

Diario Oficial de la Unión Europea



Edición
en lengua española

Legislación

57º año

19 de marzo de 2014

Sumario

II Actos no legislativos

REGLAMENTOS

- ★ Reglamento (UE) nº 260/2014 de la Comisión, de 24 de enero de 2014, que modifica, con vistas a su adaptación al progreso técnico, el Reglamento (CE) nº 440/2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH) ⁽¹⁾ 1

Precio: 9 EUR

⁽¹⁾ Texto pertinente a efectos del EEE

ES

Los actos cuyos títulos van impresos en caracteres finos son actos de gestión corriente, adoptados en el marco de la política agraria, y que tienen generalmente un período de validez limitado.

Los actos cuyos títulos van impresos en caracteres gruesos y precedidos de un asterisco son todos los demás actos.

II

(Actos no legislativos)

REGLAMENTOS

REGLAMENTO (UE) N° 260/2014 DE LA COMISIÓN

de 24 de enero de 2014

que modifica, con vistas a su adaptación al progreso técnico, el Reglamento (CE) nº 440/2008, por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH)

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

fines científicos (3) y la Directiva 86/609/CEE del Consejo, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (4).

Visto el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión (1), y, en particular, su artículo 13, apartado 3,

Considerando lo siguiente:

(1) El Reglamento (CE) nº 440/2008 de la Comisión (2) incluye los métodos de ensayo para la determinación de las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas y ecotoxicológicas de las sustancias, que deben aplicarse a efectos del Reglamento (CE) nº 1907/2006.

(3) La adaptación contiene dos métodos de determinación de propiedades fisicoquímicas, incluidos una actualización del método de ensayo de la hidrosolubilidad y un nuevo método de ensayo del coeficiente de reparto de relevancia para la evaluación de las sustancias persistentes, bioacumulables y tóxicas (PBT); cuatro métodos nuevos y uno actualizado para la determinación de la ecotoxicidad y el destino y comportamiento en el medio ambiente; nueve métodos para la determinación de la toxicidad y otros efectos sobre la salud, incluidos cuatro métodos de ensayo de la toxicidad por inhalación, entre los que se cuentan una actualización de tres métodos y uno nuevo para reducir el número de animales utilizados y para mejorar la evaluación de los efectos, una actualización del método de ensayo de la toxicidad oral por administración continuada durante 28 días para incluir parámetros de evaluación de la actividad endocrina, una actualización del método de ensayo de la toxicocinética de relevancia para el diseño e interpretación de los estudios toxicológicos, y una actualización de los métodos de ensayo de la toxicidad crónica, de la carcinogénesis y de la toxicidad crónica y la carcinogénesis combinadas.

(2) Es necesario actualizar el Reglamento (CE) nº 440/2008 para incluir con prioridad los métodos alternativos de ensayo nuevos y actualizados que ha adoptado recientemente la OCDE, con el fin de obtener una reducción del número de animales necesarios para los experimentos, de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para

(4) Por tanto, es necesario modificar el Reglamento (CE) nº 440/2008 en consecuencia.

(5) Las disposiciones del presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité establecido de conformidad con el artículo 133 del Reglamento (CE) nº 1907/2006.

(1) DO L 396 de 30.12.2006, p. 1.

(2) DO L 142 de 31.5.2008, p. 1.

(3) DO L 276 de 20.10.2010, p. 33.

(4) DO L 358 de 18.12.1986, p. 1.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

El anexo del Reglamento (CE) nº 440/2008 queda modificado de acuerdo con el anexo del presente Reglamento.

Artículo 2

El presente Reglamento entrará en vigor el tercer día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 24 de enero de 2014.

Por la Comisión

El Presidente

José Manuel BARROSO

ANEXO

El anexo del Reglamento (CE) nº 440/2008 queda modificado como sigue:

- 1) El capítulo A.6 se sustituye por el texto siguiente:

«A.6. HIDROSOLUBILIDAD

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 105 de la OCDE (1995). Es una versión revisada de las TG 105 original que se adoptaron en 1981. No hay diferencias esenciales entre la versión actual y la de 1981. Se ha modificado fundamentalmente el formato. La revisión está basada en el método de ensayo de la UE "Hidrosolubilidad" (1).

CONSIDERACIONES INICIALES

2. La hidrosolubilidad de una sustancia puede verse considerablemente afectada por la presencia de impurezas. El presente método se dirige a determinar la hidrosolubilidad de sustancias esencialmente puras que son estables en agua y no volátiles. Antes de proceder al ensayo, es conveniente disponer de información sobre la sustancia problema, como la fórmula estructural, la presión de vapor, la constante de disociación y la hidrólisis como función del pH.
3. En el presente documento se describen dos métodos de ensayo, el método de elución en columna y el método del frasco, que abarcan respectivamente solubilidades por debajo y por encima de 10^{-2} g/l. Se describe además un ensayo preliminar sencillo. Este permite determinar aproximadamente la cantidad adecuada de muestra que deberá emplearse en el ensayo final, así como el tiempo necesario para conseguir la saturación.

DEFINICIONES Y UNIDADES

4. La hidrosolubilidad de una sustancia es la concentración de saturación en masa de la sustancia en el agua a una temperatura determinada.
5. Se expresa en masa de soluto por volumen de solución. La unidad SI es el kg/m³, pero se puede utilizar también g/l.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

6. No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se analice una sustancia problema.

DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Condiciones del ensayo

7. El ensayo debe efectuarse, a ser posible, a $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. La temperatura elegida se mantendrá constante en todas las partes importantes del equipo.

Ensayo preliminar

8. De manera gradual, añadir volúmenes crecientes de agua a temperatura ambiente a alrededor de 0,1 g de muestra (las sustancias sólidas deben estar reducidas a polvo) en una probeta de 10 ml con tapón de vidrio. Despues de la adición de cada cantidad de agua, agitar vigorosamente la mezcla durante 10 minutos y luego comprobar visualmente si contiene partículas de muestra no disueltas. Si después de añadir 10 ml de agua la muestra o determinadas partes de esta no se han disuelto, hay que proseguir el experimento en una probeta de 100 ml. La solubilidad aproximada se indica, en el cuadro 1, bajo el volumen de agua en que se efectúa la disolución completa de la muestra. Cuando la solubilidad es baja, puede hacer falta mucho tiempo para que se disuelva la sustancia problema, por lo que habrá que esperar como mínimo 24 horas. Si al cabo de 24 horas la sustancia problema sigue sin disolverse, hay que dejar más tiempo (96 horas como máximo) o bien proceder a una nueva dilución a fin de determinar si hay que utilizar el método de elución en columna o el método del frasco.

Cuadro 1

ml de agua en que se disuelven 0,1 g de soluto	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Solubilidad aproximada en g/l	< 1 000	1 000-200	200-100	100-50	50-10	10-1	< 1

Método de elución en columna

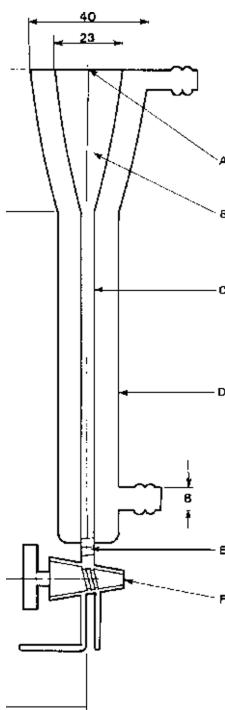
Principio

9. Este método se basa en la elución con agua de la sustancia problema en una microcolumna cargada con un material soporte inerte previamente cubierto con un exceso de sustancia problema (2). La hidrosolubilidad viene determinada por la concentración en masa del eluato cuando ha alcanzado una meseta en función del tiempo.

Aparato

10. El aparato consiste en una microcolumna (figura 1) que se mantiene a temperatura constante. Está conectado a una bomba de recirculación (figura 2) o a un recipiente de nivelación (figura 3). La microcolumna contiene un soporte inerte retenido por un pequeño tapón de lana de vidrio que servirá también para separar las partículas por filtración. Como soporte se pueden emplear bolas de cristal, tierra de diatomeas u otros materiales inertes.
11. La microcolumna representada en la figura 1 es idónea para funcionar con una bomba de recirculación. Tiene un espacio de cabeza correspondiente a cinco volúmenes de lecho de agua (desechados al principio del ensayo) y una capacidad para cinco muestras (tomadas para análisis durante el ensayo). No obstante, se puede reducir la dimensión si es posible añadir agua al sistema durante el ensayo para reemplazar los cinco volúmenes de lecho iniciales, eliminados con las impurezas. La columna se conectará mediante tubos de material inerte a la bomba de recirculación, que será capaz de suministrar aproximadamente 25 ml/hora. Como bomba de recirculación se podrá utilizar, por ejemplo, una bomba peristáltica o una bomba de membrana. Hay que procurar que el material del tubo no sea causa de contaminación ni adsorción.
12. En la figura 3 se muestra el esquema de un sistema con recipiente de nivelación. En este sistema la microcolumna lleva acoplada una llave de una vía. La conexión al recipiente de nivelación se hace mediante una junta de vidrio esmerilado y tubos de material inerte. El caudal del recipiente de nivelación deberá ser de unos 25 ml/hora.

