programa para aumentar sus posibilidades de aplicación. En base a la información disponible actualmente, AUTOLOGP proporciona valores fiables especialmente para sustancias altamente lipófilas ( $\log K_{ow} > 5$ ) (Comisión Europea, 1996).

2.3.5 El modelo SPARC está todavía desarrollándose en el Laboratorio de investigaciones ambientales de la EPA en Atenas, Georgia, y no está todavía disponible para el público. Se trata de un modelo mecanicista basado en principios termodinámicos químicos y no de un modelo determinista basado en conocimientos obtenidos de observaciones. Por tanto, SPARC difiere de los modelos que utilizan las QSAR (por ejemplo, KOWWIN y LOGP) en que no necesita valores medidos de  $\log K_{ow}$  para disponer de un conjunto de sustancias que sirvan de patrón. La EPA aplica algunas veces este modelo, cuando se solicita, a una lista de números CAS. SPARC sólo ofrece resultados mejores que KOWWIN y CLOGP en compuestos con valores de  $\log K_{ow}$  superiores a 5. Es el único modelo que puede emplearse con carácter general, en compuestos inorgánicos y organometálicos.

En la tabla 1 siguiente, se presenta un resumen de los métodos de estimación de  $\log K_{ow}$  basados en fragmentación de moléculas. Hay también otros métodos para hacer esa estimación, pero únicamente deberían usarse caso por caso y sólo con una justificación científica apropiada.

**Tabla 1: Resumen de los métodos QSAR para estimar  $\log K_{ow}$  basándose en metodologías de fragmentación de moléculas (Howard y Meylan (1997))**

Método	Metodología	Datos estadísticos
CLOGP Hansch y Leo (1979), CLOGP Daylight (1995)	Fragmentos + factores de corrección	Total n = 8942, $r^2 = 0,917$ , desviación estándar = 0,482 Validación: n = 501, $r^2 = 0,967$ Validación: n = 7221, $r^2 = 0,89$ , de = 0,58
LOGKOW (KOWWIN) Meylan y Howard (1995), SRC	140 fragmentos 260 factores de corrección	Calibración : n = 2430, $r^2 = 0,981$ , de = 0,219, me = 0,161 Validación: n = 8855, $r^2 = 0,95$ , de = 0,427, me = 0,327
AUTOLOGP Devillers <i>et al.</i> (1995)	66 contribuciones atómicas y de grupo según Rekker y Manhold (1992)	Calibración: n=800, $r^2=0,96$ , de = 0,387
SPARC En vías de desarrollo por EPA, Atenas, Georgia.	Basada en un algoritmo de la estructura química fundamental	No se necesitan datos de $\log K_{ow}$ para un conjunto de sustancias químicas que sirven de patrón.
Rekker y De Kort (1979)	Fragmentos + factores de corrección	Calibración: n = 1054, $r^2 = 0,99$ Validación: n=20, $r^2 = 0,917$ , de = 0,53, me = 0,40
Niemi <i>et al.</i> (1992)	MCI	Calibración: n=2039, $r^2=0,77$ Validación: n=2039, $r^2=0,49$
Klopman <i>et al</i> (1994)	98 fragmentos + factores de corrección	Calibración: n = 1663, $r^2 = 0,928$ , de = 0,3817
Suzuki y Kudo (1990)	424 fragmentos	Total: n = 1686, me = 0,35 Validación: n = 221, me = 0,49
Ghose <i>et al.</i> (1988) ATOMLOGP	110 fragmentos	Calibración: n = 830, $r^2 = 0,93$ , de = 0,47 Validación: n = 125, $r^2 = 0,87$ , de = 0,52
Bodor y Huang (1992)	Orbital molecular	Calibración: n=302, $r^2 = 0,96$ , de = 0,31, me = 0,24 Validación: n = 128, de = 0,38
Broto <i>et al.</i> (1984) ProLogP	110 fragmentos	Calibración: n = 1868, me = ca. 0,4





## Anexo 9

### APÉNDICE IV

#### Influencia de factores externos e internos en el potencial de bioconcentración de sustancias orgánicas

##### 1. Factores que influyen en la absorción

La tasa de absorción de los compuestos lipófilos es principalmente función del tamaño del organismo (Sijm y Linde, 1995). Elementos externos como el tamaño molecular, los factores que influyen en la biodisponibilidad y diversos factores medioambientales revisten igualmente gran importancia respecto de esa tasa.