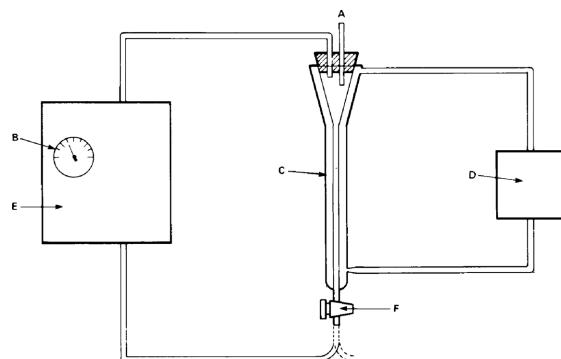
Figura 1



Dimensiones en mm

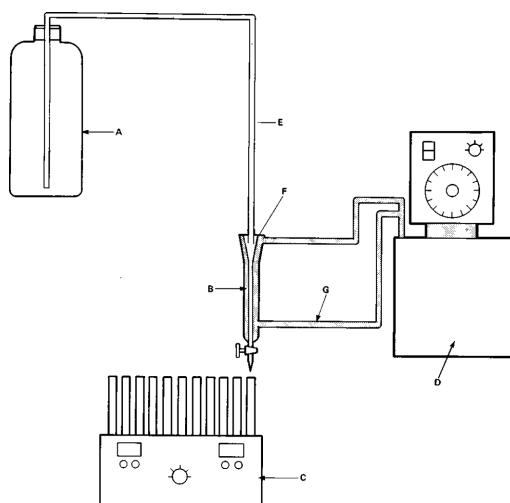
- A. Conexión para la junta de vidrio esmerilado
- B. Espacio de cabeza
- C. Diámetro interior 5
- D. Diámetro exterior 19
- E. Tapón de lana de vidrio
- F. Llave

Figura 2



- A. Equilibrio con la atmósfera
- B. Caudalímetro
- C. Microcolumna
- D. Bomba de circulación termostatizada
- E. Bomba de recirculación
- F. Llave de dos vías para la toma de muestras

Figura 3



- A. Recipiente de nivelación (por ejemplo, frasco de 2,5 litros)
- B. Columna
- C. Acumulador de fracciones
- D. Termostato
- E. Tubo de teflón
- F. Junta de vidrio esmerilado
- G. Tubo para la circulación de agua entre el termostato y la columna, con un diámetro interior de aproximadamente 8 mm

13. Pesar unos 600 mg de material soporte y pasarlo a un matraz de fondo redondo de 50 ml. Disolver una cantidad idónea de la sustancia problema en un disolvente volátil con calidad de reactivo analítico y añadir al soporte una cantidad adecuada de esta solución. El disolvente debe evaporarse por completo, por ejemplo en un rotavapor; de lo contrario, no se daría la saturación en agua del soporte durante la etapa de elución, debido al efecto de partición en la superficie. Dejar que se empape el soporte cargado de esta forma durante 2 horas en 5 ml de agua, aproximadamente, y luego pasar la suspensión a la microcolumna. También se podrá verter el soporte cargado seco en la microcolumna llena de agua y a continuación equilibrar después durante 2 horas.

14. La carga del soporte puede plantear dificultades que lleven a resultados erróneos, por ejemplo si la sustancia problema se deposita en forma de aceite. Las dificultades deben examinarse y han de recogerse los datos correspondientes.

Procedimiento empleado con una bomba de recirculación

15. Se inicia la circulación a través de la columna. El caudal recomendado es de 25 ml/hora, aproximadamente, que equivale a unos 10 volúmenes de lecho por hora para la columna arriba descrita. Se descartan como mínimo los 5 primeros volúmenes de lecho a fin de eliminar las impurezas solubles en el agua. Luego se conecta la bomba de recirculación, haciendo funcionar el aparato hasta llegar al estado de equilibrio, definido por 5 muestras sucesivas cuyas concentraciones no difieran de forma aleatoria en más del $\pm 30\%$. Dichas muestras deben estar separadas entre sí por un intervalo de tiempo correspondiente al paso de al menos 10 volúmenes de lecho. Dependiendo del método analítico aplicado, puede ser preferible establecer una curva de concentración/tiempo para comprobar que se ha alcanzado el equilibrio.

Procedimiento empleado con un recipiente de nivelación

16. Se recogerán las sucesivas fracciones de eluato y se analizarán según el método elegido. Para determinar la hidrosolubilidad, se utilizarán las fracciones procedentes del intervalo medio de elución cuyas concentraciones sean constantes en el intervalo de $\pm 30\%$, al menos en 5 fracciones consecutivas.
17. Como eluyente se recomienda usar agua bidestilada. También puede usarse agua desionizada con una resistividad superior a 10 megaohms/cm y un contenido de carbono orgánico total menor del 0,01 %.
18. Con ambos procedimientos se repetirá la operación, reduciendo el caudal a la mitad. Si los resultados de las dos operaciones concuerdan, la prueba es satisfactoria. Si se observa una solubilidad aparente más elevada con el caudal inferior, se continuará con la reducción del caudal a la mitad hasta que se obtenga la misma solubilidad en dos operaciones sucesivas.
19. Con ambos procedimientos se debe controlar la posible presencia de materia coloidal en las fracciones estudiando la aparición del efecto Tyndall. La presencia de partículas invalida el ensayo, y este deberá repetirse después de mejorar la eficacia de la filtración de la columna.
20. Se medirá el pH de cada muestra, preferiblemente con ayuda de tiras indicadoras específicas.

Método del frasco

Principio

21. La sustancia problema (los sólidos deben estar pulverizados) se disuelve en agua a una temperatura algo superior a la temperatura de ensayo. Cuando se alcanza la saturación, se deja enfriar la mezcla y se mantiene a la temperatura de ensayo. Otra posibilidad es realizar la medida directamente a la temperatura de ensayo siempre que, mediante un muestreo adecuado, se garantice que se ha alcanzado el equilibrio de saturación. Luego, se determina con un método analítico apropiado la concentración en masa de la sustancia problema en la solución acuosa, que no debe contener ninguna partícula sin disolver (3).

Aparato

22. Se necesita el siguiente instrumental:

- material de vidrio e instrumentos de laboratorio normales,
- un dispositivo para agitar las disoluciones a temperatura constante controlada,
- si se precisa en el caso de las emulsiones, una centrífuga (preferiblemente termostatizada), y
- equipo analítico.

Procedimiento

23. Evaluar, a partir del ensayo preliminar, la cantidad de sustancia problema necesaria para saturar el volumen de agua elegido. Pesar aproximadamente cinco veces dicha cantidad en cada uno de tres recipientes de vidrio con tapón, también de vidrio (por ejemplo, tubos de centrífuga, matraces). Añadir a cada recipiente un volumen de agua determinado en función del método analítico y del intervalo de solubilidad. Los frascos se tapan firmemente y se agitan después a 30 °C. Utilizar un dispositivo agitador o mezclador que pueda actuar a temperatura constante como, por ejemplo, un agitador magnético en baño de agua termostatizado. Un día después, tomar uno de los recipientes y equilibrar durante 24 horas a la temperatura del ensayo, agitando de vez en cuando. El contenido del recipiente se centrifuga luego a la temperatura del ensayo y se determina la concentración de la sustancia problema en la fase acuosa clara utilizando un método analítico adecuado. Los otros dos recipientes se

tratan de la misma manera, después de un primer equilibrado a 30 °C durante dos y tres días, respectivamente. Si las concentraciones medidas en al menos los dos últimos recipientes no difieren en más del 15 %, la prueba es satisfactoria. Si los resultados de los recipientes 1, 2 y 3 acusan una tendencia a la progresión, repetir de nuevo todo el ensayo utilizando tiempos de equilibrado más largos.

24. El ensayo se puede realizar también sin preincubar a 30 °C. Para evaluar la velocidad de adquisición del equilibrio de saturación se irán tomando muestras hasta que el tiempo de agitación deje de influir en las concentraciones medidas.
25. Se medirá el pH de cada muestra, preferiblemente con ayuda de tiras indicadoras específicas.

Determinaciones analíticas

26. Es preferible utilizar un método específico de la sustancia, pues pequeñas cantidades de impurezas solubles pueden originar errores sensibles en la solubilidad medida. Pueden citarse como ejemplos los siguientes métodos: cromatografía de gases o de líquidos, valoración volumétrica, fotometría y voltametría.

DATOS E INFORME

Datos

Método de elución en columna

27. En cada operación debe calcularse el valor medio y la desviación típica de al menos cinco muestras consecutivas tomadas durante la meseta de saturación. Los valores medios obtenidos en dos ensayos con caudales diferentes no deberán diferir en más del 30 %.

Método del frasco

28. A partir de los resultados de cada uno de los tres recipientes, que no deberán diferir en más del 15 %, se calcularán las medias.

Informe del ensayo

Método de elución en columna

29. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

- resultados del ensayo preliminar,
- identidad química e impurezas (etapa de purificación preliminar, en su caso),
- concentraciones individuales, caudales y pH de cada muestra,
- desviación típica y media de al menos cinco muestras tomadas durante la meseta de saturación de cada operación,
- promedio de al menos dos operaciones sucesivas,
- temperatura del agua durante el proceso de saturación,
- método de análisis,
- naturaleza del material de soporte,
- carga del material de soporte,
- disolvente utilizado,
- cualquier signo de inestabilidad química de la sustancia durante el ensayo,
- todas las observaciones útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia problema.

Método del frasco

30. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

- resultados del ensayo preliminar,
- identidad química e impurezas (etapa de purificación preliminar, en su caso),

- resultados analíticos individuales y su media cuando se determine más de un valor para un mismo recipiente,
- pH de cada muestra,
- media de los valores de los diferentes recipientes cuando concuerden,
- temperatura del ensayo,
- método analítico,
- cualquier signo de inestabilidad química de la sustancia durante el ensayo,
- todas las observaciones útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia problema.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Directiva 92/69/CEE de la Comisión, de 31 de Julio de 1992, por la que se adapta al progreso técnico, por decimoséptima vez, la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas (DO L 383 de 29.12.1992, p. 113).
- (2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.
- (3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.».

2) Se añade el capítulo A.23 siguiente:

«A.23. COEFICIENTE DE REPARTO (1-OCTANOL/AGUA): MÉTODO DE AGITACIÓN LENTA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 123 (2006) de la OCDE. El método de agitación lenta (1) ha permitido determinar con exactitud el coeficiente de reparto 1-octanol/agua (P_{OW}) con valores de hasta un $\log P_{OW}$ de 8,2. Por lo tanto, es un enfoque experimental idóneo para la determinación directa del P_{OW} de sustancias altamente hidrófobas.
2. Otros métodos para determinar el coeficiente de reparto 1-octanol/agua (P_{OW}) son el método "de frasco de agitación" (2) y la determinación del P_{OW} basada en el comportamiento de retención en CLAR de fase inversa (3). El método "de frasco de agitación" es propenso a dar artefactos por la transferencia de microgotas de octanol a la fase acuosa. Al aumentar los valores de P_{OW} , la presencia de estas microgotas en la fase acuosa provoca una sobrevaloración creciente de la concentración de la sustancia problema en el agua. Por este motivo es aplicable solo a las sustancias con $\log P_{OW} < 4$. El segundo método se basa en los datos sólidos de valores de P_{OW} medidos directamente para calibrar la relación entre el comportamiento de retención en CLAR y los valores medidos de P_{OW} . Hubo un proyecto de directrices de la OCDE para determinar los coeficientes de reparto 1-octanol/agua de las sustancias ionizables (4), pero ya no está vigente.
3. Este método de ensayo ha sido desarrollado en los Países Bajos. La precisión de los métodos aquí descritos ha sido validada y optimizada en un estudio de validación interlaboratorios, en el que participaron quince laboratorios (5).

CONSIDERACIONES INICIALES

Fundamento y aplicación

4. Se ha observado una relación altamente significativa entre los coeficientes de reparto 1-octanol/agua (P_{OW}) de las sustancias orgánicas inertes y su bioacumulación en los peces. Por lo demás, se ha demostrado que el P_{OW} posee una buena correlación con la toxicidad en peces y también con la sorción de los compuestos químicos a sólidos como suelos y sedimentos. Una amplia visión general de estas relaciones se recoge en la bibliografía (6).

5. Se han establecido muy diversas relaciones entre el coeficiente de reparto 1-octanol/agua y otras propiedades de las sustancias relevantes para la química y toxicología medioambientales. Por esta razón, el coeficiente de reparto 1-octanol/agua se ha convertido en un parámetro clave en la evaluación del riesgo medioambiental de los compuestos químicos y de su destino final en el medio ambiente.

Ámbito de aplicación

6. Se considera que el ensayo de agitación lenta reduce la formación de microgotas a partir de las gotitas de 1-octanol en la fase acuosa. Por esta razón no hay riesgo de sobrevalorar la concentración acuosa debido a las moléculas de la sustancia problema asociadas a las gotitas. Así pues, el método de agitación lenta es particularmente aplicable a la determinación del P_{OW} de sustancias con valores esperados de $\log P_{OW}$ de 5 y mayores, en las que el método de frasco de agitación (2) tendería a dar resultados erróneos.

DEFINICIONES Y UNIDADES

7. El coeficiente de reparto de una sustancia entre el agua y un disolvente lipófilo (1-octanol) define la distribución en equilibrio del compuesto químico entre las dos fases. El coeficiente de reparto entre el agua y el 1-octanol (P_{OW}) se define como la relación de las concentraciones en equilibrio de la sustancia problema en 1-octanol saturado con agua (C_O) y en agua saturada con 1-octanol (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Al ser un cociente entre dos concentraciones es adimensional. Se indica generalmente en forma de su logaritmo decimal ($\log P_{OW}$). El P_{OW} es dependiente de la temperatura, por lo que los datos del informe incluirán la temperatura de la medición.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

8. Con el fin de determinar el coeficiente de reparto, se equilibran el agua, el 1-octanol y la sustancia problema a temperatura constante. Seguidamente se determinan las concentraciones de la sustancia problema en las dos fases.
9. Las dificultades experimentales asociadas a la formación de microgotas durante el experimento de frasco de agitación se consiguen reducir en el ensayo de agitación lenta que proponemos aquí. En el ensayo de agitación lenta, el agua, el 1-octanol y la sustancia problema se equilibran en un reactor agitado termostatizado. El intercambio entre las fases se acelera mediante agitación. La agitación introduce una turbulencia limitada, lo que facilita el intercambio entre el 1-octanol y el agua sin que se formen microgotas (1).

APLICABILIDAD DEL ENSAYO

10. Dado que la presencia de otras sustancias distintas podría influir en el coeficiente de actividad de la sustancia problema, se analizará esta como sustancia pura. En el ensayo de reparto 1-octanol/agua se empleará la sustancia de máxima pureza comercialmente disponible.
11. El presente método es aplicable a sustancias puras que no se disocian ni asocian y que no presentan una actividad interfacial importante. Permite determinar el coeficiente de reparto 1-octanol/agua de estas sustancias y de sus mezclas. Cuando el método se aplica a las mezclas, los coeficientes de reparto 1-octanol/agua determinados son condicionales, al depender de la composición química de la mezcla analizada y de la composición de electrolitos utilizada en la fase acuosa. Siempre que se tomen medidas complementarias, el método es también aplicable a compuestos que se disocian o asocian (punto 12).
12. Debido a los múltiples equilibrios que intervienen en el reparto 1-octanol/agua de las sustancias que se disocian, como los ácidos orgánicos y los fenoles, las bases orgánicas y los compuestos organometálicos, el coeficiente de reparto 1-octanol/agua es una constante condicional que depende intensamente de la composición electrolítica (7) (8). Por consiguiente, para determinar el coeficiente de reparto 1-octanol/agua es necesario controlar y documentar el pH y la composición electrolítica del ensayo. La evaluación de los coeficientes de reparto ha de confiarse al juicio de un experto. A partir del valor de la(s) constante(s) de disociación se elegirán los valores de pH idóneos, a fin de determinar un coeficiente de reparto por cada estado de ionización. Cuando se analizan compuestos organometálicos deben emplearse soluciones amortiguadoras que no formen complejos (8). Teniendo en cuenta los datos conocidos sobre la química en medio acuoso (constantes de complejación, constantes de disociación), se elegirán las condiciones experimentales de modo tal que permita estimar la especiación de la sustancia problema en la fase acuosa. La fuerza iónica ha de ser idéntica en todos los ensayos, para lo cual se empleará un electrolito de fondo.
13. Pueden surgir dificultades analíticas cuando se aplica el ensayo a sustancias con hidrosolubilidad baja o con P_{OW} elevado, pues en ese caso las concentraciones en el agua serán muy bajas, dificultando una determinación exacta. El presente método de ensayo facilita indicaciones para solventar esta dificultad.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

14. Los reactivos químicos serán de calidad analítica o de más alta pureza. Se recomienda el uso de sustancias problema no marcadas de composición química conocida y pureza preferiblemente del 99 %, al menos, o de sustancias problema radiomarcadas de composición química y pureza radioquímica conocidas. En caso de marcadores de semivida breve, deben aplicarse correcciones para tener en cuenta su desintegración. En caso de sustancias problema radiomarcadas, deberá emplearse un método de análisis químico específico para garantizar que la radiactividad medida está en relación directa con la sustancia problema.
15. Puede obtenerse una estimación de $\log P_{\text{OW}}$ con ayuda de programas informáticos comerciales para tal fin, o bien aplicando la relación de solubilidades en ambos disolventes.
16. Antes de emprender un ensayo de agitación lenta para la determinación del P_{OW} , es preciso conocer la siguiente información acerca de la sustancia problema:
- fórmula estructural;
 - métodos analíticos apropiados para determinar la concentración de la sustancia en agua y en 1-octanol;
 - constante(s) de disociación de las sustancias ionizables [Directrices 112 de la OCDE (9)];
 - hidrosolubilidad (10);
 - hidrólisis abiótica (11);
 - biodegradabilidad fácil (12);
 - presión de vapor (13).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Material

17. Se precisa el equipo normal de laboratorio y, en particular, el siguiente:
- agitadores magnéticos y barras de agitación magnéticas recubiertas de teflón para agitar la fase acuosa;
 - instrumental analítico adecuado para determinar la concentración de la sustancia problema a las concentraciones esperadas;
 - cubeta de agitación provista de grifo de desagüe. Dependiendo de la estimación del $\log P_{\text{OW}}$ y del límite de detección (LOD) de la sustancia problema, se ha planteado usar un recipiente de reacción de las mismas proporciones pero con capacidad mayor de un litro, con el fin de obtener un volumen de agua suficiente para el análisis y la extracción química. De este modo se obtendrán concentraciones más elevadas en el extracto acuoso y, por ende, una determinación analítica más fiable. En el apéndice 1 figura una tabla que recoge los cálculos del volumen mínimo necesario, el LOD de la sustancia, su $\log P_{\text{OW}}$ estimado y su hidrosolubilidad. La tabla se basa en la relación entre el $\log P_{\text{OW}}$ y el cociente de solubilidades en octanol y agua, tal como ha sido definida por Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{\text{OW}} = 0,88 \log SR + 0,41$$

donde:

$$SR = S_{\text{oct}}/S_w \text{ (en molaridad);}$$

y en la relación establecida por Lyman (15) para predecir la hidrosolubilidad. Los valores de hidrosolubilidad calculados según la ecuación que se indica en el apéndice 1 deben considerarse una primera estimación. Conviene señalar que el usuario tiene libertad para hacer su propia estimación de la hidrosolubilidad por medio de cualquier ecuación que a su criterio represente mejor la relación entre hidrofobicidad y solubilidad. Cuando se trata de compuestos sólidos, por ejemplo, se recomienda tener en cuenta el punto de fusión en la predicción de la solubilidad. En caso de aplicar una ecuación modificada, habrá que cerciorarse de que sigue siendo válida la ecuación para el cálculo de la solubilidad en octanol. En el apéndice 2 se ha representado esquemáticamente una cubeta de agitación con camisa de vidrio de aprox. un litro de capacidad. Las proporciones del recipiente representado en el apéndice 2 han demostrado ser adecuadas, por lo que deben mantenerse aunque se utilicen recipientes de distinto tamaño;

- es fundamental disponer de algún medio para mantener constante la temperatura durante el ensayo de agitación lenta.

18. Los recipientes serán de material inerte para que la adsorción a sus paredes resulte despreciable.

Preparación de las soluciones del ensayo

19. La determinación del P_{OW} se efectuará con el 1-octanol de la máxima pureza comercialmente disponible (como mínimo + 99 %). Se recomienda purificar el 1-octanol por extracción con ácido, álcali y agua y posterior desecación. Se puede emplear además la destilación para purificar el 1-octanol. El 1-octanol purificado servirá para preparar soluciones patrón de las sustancias problema. En la determinación del P_{OW} se empleará agua destilada procedente de un aparato de cristal o de cuarzo o agua procedente de un sistema de purificación; también se podrá utilizar agua de calidad analítica para CLAR. El agua destilada se habrá filtrado por un filtro de 0,22 μm , y se emplearán blancos para descartar la presencia de impurezas en los extractos concentrados que pudieran interferir con la sustancia problema. Si se emplea un filtro de fibra de vidrio, se limpiará calentándolo en horno a 400 °C durante tres horas como mínimo.

20. Los dos disolventes se habrán saturado recíprocamente antes del ensayo, dejándolos equilibrar en un recipiente con suficiente capacidad. Esto se consigue mediante agitación lenta del sistema bifásico durante dos días.