##### 1.1 *Tamaño del organismo*

Como los peces de mayor tamaño tienen una relación superficie branquial/peso relativamente más baja, cabe esperar una constante ( $k_1$ ) de la tasa de absorción inferior a la de los peces pequeños (Sijm y Linde, 1995; Opperhuizen y Sijm, 1990). La absorción de las sustancias en el pez se rige además por el flujo de agua que atraviesa las branquias, la difusión a través de las capas de difusión acuosas, a nivel del epitelio branquial, la permeabilidad de este último, la intensidad del flujo sanguíneo a través de las branquias y la capacidad de enlace de los constituyentes sanguíneos (ECETOC, 1995).

##### 1.2 *Tamaño molecular*

Las sustancias ionizadas no penetran fácilmente en las membranas; en consecuencia, el pH del medio acuoso puede influir en la absorción de la sustancia. Cabe esperar una pérdida de la permeabilidad de las membranas para sustancias con una sección transversal considerable (Opperhuizen *et al.*, 1985; Anliker *et al.*, 1988) o una longitud de cadena grande ( $> 4,3$  nm) (Opperhuizen, 1986). La pérdida de permeabilidad de las membranas debida al tamaño de las moléculas entrañará así una pérdida total de absorción. El efecto del peso molecular sobre la bioconcentración se debe a la influencia sobre el coeficiente de difusión de la sustancia, que reduce las constantes de la tasa de absorción (Gobas *et al.*, 1986).

##### 1.3 *Disponibilidad*

Antes de que una sustancia pueda bioconcentrarse en un organismo ha de estar presente en el agua y disponible para atravesar las branquias de los peces. Los factores que afecten a esa disponibilidad en condiciones tanto naturales como de ensayo alterarán la bioconcentración real en comparación con el valor estimado del FBC. Como se alimenta a los peces durante los estudios de bioconcentración, cabe esperar concentraciones relativamente altas de materia orgánica disuelta y en partículas, reduciendo así la fracción de producto químico efectivamente disponible para la absorción directa por las branquias. McCarthy y Jiménez (1985) han demostrado que la adsorción de sustancias lipófilas a materias húmicas disueltas reduce la disponibilidad de la sustancia, siendo mayor la reducción cuanto más lipófila sea la sustancia (Schrapp y Opperhuizen, 1990). Asimismo, la adsorción a materias orgánicas disueltas y en partículas, o en superficies en general, puede interferir en la medición del FBC (y en otras propiedades fisicoquímicas) y hacer así difícil la determinación del FBC o de otros descriptores apropiados. La bioconcentración en el pez está directamente correlacionada con la fracción disponible de la sustancia en el agua, por lo que será necesario, en sustancias altamente lipófilas, mantener la concentración disponible de la sustancia de ensayo en límites relativamente estrechos durante el período de absorción.

Las sustancias que son fácilmente biodegradables sólo permanecerán en el agua de ensayo durante un breve periodo, por lo que su bioconcentración quizá sea insignificante. Del mismo modo, la volatilidad y la hidrólisis reducirán la concentración de la sustancia y el tiempo durante el que estará disponible para la bioconcentración.

## **1.4 Factores medioambientales**

Los parámetros ambientales que influyen en la fisiología del organismo pueden también afectar a la absorción de las sustancias. Por ejemplo, cuando el contenido en oxígeno del agua disminuye, un pez deberá hacer pasar más agua por sus branquias para satisfacer sus necesidades respiratorias (McKim y Goeden, 1982). No obstante, puede depender de la especie, tal como han indicado Opperhuizen y Schrap (1987). Se ha demostrado, asimismo, que la temperatura puede influir en la constante de la tasa de absorción en sustancias lipófilas (Sijm *et al.* 1993), aunque otros autores no han encontrado ningún efecto consistente debido a los cambios de temperatura (Black *et al.* 1991).