21. Se tomará una cantidad adecuada de la sustancia problema y se disolverá 1-octanol (saturado con agua). El coeficiente de reparto 1-octanol/agua se ha de determinar en soluciones diluidas en estos dos elementos. Por lo tanto, la concentración de la sustancia problema no debe exceder del 70 % de su solubilidad ni rebasar un máximo de 0,1 M en cualquiera de las fases (1). Las soluciones de 1-octanol empleadas en el ensayo estarán exentas de partículas sólidas de la sustancia problema en suspensión.

22. Se tomará una cantidad adecuada de la sustancia problema y se disolverá en 1-octanol (saturado con agua). Si el log P_{OW} estimado es superior a 5, habrá que cerciorarse de que las soluciones de 1-octanol empleadas en el ensayo están exentas de sustancia problema sólida en suspensión. A tal fin, cuando se analicen compuestos químicos con un log P_{OW} estimado > 5 se seguirá el procedimiento siguiente:

- disolver la sustancia problema en 1-octanol (saturado con agua),
- dejar la solución en reposo el tiempo suficiente para que sedimente el material sólido en suspensión; durante la fase de sedimentación, comprobar la concentración de la sustancia problema,
- cuando las concentraciones medidas en la solución de 1-octanol hayan alcanzado valores estables, diluir la solución madre con un volumen adecuado de 1-octanol,
- determinar la concentración de la solución madre diluida. Si la concentración medida es coherente con la dilución, la solución madre diluida se podrá emplear en el ensayo de agitación lenta.

Extracción y análisis de las muestras

23. Para el análisis de la sustancia problema se empleará un método analítico validado. Los investigadores deberán aportar pruebas de que las concentraciones alcanzadas durante el ensayo, tanto en la fase de 1-octanol saturado con agua como en la de agua saturada con 1-octanol, están por encima del límite de cuantificación de los métodos analíticos empleados. Cuando sea necesario aplicar métodos de extracción, habrá que establecer con anterioridad al ensayo las recuperaciones analíticas de la sustancia problema a partir de la fase acuosa y de la fase de 1-octanol. La señal analítica deberá ser corregida con blancos y se extremarán las precauciones para evitar la transferencia del analito de una muestra a otra.

24. Es probable que antes del análisis haya que proceder a la extracción de la fase acuosa con un disolvente orgánico y a la preconcentración del extracto, por cuanto se dan concentraciones excesivamente bajas de las sustancias problema hidrófobas en la fase acuosa. Por la misma razón habrá que reducir las concentraciones que puedan resultar en el blanco. Para este fin es necesario usar disolventes de alta pureza, preferiblemente específicos para análisis de residuos. Por lo demás, el uso de material de vidrio escrupulosamente limpio (por ejemplo, mediante lavado con solvente o calentamiento en horno a alta temperatura) ayudará a evitar la contaminación cruzada.

25. Se puede obtener una estimación del log P_{OW} con ayuda de un programa informático o mediante la valoración de un experto. Si su valor es mayor de seis, habrá que supervisar estrechamente las correcciones con el blanco y las transferencias de analito. Además, si la estimación de log P_{OW} es superior a seis, es obligado el uso de un patrón análogo para corregir los valores de recuperación, a fin de obtener factores de preconcentración elevados. Existen varios programas informáticos comerciales (1) para la estimación de log P_{OW} , como Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) y ACD log P (19). En la bibliografía (20-22) se ofrecen descripciones de los métodos de estimación.

(1) Esta información se facilita exclusivamente para mayor comodidad del usuario. Se pueden utilizar otros programas informáticos siempre que se demuestre que dan lugar a los mismos resultados.

26. Los límites de cuantificación (LOQ) para la determinación de la sustancia problema en 1-octanol y agua se establecen sobre la base de métodos aceptados. Como regla general, el límite de cuantificación del método se puede determinar como la concentración en agua o 1-octanol que produce una relación señal/ruido igual a diez. Se elegirá un método adecuado de extracción y preconcentración, además de especificar las recuperaciones analíticas. Se elegirá un factor de preconcentración adecuado a fin de obtener una señal de la intensidad necesaria para la determinación analítica.
27. Sobre la base de los parámetros del método analítico y de las concentraciones esperadas, se determina el tamaño de muestra aproximado que hace falta para determinar con exactitud la concentración de la sustancia. Se evitará emplear muestras de agua demasiado reducidas como para obtener una señal analítica suficiente. Por otro lado, se evitará también el uso de muestras de agua excesivamente voluminosas, pues de otro modo podría quedar una cantidad insuficiente para el número mínimo de análisis que se necesitan ($n = 5$). En el apéndice 1 se indica el volumen mínimo de muestra en función de la capacidad del recipiente, del LOD de la sustancia problema y de su solubilidad.
28. La cuantificación de las sustancias problema se realiza por comparación con las curvas de calibración del compuesto correspondiente. Las concentraciones halladas en las muestras analizadas deberán estar comprendidas entre las concentraciones de los patrones.
29. En caso de sustancias problema con un $\log P_{OW}$ estimado superior a seis, se añadirá un patrón análogo a la muestra de agua antes de la extracción con el fin de registrar las pérdidas ocurridas durante la extracción y la preconcentración de las muestras de agua. Para poder corregir exactamente los valores de recuperación, los análogos deberán tener propiedades muy similares o idénticas a las de la sustancia problema. Con este propósito se usan preferiblemente análogos isotópicamente marcados (estables) de las sustancias de interés (por ejemplo, perdeuterados o marcados con ^{13}C). Cuando no sea posible el uso de isótopos marcados estables, como ^{13}C o ^2H , habrá que demostrar con datos fidedignos de la bibliografía que las propiedades fisicoquímicas del análogo son muy semejantes a las de la sustancia problema. Durante la extracción líquido-líquido de la fase acuosa se pueden formar emulsiones. Es posible reducirlas añadiendo una sal y dejando que la emulsión repose hasta el día siguiente. Es preciso documentar los métodos empleados para la extracción y preconcentración de las muestras.
30. Las muestras extraídas de la fase de 1-octanol se pueden, en caso necesario, diluir con un disolvente apropiado antes de su análisis. Por lo demás, se recomienda usar patrones análogos para corregir los valores de recuperación de aquellas sustancias que, en los ensayos de recuperación, han mostrado un alto grado de variabilidad (desviación típica relativa $> 10\%$).
31. El método analítico se documentará detalladamente. La documentación se refiere a: método de extracción, factores de preconcentración y de dilución, parámetros instrumentales, procedimiento habitual de calibración, intervalo de calibración, recuperación analítica de la sustancia problema a partir del agua, adición de patrones análogos para corregir los valores de recuperación, valores del blanco, límites de detección y límites de cuantificación.

Realización del ensayo

Relación óptima de volúmenes 1-octanol/agua

32. Para decidir qué volúmenes de agua y 1-octanol se van a emplear, hay que tener en cuenta el LOQ en 1-octanol y en agua, los factores de preconcentración aplicados a las muestras acuosas, el volumen de muestreo en 1-octanol y en agua, y las concentraciones esperadas. Por razones experimentales, en el sistema de agitación lenta el volumen de 1-octanol ha de elegirse de manera que la capa de este solvente sea lo bastante espesa ($> 0,5\text{ cm}$) para permitir la toma de muestras de la fase de 1-octanol sin alterarla.
33. En el análisis de compuestos con $\log P_{OW}$ de 4,5 o superior, la proporción típica entre fases es de 20 a 50 ml de 1-octanol por 950 a 980 ml de agua en un recipiente de un litro.

Condiciones del ensayo

34. Durante el ensayo, el recipiente de reacción se mantiene termostatizado para reducir la variación de temperatura a menos de $1\text{ }^\circ\text{C}$. El ensayo se efectuará a $25\text{ }^\circ\text{C}$.
35. El sistema experimental deberá protegerse de la luz diurna, ya sea procediendo en una sala oscura, ya cubriendo el recipiente de reacción con lámina de aluminio.
36. El ensayo se realizará (en la medida de lo posible) en un ambiente limpio de polvo.
37. El sistema de 1-octanol/agua se agita hasta alcanzar el equilibrio. En un ensayo piloto, se establece la duración del período de equilibrado realizando una operación de agitación lenta y tomando periódicamente muestras de agua y 1-octanol. Los tiempos de muestreo estarán separados por un lapso de cinco horas como mínimo.
38. Cada determinación de P_{OW} se basará al menos en tres ensayos de agitación lenta independientes.

Determinación del tiempo de equilibrado

39. Se supone que se alcanza el equilibrio cuando la curva de regresión del cociente de concentraciones 1-octanol/agua en función del tiempo, representada a lo largo de cuatro momentos de muestreo, arroja una pendiente que no es significativamente diferente de cero a un nivel de p de 0,05. El tiempo de equilibrado será como mínimo un día antes de comenzar el muestreo. Como norma general, el muestreo de sustancias con un $\log P_{OW}$ estimado inferior a cinco puede efectuarse durante los días dos y tres. Los compuestos más hidrófobos pueden necesitar un equilibrado más prolongado. En el caso de una sustancia con $\log P_{OW}$ de 8,23 (decaclorobifenilo), fueron suficientes 144 horas para llegar al equilibrio. Este se establece mediante muestreo repetido a partir de un único recipiente.

Inicio del ensayo

40. Al iniciar el ensayo, se llena el recipiente de reacción con agua saturada de 1-octanol. Se deja tiempo suficiente hasta alcanzar la temperatura termostatizada.
41. Se toma la cantidad deseada de sustancia problema (disuelta en el volumen necesario de 1-octanol saturado con agua) y se añade cuidadosamente al recipiente de reacción. Este es un paso crucial del ensayo, en el que hay que evitar la mezcla turbulenta de las dos fases. A tal fin, se puede pipetear lentamente la fase de 1-octanol contra la pared del vaso experimental, cerca de la superficie del agua. Acto seguido fluirá por la pared de vidrio para formar una película sobre la fase acuosa. Se evitará en todo caso la decantación del 1-octanol directamente en el matraz; se procurará que no caigan gotas de 1-octanol directamente en el agua.
42. Después de comenzar la agitación, se aumenta suavemente su velocidad. Si no se pudieran ajustar debidamente los motores de agitación habría que considerar el uso de un transformador. La velocidad de agitación se ajusta de modo que se cree un vórtice en la interfase entre el agua y el 1-octanol con una profundidad de 0,5 cm a 2,5 cm como máximo. Si se sobrepasa esta profundidad de 2,5 cm, habrá que reducir la velocidad de agitación; de lo contrario pueden formarse microgotas a partir de las gotas de 1-octanol en la fase acuosa, lo que llevaría a sobrevalorar la concentración de la sustancia problema en el agua. Esta velocidad de agitación máxima que corresponde a 2,5 cm de profundidad se recomienda teniendo en cuenta los resultados del estudio de validación interlaboratorios (5). Se trata de una solución intermedia entre conseguir un equilibrado rápido y limitar la formación de microgotas de 1-octanol.

Muestreo y tratamiento de las muestras

43. Antes de proceder al muestreo, se apaga el agitador y se espera a que los líquidos estén en reposo. Al finalizar el muestreo se vuelve a poner en marcha el agitador a velocidad lenta, como se describe anteriormente, y después se aumenta poco a poco la velocidad.
44. Las muestras de la fase acuosa se toman de un grifo ubicado en el fondo del recipiente de reacción. Hay que desechar siempre el volumen muerto de agua contenido en los grifos (alrededor de 5 ml en el recipiente descrito en el apéndice 2). El agua contenida en los grifos no sufre agitación y, por lo tanto, no está en equilibrio con el resto de líquido. Se anota el volumen de las muestras de agua, verificando que la cantidad de sustancia problema presente en el agua desechara se ha tenido en cuenta al determinar el balance de masa. Las pérdidas por evaporación se reducen al mínimo dejando que el agua fluya suavemente por el embudo de decantación, evitando perturbaciones de la capa de agua/1-octanol.
45. Las muestras de 1-octanol se obtienen tomando una pequeña alícuota (aprox. 100 μ l) de la capa de 1-octanol con una jeringa de 100 microlitros compuesta enteramente de vidrio y metal. Se procurará no perturbar la superficie de interfase. Se anota el volumen del líquido muestreado. Basta una pequeña alícuota, puesto que la muestra de 1-octanol se va a diluir.
46. Es conveniente evitar transferencias innecesarias de la muestra. Por esta razón el volumen de muestra debe determinarse gravimétricamente. En el caso de las muestras acuosas, esto se consigue recogiéndolas en un embudo de decantación que contenga ya el volumen necesario de disolvente.

DATOS E INFORME

47. En el presente método de ensayo, el P_{OW} se determina a partir de tres ensayos de agitación lenta (tres unidades experimentales) realizados con el compuesto en investigación en idénticas condiciones. La curva de regresión que sirve para demostrar que se ha alcanzado el equilibrio deberá basarse en los resultados de al menos cuatro determinaciones de C_o/C_w correspondientes a momentos de muestreo consecutivos. Ello permite calcular la varianza como medida de la incertidumbre del valor medio obtenido por cada unidad experimental.
48. El P_{OW} queda definido por la varianza de los datos obtenidos por cada unidad experimental. Esta información sirve para calcular el P_{OW} como media ponderada de los resultados de las unidades experimentales individuales. Así, la inversa de la varianza de los resultados obtenidos por las unidades experimentales sirve como factor de ponderación. De este modo los datos con una gran variación (expresada como varianza) y, por ende, con menor fiabilidad, influyen menos en el resultado que los datos con escasa varianza.

49. De manera análoga se calcula la desviación típica ponderada. Refleja la repetibilidad de las mediciones de P_{OW} . Una desviación típica ponderada reducida indica que la determinación del P_{OW} tiene alta repetibilidad dentro del laboratorio. A continuación se expone el tratamiento estadístico formal de los datos.

Tratamiento de los resultados

Demostración de que se ha alcanzado el equilibrio

50. Por cada momento de muestreo se calcula el logaritmo del cociente de concentraciones de la sustancia problema en 1-octanol y en agua $[\log (C_O/C_w)]$. Se demuestra que se ha alcanzado el equilibrio químico llevando a una gráfica dicho cociente en función del tiempo. Una meseta en esta gráfica a lo largo de al menos cuatro momentos de medición consecutivos indica que se ha alcanzado el equilibrio, y que el compuesto se ha disuelto realmente en el 1-octanol. De no ser así, habrá que proseguir el ensayo hasta que cuatro puntos de medición consecutivos arrojen una pendiente que no difiera significativamente de cero a un nivel p de 0,05, lo que indica que $\log C_o/C_w$ es independiente del tiempo.

Cálculo de $\log P_{OW}$

51. El valor de $\log P_{OW}$ de la unidad experimental se calcula como la media ponderada de $\log C_o/C_w$ correspondiente a la zona de la curva de $\log C_o/C_w$ en función del tiempo en la que se ha demostrado el estado de equilibrio. La media ponderada se calcula ponderando los datos con la inversa de la varianza, de modo que la influencia de los datos en el resultado final sea inversamente proporcional a su incertidumbre.

Media de $\log P_{OW}$

52. Se calcula el valor de $\log P_{OW}$ como la media de los resultados de las unidades experimentales individuales ponderados con sus respectivas varianzas.

El cálculo es el siguiente:

$$\log P_{OW,Av} = (\sum w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

donde:

$\log P_{OW,i}$ = valor de $\log P_{OW}$ de la unidad experimental individual i ;

$\log P_{OW,Av}$ = media ponderada de las determinaciones de $\log P_{OW}$ individuales;

w_i = peso estadístico atribuido al valor de $\log P_{OW}$ de la unidad experimental i .

Como w_i se toma la inversa de la varianza de $\log P_{OW,i}$ ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Se estima el error de la media de $\log P_{OW}$ como la repetibilidad de $\log C_o/C_w$ determinado durante la fase de equilibrio en las unidades experimentales individuales. Este se expresa como la desviación típica ponderada de $\log P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log P_{OW,Av}}$), que a su vez da una medida del error asociado a $\log P_{OW,Av}$. La desviación típica ponderada se puede calcular a partir de la varianza ponderada ($\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$) del modo siguiente:

$$\text{var}_{\log P_{OW,Av}} = (\sum w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\sum w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0,5}$$

Donde n representa el número de unidades experimentales.

Informe del ensayo

54. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

- nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la posición del marcador si se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés (véase el punto 17),
- pureza (impurezas) de la sustancia problema,
- pureza radioquímica de las sustancias marcadas y actividad molar (si procede),
- estimación preliminar de $\log P_{OW}$, además del método aplicado para obtener su valor.

Condiciones del ensayo:

- fechas de realización de los estudios,
- temperatura durante el ensayo,
- volúmenes de 1-octanol y agua al inicio del ensayo,
- volúmenes de las muestras tomadas de 1-octanol y agua,
- volúmenes de 1-octanol y agua que quedan en los recipientes de ensayo,
- descripción de los recipientes de ensayo y las condiciones de agitación (dimensiones de la barra agitadora y del recipiente de ensayo, altura del vórtice en mm y, cuando se conozca, velocidad de agitación) empleadas,
- procedimientos analíticos aplicados para determinar la sustancia problema y el límite de cuantificación del método,
- tiempos de muestreo,
- pH de la fase acuosa y soluciones amortiguadoras empleadas cuando se ajusta el pH (en caso de moléculas ionizables),
- número de réplicas.

Resultados:

- repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados,
- concentraciones medidas de la sustancia problema en 1-octanol y en agua en función del tiempo,
- demostración del balance de masa,
- temperatura y desviación típica o intervalo de temperaturas durante el ensayo,
- recta de regresión del cociente de concentraciones en función del tiempo,
- valor medio de $\log P_{ow,Av}$ y su error típico,
- discusión e interpretación de los resultados,
- ejemplos de datos en bruto de los análisis representativos (todos los datos en bruto tienen que almacenarse de conformidad con las normas de BPL), entre ellos los índices de recuperación de los análogos y el número de concentraciones tomadas para la calibración (además de los criterios para definir el coeficiente de correlación de la curva de calibración), y resultados de garantía de calidad/control de calidad (QA/QC),
- cuando estén disponibles: informe de validación del método de ensayo (con indicación de su referencia bibliográfica).

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 499-512.
- (2) Capítulo A.8 del presente anexo. Coeficiente de reparto.
- (3) Capítulo A.8 del presente anexo. Coeficiente de reparto.
- (4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.
- (5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (POW) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.
- (6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). *Handbook of property estimation methods for chemicals*. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

- (7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York, NY.
- (8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596-2602.
- (9) OECD (1981) *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water*. Paris.
- (10) Capítulo A.6 del presente anexo. Hidrosolubilidad.
- (11) Capítulo C.7 del presente anexo. Degradación — Degradación abiotíca: hidrólisis en función del pH.
- (12) Capítulo C.4-Partes II – VII (métodos A a F) del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil".
- (13) Capítulo A.4 del presente anexo. Presión de vapor.
- (14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data*. 40: 623-626.
- (15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds*, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.
- (16) Leo A, Weininger D (1989). *Medchem Software Manual*. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
- (17) Meylan W (1993). *SRC-LOGKOW for Windows*. SRC, Syracuse, N.Y.
- (18) Compudrug L (1992). *ProLogP*. Compudrug, Ltd, Budapest.
- (19) ACD. *ACD logP; Advanced Chemistry Development*: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.
- (20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.
- (21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479-488.
- (22) Jübermann O (1958). *Houben-Weyl*, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386-390.

Apéndice 1

Hoja para el cálculo de los volúmenes mínimos de agua necesarios para la detección de sustancias problema con diferentes valores de $\log P_{ow}$ en fase acuosa

Hipótesis:

- Volumen máximo de las alícuotas individuales = 10 % del volumen total; 5 alícuotas = 50 % del volumen total.
- Concentración de las sustancias problema = $0,7 \times$ solubilidad en cada fase. Si las concentraciones son más bajas, se necesitarán volúmenes mayores.
- Volumen empleado para la determinación del LOD = 100 ml.
- Las correspondencias entre $\log P_{ow}$ y $\log S_w$ y entre $\log P_{ow}$ y SR (S_{oct}/S_w) expresan aceptablemente las relaciones que se dan en las sustancias problema.