## **2 Factores que influyen en la tasa de eliminación**

La velocidad de eliminación es función, sobre todo, del tamaño del organismo, del contenido en lípidos, del proceso de biotransformación del organismo y de la lipofilia del compuesto de ensayo.

### **2.1 Tamaño del organismo**

Al igual que la tasa de absorción, la de eliminación depende del tamaño del organismo. Debido a la mayor relación superficie branquial/peso en los organismos de pequeño tamaño (por ejemplo, larvas de peces) respecto a los organismos de mayor tamaño, se ha demostrado que el estado estacionario y, por ende, “el equilibrio a dosis tóxica” se alcanzan más pronto en las etapas tempranas de vida que en la juvenil o adulta de los peces (Petersen y Kristensen, 1998). Como el tiempo necesario para llegar a las condiciones de equilibrio depende de  $k_2$ , el tamaño del pez utilizado en los estudios de bioconcentración influirá así mucho en el tiempo necesario para obtener esas condiciones.

### **2.2 Contenido en lípidos**

En razón de las relaciones de reparto, los organismos con un alto contenido en grasa tienden a acumular concentraciones más elevadas de sustancias lipófilas en condiciones de estado estacionario. Las cargas corporales son, por tanto, a menudo mayores en peces “gruesos” como la anguila que en peces “magros” como el bacalao. Además, las “reservas” de lípidos pueden desempeñar un papel de almacenamiento en sustancias altamente lipófilas. La falta de alimentación y otros cambios fisiológicos pueden modificar el balance lipídico y liberar esas sustancias, con consecuencias diferidas.

### **2.3 Metabolismo**

2.3.1 Por lo general, el metabolismo o la biotransformación conducen a convertir el compuesto parental en metabolitos más hidrosolubles. En consecuencia, cuanto más hidrófilos sean éstos últimos, más fácilmente serán excretados del cuerpo que el parental. Cuando se altera la estructura química de un compuesto, también se alteran muchas de sus propiedades. Por lo tanto, los metabolitos tendrán un comportamiento diferente dentro del organismo con respecto a la distribución de tejidos, la bioacumulación, la persistencia, la vía y la tasa de excreción. La biotransformación quizá altera también la toxicidad de los compuestos. Este cambio puede ser beneficioso o nocivo para el organismo. La biotransformación impedirá en su caso que la concentración en el organismo llegue a ser tan elevada que provoque una respuesta tóxica (desintoxicación). Sin embargo, puede formarse un metabolito que sea más tóxico que el compuesto parental (bioactivación), como se sabe que ocurre en el benzopireno, por ejemplo.

2.3.2 Los organismos terrestres tienen un sistema de biotransformación desarrollado que suele ser mejor que el de los organismos que viven en el medio acuático. El motivo de esa diferencia puede ser el hecho de que la biotransformación de los xenobióticos quizá revista poca importancia en los organismos que respiran por branquias, ya que pueden excretar con facilidad el compuesto en el agua (Van Den Berg *et al.*, 1995). En los organismos acuáticos, la capacidad de transformación de los xenobióticos aumenta en general como sigue: moluscos < crustáceos < peces (Wofford *et al.*, 1981).

### **3.                   Carácter lipófilo de las sustancias**

Varios autores han mostrado una correlación lineal negativa entre  $k_2$  (constante de depuración) y el  $\log K_{ow}$  (o el FBC) (Spacie y Hamelink, 1982; Gobas y al.; 1989; Peterson y Kristense, 1998), mientras que  $k_1$  (constante de la tasa de absorción) es más o menos independiente del carácter lipófilo de la sustancia (Connell, 1990). El FBC resultante generalmente aumentará con la lipofilia de la sustancia, es decir, el  $\log$  FBC y el  $\log K_{ow}$  estarán correlacionados para sustancias que no están sometidas a un metabolismo activo.