Estimación de S_w

$\log P_{ow}$	Ecuación	$\log S_w$	S_w (mg/l)
4	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	0,035	1,084E+00
5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-0,426	3,750E-01
5,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-0,887	1,297E-01
6	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-1,348	4,487E-02
6,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-1,809	1,552E-02
7	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-2,270	5,370E-03
7,5	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-2,731	1,858E-03
8	$(-0,922 \times \log P_{ow} + 4,184)$	-3,192	6,427E-04

Estimación de S_{oct}

$\log P_{ow}$	Ecuación	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88 \log SR + 0,49$	2,710E+05

Masa total de sustancia problema (mg)	Masa _{oct} /Masa _{agua}	Masa _{H2O} (mg)	Conc _{H2O} (mg/l)	Masa _{oct} (mg)	Conc _{oct} (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333

Masa total de sustancia problema (mg)	Masa _{oct} /Masa _{agua}	Masa _{H2O} (mg)	Conc _{H2O} (mg/l)	Masa _{oct} (mg)	Conc _{oct} (mg/l)
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Cálculo de los volúmenes

Volumen mínimo de fase acuosa necesario por cada concentración límite de detección

log K _{ow}	LOD (microgramos/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Volumen empleado para determinar el LOD (litros)	0,1					

Leyendas de los cálculos:

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 1 litro.

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 2 litros.

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 5 litros.

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 10 litros.

Sobrepasa incluso el 10 % del recipiente de equilibrado de 10 litros.

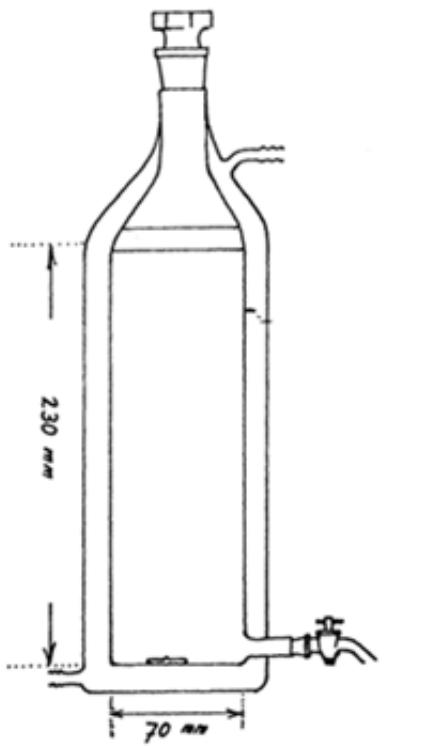
Representación de los volúmenes necesarios en función de la hidrosolubilidad y del log P_{ow}

Volumen mínimo de fase acuosa necesario por cada concentración límite de detección (ml)

log P _{ow}	S _w (mg/l)	LOD (microgramos/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86

log P _{ow}	S _w (mg/l)	LOD (microgramos/l) →	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Volumen empleado para determinar el LOD (litros)		0,1					

Apéndice 2

Ejemplo de recipiente con camisa de vidrio empleado en el ensayo de agitación lenta para la determinación del P_{ow} 

3) El capítulo B.2 se sustituye por el texto siguiente:

«B.2. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 403 de la OCDE (2009) (1). Las directrices 403 (TG 403) original para ensayos de toxicidad aguda por inhalación fueron adoptadas en 1981. El presente método de ensayo B.2 (que se considera equivalente a las TG 403 revisadas) se ha diseñado para hacerlo más flexible, reducir el uso de animales y respetar la normativa legal. El método de ensayo revisado contempla dos tipos de estudios: un protocolo de CL_{50} tradicional y un protocolo de concentración \times tiempo ($C \times t$). La principal característica de este método de ensayo es su capacidad de proporcionar una relación concentración-respuesta con resultados desde no letales hasta letales que permite obtener la concentración letal mediana (CL_{50}), la concentración umbral no letal (por ejemplo, CL_{01}) y la pendiente, además de identificar una posible susceptibilidad ligada al sexo. Deberá emplearse un protocolo $C \times t$ cuando exista una necesidad científica o normativa específica que imponga la investigación con animales en diferentes períodos, como es el caso de la planificación de actuaciones de urgencia [por ejemplo, para obtener los niveles orientativos de la exposición aguda (Acute Exposure Guideline Levels, AEGL), (las directrices de planificación de la respuesta en situaciones de emergencia (Emergency Response Planning Guidelines ERPG), o los niveles umbral de exposición aguda (Acute Exposure Threshold Levels, AETL)] o de la planificación del uso del suelo.
2. Se encontrará una guía para la realización e interpretación de estudios según este método de ensayo en el "Documento de orientación sobre los ensayos de toxicidad por inhalación aguda" [Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing (GD 39)] (2).
3. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en GD 39 (2).
4. Este método de ensayo permite hacer una caracterización de la sustancia química problema y una evaluación cuantitativa del riesgo, además de ordenar y clasificar los compuestos químicos con arreglo al Reglamento (CE) nº 1272/2008 (3). El GD 39 (2) proporciona una orientación para seleccionar el método de ensayo adecuado a los estudios de toxicidad aguda. Cuando solamente se necesite información sobre la clasificación y el etiquetado, se recomienda de manera general consultar el capítulo B.52 de este anexo (4) [véase el GD 39 (2)]. El presente método de ensayo B.2 no ha sido concebido específicamente para el análisis de productos especializados, como materiales fibrosos o isométricos escasamente solubles o nanomateriales manufacturados.

CONSIDERACIONES INICIALES

5. Antes de considerar la aplicación de este método de ensayo y con el fin de minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de análisis deberá tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia problema, sin olvidar los estudios existentes [consúltese, por ejemplo, el capítulo B.52 de este anexo (4)] cuyos datos pudieran desaconsejar la realización de nuevas investigaciones. En la selección de especie, variedad, sexo, modo de exposición y concentraciones analíticas adecuadas serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo*, los usos y la posible exposición humana previstos, los cálculos (Q)SAR y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias estructuralmente afines [véase el GD 39 (2)].
6. En la medida de lo posible, deberá evitarse la investigación de sustancias irritantes o corrosivas que previamente vayan a provocar dolor o daños intensos. Con objeto de esclarecer si es posible prescindir de nuevas investigaciones, el potencial corrosivo/irritante deberá ser evaluado por expertos sobre la base de la experiencia en hombres y animales (por ejemplo, estudios de administración continuada realizados con concentraciones no corrosivas/irritantes), los datos *in vitro* existentes [consúltense los capítulos B.40 (5) y B.40 bis (6) del presente anexo o las TG 435 de la OCDE (7)], los valores de pH, la información acerca de sustancias afines o cualquier otro dato pertinente. En caso de necesidades normativas específicas (por ejemplo, a los fines de planificar actuaciones de urgencia), se podrá aplicar el presente método de ensayo para exponer animales a los productos mencionados, por cuanto permite al investigador principal o al director del estudio un control sobre la selección de las concentraciones de exposición. Ahora bien, las concentraciones previstas no deberán provocar efectos de irritación/corrosión graves, pero sí suficientes para ampliar la curva de concentración-respuesta a un intervalo que cubra el objetivo normativo y científico del ensayo. Estas concentraciones se seleccionarán según cada caso y se justificará debidamente la selección [véase el GD 39 (2)].

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Este método de ensayo B.2 revisado se ha concebido para obtener una información acerca de la toxicidad aguda de la sustancia problema suficiente para permitir su clasificación, así como los datos de letalidad (por ejemplo, CL₅₀, CL₀₁ y pendiente) de uno o ambos sexos que se precisen para la evaluación cuantitativa del riesgo. El presente método de ensayo consta de dos métodos. El primer método es un protocolo tradicional en el que varios grupos de animales se exponen a una concentración límite (ensayo límite) o a una serie de concentraciones progresivas durante un período predeterminado que suele ser de 4 horas. Pueden aplicarse otros tiempos de exposición con fines normativos específicos. El segundo método es un protocolo de C × t en el que los grupos de animales se exponen a una sola concentración (límite) o a una serie de concentraciones durante diferentes períodos.
8. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva y en la interpretación del resultado serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (*Guidance Document on Humane Endpoints*) (8) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

9. Hay que usar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie recomendada es la rata y, en caso de usar otra especie, se justificará debidamente.

Preparación de los animales

10. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la exposición, los animales serán adultos jóvenes de 8 a 12 semanas de edad y la diferencia máxima de su peso corporal respecto del peso medio de su sexo calculado en animales previamente expuestos de la misma edad y sexo será del ± 20 %. Los animales se seleccionan al azar y se marcan para permitir su identificación individual. Se mantienen en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio. Deberán también aclimatarse al equipo del ensayo durante un breve período preliminar, para así reducir el estrés provocado por la introducción en un entorno nuevo.

Zootecnia

11. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por grupos de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario aclimatar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales de forma indebida tensiones físicas, térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos

generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre por el pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad.

Cámaras de inhalación

12. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo por la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzar mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el GD 39 (2) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y de solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Administración de las concentraciones

13. Las exposiciones solo por la nariz en las ratas pueden tener cualquier duración hasta un máximo de 6 horas. En los ratones, las exposiciones solo por la nariz no deben sobrepasar en principio las 4 horas. Si se requieren tiempos experimentales más prolongados deberán justificarse [véase el GD 39 (2)]. Los animales expuestos a aerosoles en cámaras de cuerpo entero se enjaularán de manera individual para evitar la ingestión de la sustancia problema debido a las conductas de limpieza de los compañeros de jaula. Se suprimirá la alimentación durante el período de exposición. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.
14. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. El estado físico que debe utilizarse dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de la concentración seleccionada y/o de la forma física más probable que adoptará la sustancia problema durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas.

Granulometría

15. Se controlará la granulometría de todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 4 μm , con una desviación típica geométrica (σ_g) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (2) (9) (10). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Por ejemplo, los humos metálicos pueden tener un diámetro de partícula menor, mientras que las partículas con carga, las fibras y las sustancias higroscópicas (que aumentan de tamaño en el medio húmedo de las vías respiratorias) pueden sobrepasar este límite de referencia.

Preparación de la sustancia problema en un vehículo

16. Se puede recurrir a un vehículo para crear una concentración y un tamaño de partícula adecuados de la sustancia problema en la atmósfera. Por regla general se dará preferencia al agua. El material particulado se puede someter a tratamientos mecánicos para obtener la granulometría deseada, pero procurando no descomponer ni alterar la sustancia problema. Cuando se considere que los procesos mecánicos pueden haber alterado la composición de la sustancia problema (por ejemplo, las temperaturas extremas de una fricción excesiva por un proceso de trituración), esta se verificará analíticamente. Se pondrá especial atención para no contaminar la sustancia problema. No es necesario analizar compuestos granulados no friables que han sido intencionadamente formulados como no inhalables. Se recurrirá a una prueba de desgaste para demostrar que no se generan partículas respirables durante la manipulación del material granulado. Si en la prueba de desgaste se generan sustancias respirables, habrá que efectuar un ensayo de toxicidad por inhalación.