## Anexo 9

### APÉNDICE V

#### Directrices para los ensayos

#### 1. Casi todas las directrices que se mencionan figuran en recopilaciones de la organización que las publica. Las referencias principales son:

- a) Directrices de la CE: Comisión Europea (1996). Classification, Packaging and Labelling of Dangerous Substances in the European Union. Part 2 – Testing Methods. Comisión Europea, 1997. ISBN 92-828-0077-6. (Página de consulta: <http://ecb.ei.jrc.it/testing-methods/>); (Clasificación, embalaje/envasado y etiquetado de sustancias peligrosas en la Unión Europea. Parte 2 – Métodos de ensayo);
- b) Directrices de la ISO: Directrices de las organizaciones nacionales de normalización o de la propia ISO (página de consulta: <http://www.iso.ch/>);
- c) Directrices de la OCDE sobre ensayos con productos químicos. OCDE, París, 1993, con actualizaciones periódicas (Página de consulta: <http://www.oecd.org/ehs/test/testlist.htm>);
- d) Directrices de la OPPTS: página de consulta US EPA: <http://www.epa.gov/opptsfrs/home/guidelin.htm> y ([http://www.epa.gov/OPPTS\\_Harmonized/850\\_Ecological\\_Effects\\_Test\\_Guidelines/Drafts](http://www.epa.gov/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts));
- e) ASTM: página de consulta ASTM: <http://www.astm.org>. Cabe proseguir las consultas acudiendo al término “standards”.

#### 2. Directrices para ensayos de toxicidad acuática <sup>1</sup>

Directriz 201 de la OCDE (1984) Alga, Growth Inhibition Test  
Directriz 202 de la OCDE (1984) Daphnia sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test  
Directriz 203 de la OCDE (1992) Fish, Acute Toxicity Test  
Directriz 204 de la OCDE (1984) Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study  
Directriz 210 de la OCDE (1992) Fish, Early-Life Stage Toxicity Test  
Directriz 211 de la OCDE (1998) Daphnia magna Reproduction Test  
Directriz 212 de la OCDE (1998) Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages  
Directriz 215 de la OCDE (2000) Fish, Juvenile Growth Test  
Directriz 221 de la OCDE (en preparación) Lemna sp. Growth inhibition test  
CE C.1: Acute Toxicity for Fish (1992)  
CE C.2: Acute Toxicity for Daphnia (1992)  
CE. C.3: Alga Inhibition Test (1992)  
CE C.14: Fish Juvenile Growth Test (2001)  
CE C.15: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages (2001)  
CE C.20: Daphnia Magna Reproduction Test (2001).

OPPTS Testing Guidelines for Environmental Effects (850 Series Public Drafts) (Directrices de la OPPTS sobre efectos ambientales) :

850.1000 Special consideration for conducting aquatic laboratory studies  
850.1000 Special consideration for conducting aquatic laboratory studies  
850.1010 Aquatic invertebrate acute toxicity, test, freshwater daphnids  
850.1010 Aquatic invertebrate acute toxicity, test, freshwater daphnids  
850.1020 Gammarid acute toxicity test  
850.1020 Gammarid acute toxicity test  
850.1035 Mysid acute toxicity test

---

<sup>1</sup> La lista que figura a continuación se hizo en septiembre de 2000 y tendrá que actualizarse periódicamente conforme se adopten o elaboren directrices o proyectos nuevos.

850.1035 Mysid acute toxicity test  
850.1045 Penaeid acute toxicity test  
850.1045 Penaeid acute toxicity test  
850.1075 Fish acute toxicity test, freshwater and marine  
850.1075 Fish acute toxicity test, freshwater and marine  
850.1300 Daphnid chronic toxicity test  
850.1300 Daphnid chronic toxicity test  
850.1350 Mysid chronic toxicity test  
850.1350 Mysid chronic toxicity test  
850.1400 Fish early-life stage toxicity test  
850.1400 Fish early-life stage toxicity test  
850.1500 Fish life cycle toxicity  
850.1500 Fish life cycle toxicity  
850.1730 Fish BCF  
850.1730 Fish BCF  
850.4400 Aquatic plant toxicity test using Lemna spp. Tiers I and II  
850.4400 Aquatic plant toxicity test using Lemna spp. Tiers I and II  
850.4450 Aquatic plants field study, Tier III  
850.4450 Aquatic plants field study, Tier III  
850.5400 Algal toxicity, Tiers I and II  
850.5400 Algal toxicity, Tiers I and II

### **3. Directrices para ensayos de degradación biótica y abiótica<sup>2</sup>**

ASTM E 1196-92.

ASTM E 1279-89(95) Standard test method for biodegradation of a shake-flask die-away method.

ASTM E 1625-94 Standard test method for determining biodegradability of organic chemicals in semi-continuous activated sludge (SCAS).

CE C.4. A a F: Determinación de biodegradabilidad fácil. Directiva 67/548/CEE, Anexo V. (1992).

CE C.5. Degradación. Demanda bioquímica de oxígeno. Directiva 67/548/CEE, Anexo V. (1992).

CE C.7. Degradación: degradación abiótica: hidrólisis en función del pH. Directiva 67/548/CEE, Anexo V. (1992).

CE C.9. Biodegradación: Ensayo Zahn-Wellens. Directiva 67/548/CEE, Anexo V. (1988).

CE C.10. Biodegradación: Ensayos de simulación en lodos activados. Directiva 67/548/CEE, Anexo V. (1998).

CE C.11. Biodegradación: Ensayo de inhibición de respiración en lodos activados. Directiva 67/548/CEE, Anexo V.(1988).

CE C.12. Biodegradación: Ensayo SCAS modificado. Directiva 67/548/CEE Anexo V. (1998).

ISO 9408 (1991). Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the “ultimate” biodegradability of organic compounds – Method by determining de oxygen demand in a closed respirometer.

ISO 9439 (1990). Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the “ultimate” biodegradability of organic compounds – Method by analysis of released carbon dioxide.

ISO 9509 (1996). Water quality – Method for assessing the inhibition of nitrification of activated sludge micro-organisms by chemicals and wastewaters.

---

<sup>2</sup> La lista que figura a continuación se hizo en septiembre 2000 y tendrá que actualizarse periódicamente conforme se adopten o elaboren directrices o proyectos nuevos.

- ISO 9887 (1992). Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium – Semicontinuous activated sludge method (SCAS).
- ISO 9888 (1991). Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium – Static test (Zahn-Wellens method).
- ISO 10707 (1994). Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the “ultimate” biodegradability of organic compounds – Method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test).
- ISO 11348 (1997). Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test).
- ISO 11733 (1994). Water quality – Evaluation of the elimination and biodegradability of organic compounds in an aqueous medium – Activated sludge simulation test.
- ISO 11734 (1995). Water quality – Evaluation of the “ultimate” anaerobic biodegradability of organic compounds in digested sludge – Method by measurement of the biogas production.
- ISO/DIS 14592 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water. Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions (22.11.1999).
- Directriz de la OCDE 111 (1981). Hydrolysis as a function of pH.
- Directriz de la OCDE 209 (1984). Activated sludge, respiration inhibition test.
- Directriz de la OCDE 301 (1992). Ready biodegradability.
- Directriz de la OCDE 302A (1981). Inherent biodegradability: Modified SCAS test.
- Directriz de la OCDE 302B (1992). Zahn-Wellens/EMPA test.
- Directriz de la OCDE 302C (1981). Inherent biodegradability: Modified MITI test (II).
- Directriz de la OCDE 303A (1981). Simulation test – aerobic sewage treatment: Coupled units test.
- Directriz de la OCDE 304A (1981). Inherent biodegradability in soil.
- Directriz de la OCDE 306 (1992). Biodegradability in seawater.
- OCDE (1998). Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediment systems. Proyecto de propuesta de una nueva Directriz, diciembre de 1999.
- OCDE (1999). Aerobic and anaerobic transformation in soil. Texto final de un proyecto de propuesta de una nueva directriz, octubre de 1999.
- OCDE (2000). Simulation test – Aerobic Transformation in Surface Water. Proyecto de propuesta de una nueva directriz, mayo de 2000.
- OPPTS 835.2110 Hydrolysis as a function of pH.
- OPPTS 835.2130 Hydrolysis as a function of pH and temperature.
- OPPTS 835.2210 Direct photolysis rate in water by sunlight.
- OPPTS 835.3110 Ready biodegradability.
- OPPTS 835.3170 Shake flask die-away test.
- OPPTS 835.3180 Sediment/water microcosm biodegradability test.
- OPPTS 835.3200 Zahn-Wellens/EMPA test.

OPPTS 835.3210 Modified SCAS test.