Animales de control

17. No es necesario emplear un grupo de control negativo (con aire) en paralelo. Si se usa un vehículo distinto del agua para generar la atmósfera experimental, solo será necesario recurrir a un grupo de control del vehículo cuando no se disponga de datos anteriores de toxicidad por inhalación. Si un ensayo de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada; por lo tanto, no hay necesidad de controlar el vehículo.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Caudal de aire de la cámara

18. El caudal de aire de la cámara se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión de la concentración (o estabilidad) atmosférica del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de interés en la generación de una atmósfera. Se pondrá especial

atención para evitar la reinspiración en las cámaras de exposición solo por la nariz en aquellos casos en los que el caudal de aire a través del sistema de exposición sea insuficiente para crear un flujo continuo del medio atmosférico problema. Se han prescrito metodologías capaces de demostrar que no tiene lugar la reinspiración en las condiciones operativas establecidas (2) (11). La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no se van a conseguir estos valores de referencia, habrá que determinar las concentraciones de ambos gases.

Temperatura y humedad relativa de la cámara

19. La temperatura de la cámara se mantendrá en 22 ± 3 °C. La humedad relativa en la zona de respiración de los animales, cuando se trate de exposiciones de solo por la nariz y de cuerpo entero, se supervisará y registrará al menos tres veces en operaciones de hasta 4 horas, y cada hora en operaciones más cortas. La humedad relativa debe mantenerse idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia problema en el método de ensayo).

Sustancia problema: concentración nominal

20. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en esta generación.

Sustancia problema: concentración real

21. La concentración real es la concentración de sustancia problema presente en la zona de respiración de los animales en una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior caracterización analítica) o con métodos inespecíficos como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia problema. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material en el aire es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, el aire) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trate de productos en forma de aerosol capaces de evaporarse o sublimarse, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases. En el informe del estudio se harán constar las concentraciones diana, nominales y reales, pero en los análisis estadísticos destinados a calcular los valores de concentración letal se emplean solo las concentraciones reales.

22. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema, y la muestra de ensayo se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia problema consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa bajo el pico, peso molecular determinado mediante espectroscopía de masas o cromatografía de gases u otras determinaciones. Aunque la identidad de la muestra problema no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).

23. La atmósfera de exposición se mantendrá constante en la medida de lo posible y bajo supervisión continua y/o intermitente, dependiendo del método analítico. Si la técnica de muestreo es intermitente, habrá que tomar muestras de la atmósfera de la cámara por lo menos dos veces en un ensayo de cuatro horas. De no ser esto posible por darse concentraciones bajas o un caudal de aire limitado, se podrá tomar una sola muestra en todo el período de exposición. Si se producen fluctuaciones importantes de una muestra a otra, para analizar las siguientes concentraciones se tomarán cuatro muestras por exposición. Las concentraciones individuales de la cámara no deben desviarse de la concentración media en más de ± 10 % cuando se trata de gases y vapores, y en más de ± 20 % en caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y registrará el tiempo de equilibrado de la cámara (t_{95}). La duración de cualquier exposición abarca el tiempo que tarda en generarse la sustancia problema, y tiene en cuenta el tiempo necesario para alcanzar t_{95} . En el documento de orientación GD 39 (2) se ofrecen indicaciones para el cálculo de t_{95} .

24. Cuando se manejen mezclas muy complejas de gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos de uso final con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación, de modo que se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente la sustancia activa principal de la mezcla, para cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla y no solo de la sustancia o el componente activo (analito). En el documento de orientación GD nº 39 (2) se ofrece más información acerca de las concentraciones reales.

Sustancia problema: granulometría

25. La granulometría de los aerosoles se determinará al menos dos veces por cada período de exposición de 4 horas, empleando un impactador de cascada o un aparato alternativo como un medidor del tamaño aerodinámico de partícula. Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de impacto, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis granulométrico tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración de masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase GD 39 (2)]. Si es posible demostrar su equivalencia en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir la exposición. Se controlará el tamaño de partícula en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases (véase el punto 15).

PROCEDIMIENTO

26. A continuación se describen dos tipos de estudios: el protocolo tradicional y el protocolo de $C \times t$. Ambos protocolos pueden englobar un estudio preliminar, un estudio principal y/o un ensayo límite (protocolo tradicional) o de concentración límite ($C \times t$). Cuando se sabe que uno de los sexos presenta mayor sensibilidad, el director del estudio podrá decidir que los ensayos se realicen solo en este. Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Antes de comenzar el ensayo, se tomarán en consideración todos los datos disponibles para minimizar el uso de animales. Así, los datos a los que se refiere el capítulo B.52 del presente anexo (4) pueden obviar la necesidad de hacer un estudio preliminar, como también demostrar la mayor sensibilidad de uno de los sexos [véase GD 39 (2)].

PROTOCOLO TRADICIONAL**Consideraciones generales: protocolo tradicional**

27. En un estudio tradicional, se exponen lotes de animales a una sustancia problema durante un período establecido (generalmente 4 horas) en una cámara de exposición solo por la nariz o de cuerpo entero. Los animales se exponen a una concentración límite (ensayo límite) o bien a un mínimo de tres concentraciones progresivas (estudio principal). Puede realizarse un estudio preliminar antes del estudio principal, salvo que se disponga de alguna información acerca de la sustancia problema, como un estudio efectuado antes siguiendo el método del capítulo B.52 [véase GD 39 (2)].

Estudio preliminar: protocolo tradicional

28. Se recurre al estudio preliminar para calcular la potencia de la sustancia problema, identificar las diferencias de sensibilidad en función del sexo y seleccionar los niveles de exposición que se aplicarán en el estudio principal o en el ensayo límite. Para seleccionar los niveles de concentración que se aplicarán en el estudio preliminar se recurrirá a toda la información disponible, incluidos datos de (Q)SAR y los datos de sustancias afines a la estudiada. A cada concentración no se expondrán más de tres machos y tres hembras (suele ser el mínimo necesario para establecer una diferencia en función del sexo). El estudio preliminar puede versar sobre una sola concentración, pero en caso necesario se pueden analizar más concentraciones. Un estudio preliminar nunca comportará un número de animales y de concentraciones tan elevado como un estudio principal. El estudio preliminar puede sustituirse por un estudio B.52 (4) previamente realizado [véase GD 39 (2)].

Ensayo límite: protocolo tradicional

29. El ensayo límite se practica cuando se sabe o supone que la sustancia problema es prácticamente atóxica, es decir, que induce una respuesta tóxica solo cuando supera la concentración límite normativa. En un ensayo límite, un único lote compuesto por tres machos y tres hembras es expuesto a la sustancia problema a una concentración límite. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre compuestos afines teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se dispone de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en que se prevé que esta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal.
30. La selección de las concentraciones límite depende generalmente de los requisitos normativos. En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente (o la concentración máxima alcanzable) (3). Puede resultar técnicamente complicado generar concentraciones límite de algunas sustancias problema, especialmente de vapores y aerosoles. Cuando se analicen aerosoles, el objetivo principal será obtener un tamaño de partícula respirable (MMAD de 1-4 µm). Este se consigue a una concentración de 2 mg/l para la mayoría de las sustancias problema. El estudio de aerosoles a concentraciones mayores de 2 mg/l solo se emprenderá si se puede obtener un tamaño de partícula respirable [véase GD 39 (2)]. El Reglamento (CE) nº 1272/2008 desaconseja los estudios que superen las concentraciones límite por razones de bienestar animal (3). El estudio de la concentración límite solo se contemplará cuando haya muchas probabilidades de que sus resultados vayan a incidir directamente en la protección de la salud humana (3), lo cual deberá justificarse en el informe del estudio. Cuando se trate de sustancias problema potencialmente explosivas, se procurará evitar las condiciones favorables a una explosión. A fin de evitar el uso innecesario de animales, se hará una operación de prueba sin animales antes del ensayo límite, para confirmar que se pueden crear en la cámara las condiciones adecuadas para dicho ensayo límite.

31. Si con la concentración límite se encuentran animales muertos o moribundos, los resultados del ensayo límite pueden servir de estudio preliminar para nuevos ensayos con otras concentraciones (véase el estudio principal). Si las propiedades físicas o químicas de una sustancia problema hacen imposible obtener una concentración límite, se estudiará la concentración máxima alcanzable. Si con la concentración máxima alcanzable la letalidad es inferior al 50 %, no son necesarios nuevos estudios. En caso de no obtener una concentración límite, el informe del estudio deberá facilitar una explicación respaldada con datos. Si la concentración máxima alcanzable de un vapor no induce toxicidad, puede ser necesario generar la sustancia problema en forma de aerosol líquido.

Estudio principal: protocolo tradicional

32. El estudio principal se realiza típicamente con cinco machos y cinco hembras (o 5 animales del sexo más sensible, si se conoce) por nivel de concentración, aplicando como mínimo tres niveles de concentración. Deben emplearse niveles de concentración suficientes para obtener un análisis estadístico sólido. El intervalo de tiempo entre los grupos de exposición se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. La exposición de los animales al siguiente nivel de concentración se retrasará hasta tener una seguridad razonable de la supervivencia de los animales previamente estudiados. Ello permitirá al director del estudio ajustar la concentración diana a la que se expondrá el siguiente lote. Dada la dependencia de tecnologías sofisticadas, esto no siempre es factible en los estudios de inhalación, por lo que la exposición de los animales al siguiente nivel de concentración deberá basarse en la opinión científica y la experiencia previas. Consultese el documento de orientación GD 39 (2) cuando se estudien mezclas.