OPPTS 835.3300 Soil biodegradation.

OPPTS 835.3400 Anaerobic biodegradability of organic chemicals.

OPPTS 835.5270 Indirect photolysis screening test: Sunlight photolysis in waters containing dissolved humic substances.

#### **4. Directrices para ensayos de bioacumulación<sup>3</sup>**

ASTM, 1993. ASTM Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. Sponsored by ASTM Committee E-47 on Biological Effects and Environmental Fate. American Society for Testing and Materials. 1916 Race Street, Philadelphia, PA 19103. ASTM PCN: 03-547093-16., ISBN 0-8032-1778-7.

ASTM E 1022-94. 1997. Standard Guide for Conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs. American Society for Testing and Materials.

CE, 1992. CE A.8. Coeficiente de partición. Anexo V (Directiva 67/548/EEC). Métodos para determinar propiedades fisicoquímicas, toxicidad y ecotoxicidad.

CE, 1998. CE C.13. Bioconcentración: ensayo con renovación continua en peces.

EPA-OTS, 1982. Guidelines and support documents for environmental effects testing. Chemical fate test guidelines and support documents. United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, D.C. 20960. EPA 560/6-82-002. (Agosto de 1982 y actualizaciones) ; véase también Code of Federal Regulations. Protection of the Environment, Part 790 to End. Revisado al 1º de Julio de 1993. Información en línea sobre las últimas actualizaciones de esas directrices: Sistema nacional de información técnica de los Estados Unidos.

EPA-FIFRA, 1982. The Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act. Pesticide Assessment Guidelines, subdivision N: chemistry: Environmental fate, and subdivision E, J & L: Hazard Evaluation. Office of Pesticide Programs. US Environmental Protection Agency, Washington D.C. (1982 y actualizaciones). Información en línea sobre las últimas actualizaciones de esas directrices: Sistema nacional de información técnica de los Estados Unidos.

Directriz 107 de la OCDE, 1995. Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.

Directriz 117 de la OCDE, 1989. Partition Coefficient (n-octanol/water). High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method.

Directriz 305 de la OCDE, 1996. Bioconcentration: Flow-through Fish Test.

Directrices 305 A-E de la OCDE, 1981. Bioaccumulation.

Proyecto de directriz de la OCDE, 1998. Partition Coefficient n-Octanol/Water  $P_{ow}$ . Slow-stirring method for highly hydrophobic chemicals.

---

<sup>3</sup> La lista que figura a continuación se hizo en septiembre 2000 y tendrá que actualizarse periódicamente conforme se adopten o elaboren directrices o proyectos nuevos.



## **ANEXO 9**

### **APÉNDICE VI**

#### **Referencias**

##### **1. Toxicidad acuática**

APHA 1992. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18ª edición. American Public Health Association, Washington, DC.

ASTM 1999. Annual Book of ASTM standards, Vol. 11.04. American Society for Testing and Materials, 1916 Race Street, Filadelfia, PA 19103.

DoE 1996. Guidance on the Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances. United Kingdom Department of the Environment (Departamento británico del Medio Ambiente), Londres.

ECETOC 1996. Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble, Volatile and Unstable Substances. ECETOC Monograph No. 26, ECETOC, Bruselas.

Lewis, M. A. 1995. Algae and vascular plant tests. En: Rand, G. M. (ed.) 1995. Fundamentals of Aquatic Toxicology, Second Edition. Taylor & Francis, Washington, DC. pp. 135-169.

Mensink, B. J. W. G., M. Montforts, L. Wijkhuizen-Maslankiewicz, H. Tibosch, y J.B.H.J. Linders 1995. Manual for Summarising and Evaluating the Environmental Aspects of Pesticidas. Informe No. 679101022 RIVM, Bilthoven, Países Bajos.

OCDE 1998. Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances. OCDE, París. <http://www.oecd.org/ehs>

OCDE 1999. Directrices sobre los ensayos con productos químicos. Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos, París.

OCDE 2000. Revised Draft Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, OCDE, París.

OCDE 2006. "Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application", Publicaciones de la OCDE sobre el medio, la salud y la seguridad, Serie sobre ensayos y evaluaciones, N° 54.

OCDE, Monografía n°11, Detailed Review Paper on Aquatic Toxicity Testing for Industrial Chemicals and Pesticides.

Pedersen, F., H. Tyle, J. R. Niemeldi, B. Guttman, L. Lander, y A. Wedebrand 1995. Environmental Hazard Clasification - data collection and interpretation guide. TemaNord 1995:581.

Rand, Gary M., Fundamentals of Aquatic toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.

US EPA 1996. Ecological Effects Test Guidelines - OPPTS 850.1000. Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Public Draft, EPA 712-C-96-113. United States Environmental Protection Agency (Agencia estadounidense de Protección del Medio Ambiente). [http://www.epa.gov/docs/OPPTS\\_Harmonized/](http://www.epa.gov/docs/OPPTS_Harmonized/)

## 2. Degradación biótica y abiótica

Boesten J.J.T.I. & A.M.A. van der Linden (1991). Modeling the influence of sorption and transformation on pesticide leaching and persistence. *J. Environ. Qual.* 20, 425-435.

Boethling R.S., P.H. Howard, J.A. Beauman & M.E. Larosche (1995). Factors for intermedia extrapolation in biodegradability assessment. *Chemosphere* 30(4), 741-752.

CE (1996). Technical guidance documents in support of the Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and the Commission Regulation (EC) No. 1488/94 sobre evaluación de riesgos para las sustancias existentes. Comisión Europea, Ispra.

de Henau H. (1993). Biodegradation. En: P. Calow. Handbook of Ecotoxicology, vol. I. Blackwell Scientific Publications, Londres. Capítulo 18, pp. 355-377.

ECETOC (1998): QSARs in the Assessment of the Environmental Fate and Effects of Chemicals, Technical report No. 74. Bruselas, junio de 1998.

Federle T.W., S.D. Gasior & B.A. Nuck (1997). Extrapolating mineralisation rates from the ready CO<sub>2</sub> screening test to activated sludge, river water, and soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 127-134.

Langenberg J.H., W.J.G.M. Peijnenburg & E. Rorije (1996). On the usefulness and reliability of existing QSBRs for risk assessment and priority setting. *SAR and QSAR in Environmental Research* 5, 1-16.

Loonen H., F. Lindgren, B. Hansen & W. Karcher (1996). Prediction of biodegradability from chemical structure. En: Peijnenburg W.J.G.M. & J. Damborsky (eds.). Biodegradability Prediction. Kluwer Academic Publishers.

MITI (1992). Biodegradation and bioacumulación data on existing data based on the CSCL Japan. Japan chemical industry, Ecology-toxicology & information center. ISBN 4-89074-101-1.

Niemelä J. (2000). Personal communication to OECD environment Directorate, 20 de marzo de 2000.

Nyholm N., U.T. Berg & F. Ingerslev (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Organismo danés de Protección del Medio Ambiente. Environmental Report No. 337.

Nyholm N. & F. Ingerslev (1997). Kinetic biodegradation tests with low test substance concentrations: Shake flask test with surface water and short term rate measurement in activated sludge. En: Hales S.G. (ed.). Biodegradación Kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making. Seminario SETAC-Europe. Port- Sunlight. Septiembre de 1996. pp. 101-115. SETAC-Europe, Bruselas.

Nyholm N. & L. Toräng (1999). Report of 1998/1999 Ring-test: Shake flask batch test with surface water or surface water / sediment suspensions. ISO/CD 14592-1 Water Quality- Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations, ISO/TC 147/ SC5/WG4 Biodegradability.

OCDE (1993). Structure-Activity Relationships for Biodegradation. OECD Monografía No. 68 sobre el medio ambiente. París 1993.

OCDE (1994). US EPA/EC Joint Project on the Evaluation of (Quantitative) Structure Activity Relationships. Monografía No. 88. París.

OCDE (1995). Detailed Review Paper on Biodegradability Testing. Monografía No. 98. París.

OCDE (1997). Guidance document on direct phototransformation of chemical in water. OECD/GD(97)21. París.

OCDE (1998). Harmonized integrated hazard clasification system for human health and environmental effects of chemical substances. París. <http://www.oecd.org/ehs/class/HCL.6.htm>