PROTOCOLO DE CONCENTRACIÓN × TIEMPO (C × T)

Consideraciones generales: protocolo de C × t

33. El estudio de C × t en progresión secuencial representa una alternativa al protocolo tradicional en los ensayos de toxicidad por inhalación (12) (13) (14). Con este método los animales se pueden exponer a distintas concentraciones de una sustancia problema durante períodos variables. La totalidad del estudio tiene lugar en una cámara de exposición solo por la nariz (las cámaras de cuerpo entero no resultan prácticas en este tipo de estudios). El protocolo se ilustra en un diagrama de flujo del apéndice 1. Un análisis de simulación ha demostrado que tanto el protocolo tradicional como el de C × t son capaces de rendir valores de CL₅₀ sólidos, pero que el protocolo de C × t proporciona en general valores más sólidos de CL₀₁ y de CL₁₀ (15).
34. Un análisis de simulación ha demostrado que el uso de dos animales por intervalo de C × t (uno de cada sexo, o bien dos del sexo más sensible) es en general adecuado cuando se analizan 4 niveles de concentración y 5 tiempos de exposición en un estudio principal. En algunas circunstancias, el director del estudio puede decidir el empleo de dos ratas por sexo y por intervalo de C × t (15). El empleo de 2 animales por sexo y por valor de concentración y tiempo puede reducir el sesgo y la variabilidad de los valores estimados, aumentar el porcentaje de éxito de la estimación y mejorar el intervalo de confianza. No obstante, si el ajuste de los datos para la estimación es insuficiente (cuando se usa un animal de cada sexo o dos animales del sexo más sensible), puede bastar con agregar un quinto nivel de exposición. En GD 39 (2) se ofrecen más orientaciones sobre el número de animales y las concentraciones que deben aplicarse en un estudio de C × t.

Estudio preliminar: protocolo de C × t

35. Se hace un estudio preliminar para estimar la potencia de la sustancia problema y seleccionar los niveles de exposición que se aplicarán en el estudio principal. Pueden tener que usarse hasta tres animales por sexo y concentración en el estudio preliminar [consultense los detalles en el apéndice III del documento de orientación GD 39 (2)] para determinar la concentración inicial adecuada del estudio principal y reducir al mínimo el número de animales utilizados. Para establecer diferencias en función del sexo puede ser necesario emplear tres animales por sexo. Estos animales deberán someterse a una exposición única, por lo general de 240 minutos. La capacidad de generar una atmósfera experimental adecuada se establecerá en pruebas técnicas previas realizadas sin animales. Por lo regular, no será necesario realizar un estudio preliminar cuando existan datos de mortalidad obtenidos de un estudio previo según el capítulo B.52 (4). Al seleccionar la concentración diana inicial en un estudio B.2, el director del estudio tendrá en cuenta las pautas de mortalidad observadas en los estudios B.52 (4) previos, en relación con los sexos y con todas las concentraciones estudiadas [véase GD 39 (2)].

Concentración inicial: protocolo de C × t

36. La concentración inicial (sesión de exposición I) (apéndice 1) será una concentración límite o bien una concentración seleccionada por el director del estudio sobre la base de un estudio preliminar. Lotes de 1 animal/sexo se exponen a esta concentración durante diferentes períodos (por ejemplo, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos), hasta sumar un total de 10 animales (es lo que llamamos sesión de exposición I) (apéndice 1).
37. La selección de las concentraciones límite depende generalmente de los requisitos normativos. En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente (o la concentración máxima alcanzable) (3). Puede resultar técnicamente complicado generar concentraciones límite de algunas sustancias problema, especialmente de vapores y aerosoles. Cuando se analicen aerosoles, el objetivo principal será obtener un tamaño de partícula respirable (es decir, un MMAD de 1-4 µm) a una concentración límite de 2 mg/l. Esto se consigue con la mayoría de las sustancias problema. El estudio de aerosoles a concentraciones mayores de 2 mg/l solo se emprenderá si se puede obtener un tamaño de partícula respirable [véase GD 39 (2)]. El Reglamento (CE) nº 1272/2008 desaconseja los estudios que superen la concentración límite por razones de bienestar animal (3). Los estudios que superen la concentración límite solo se contemplarán cuando haya muchas probabilidades de que sus resultados vayan a incidir

directamente en la protección de la salud humana (3), lo cual deberá justificarse en el informe del estudio. Cuando se trate de sustancias problema potencialmente explosivas, se procurará evitar las condiciones favorables a una explosión. A fin de evitar el uso innecesario de animales, se hará una operación de prueba sin animales antes de comenzar el estudio a la concentración inicial, para confirmar que se crean en la cámara las condiciones adecuadas a esa concentración.

38. Si con la concentración inicial se encuentran animales muertos o moribundos, los resultados obtenidos con esta concentración pueden servir como punto de partida para nuevos ensayos con otras concentraciones (véase el estudio principal). Si las propiedades físicas o químicas de una sustancia problema hacen imposible obtener una concentración límite, se estudiará la concentración máxima alcanzable. Si con la concentración máxima alcanzable la letalidad es inferior al 50 %, no son necesarios nuevos estudios. En caso de no poder obtener una concentración límite, el informe del estudio deberá facilitar una explicación respaldada con datos. Si la concentración máxima alcanzable de un vapor no induce toxicidad, puede ser necesario generar la sustancia problema en forma de aerosol líquido.

Estudio principal: protocolo de C × t

39. La concentración inicial (sesión de exposición I) (apéndice 1) analizada en el estudio principal será una concentración límite o bien una concentración seleccionada por el director del estudio sobre la base de un estudio preliminar. Si en el transcurso o después de la sesión de exposición I se observa mortalidad, la exposición mínima ($C \times t$) que genere mortalidad se tomará como guía para establecer la concentración y los tiempos de la sesión de exposición II. Cada sesión de exposición sucesiva dependerá de la sesión anterior (véase el apéndice 1).
40. En el caso de muchas sustancias problema, los resultados obtenidos con la concentración inicial, unidos a los de otras tres sesiones de exposición con un cuadrulado temporal más denso (es decir, el espaciado geométrico de los períodos de exposición, indicado por el factor entre los períodos sucesivos, generalmente $\sqrt{2}$), serán suficientes para establecer la relación de mortalidad $C \times t$ (15); sin embargo, puede resultar conveniente agregar un quinto nivel de exposición [véanse el apéndice 1 y el documento de orientación GD 39 (2)]. En el apéndice 1 se describe el tratamiento matemático de los resultados del protocolo $C \times t$.

OBSERVACIONES

41. Los animales se someterán a observación clínica frecuente durante el período de exposición. Las observaciones clínicas se llevarán a cabo al menos dos veces el día de la exposición, o más frecuentemente si lo indica la respuesta de los animales al tratamiento, y en lo sucesivo al menos una vez al día durante un período total de 14 días. La duración del período de observación no es fija, antes bien deberá determinarse en función de la naturaleza y del tiempo de aparición de los signos clínicos y de la longitud del período de recuperación. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de tales signos de toxicidad. Todas las observaciones se anotarán sistemáticamente en los registros individuales abiertos para cada animal. Por razones de bienestar animal, los animales moribundos o que den muestras de dolor fuerte o signos de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva. En el momento de explorar los signos clínicos de toxicidad, se procurará que el mal aspecto inicial y los trastornos respiratorios transitorios, eventualmente derivados del procedimiento de exposición, no se confundan con signos de toxicidad química que obligarían al sacrificio prematuro de los animales. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el *Guidance Document on Humane Endpoints* (GD 19) (7). Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.
42. Las observaciones en la jaula deberían incluir los cambios en la piel y el pelo, ojos y membranas mucosas, y también los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Cuando sea posible se anotarán las eventuales diferencias entre los efectos locales y los sistémicos. Debe prestarse especial atención a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipohipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento.

Pesos corporales

43. Los pesos corporales individuales se registrarán una vez durante el período de aclimatación, en el día previo a la exposición (día 0), y al menos en los días 1, 3 y 7 (y, en lo sucesivo, semanalmente) y en el momento de la muerte o de la eutanasia si se produce después del día 1. Se acepta que el peso corporal es un indicador crítico de la toxicidad, por lo que deberán vigilarse estrechamente los animales que muestren una reducción progresiva de peso $\geq 20\%$ en comparación con los valores preliminares. Los animales supervivientes se pesan y se sacrifican de forma compasiva al final del período de post-exposición.

Anatomía patológica

44. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminan del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a autopsia macroscópica. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de descubrir la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a temperaturas suficientemente bajas para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatomo-patológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención en las alteraciones de las vías respiratorias.

45. Se podrán contemplar otras exploraciones incluidas de antemano en el diseño para ampliar el valor interpretativo del estudio, como la medida del peso pulmonar de las ratas que sobrevivan o el examen microscópico de las vías respiratorias para aportar pruebas de irritación. La exploración de órganos puede extenderse a aquellos que muestren signos de anatopatología macroscópica en los animales que sobreviven 24 o más horas y a los órganos que se saben o suponen afectados. El examen microscópico de la totalidad de las vías respiratorias puede proporcionar información útil en el caso de sustancias problema que son reactivas con el agua, como las de naturaleza ácida o higroscópica.

DATOS E INFORME

Datos

46. Se documentarán por separado los datos de peso corporal y los resultados de la autopsia de cada animal. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y su reversibilidad, y los resultados de la autopsia.

Informe del ensayo

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

Animales de experimentación y zootecnia

- Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.
- Especie o variedad empleada y justificación para el uso de una especie distinta de la rata.
- Número, edad y sexo de los animales.
- Método de aleatorización.
- Detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo/origen de la alimentación y el origen del agua).
- Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

Sustancia problema

- Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).
- Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

Vehículo

- Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).
- Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

Cámara de inhalación

- Descripción de la cámara de inhalación, incluidos las dimensiones y el volumen.
- Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.
- Equipo empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.

- Fuente de aire, tratamiento del aire suministrado/extraído y sistema de acondicionamiento.
- Métodos de calibración del equipo para garantizar una atmósfera experimental homogénea.
- Diferencia de presión (positiva o negativa).
- Puertos de exposición por cámara (solo por la nariz); ubicación de los animales en el sistema (de cuerpo entero).
- Homogeneidad/estabilidad temporal de la atmósfera experimental.
- Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.
- Caudales de aire, caudal del aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).
- Descripción del equipo empleado para medir el oxígeno y el dióxido de carbono, si procede.
- Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (t_{95}) en la cámara de inhalación.
- Número de variaciones de volumen por hora.
- Dispositivos de dosificación (si procede).

Datos relativos a la exposición

- Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.
- Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).
- Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que den lugar a estados físicos heterogéneos (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada uno de ellos por separado.
- Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (por ejemplo, mg/l, mg/m³, etc.); se podrán indicar además las unidades de volumen (por ejemplo, ppm, ppmm, etc.) entre paréntesis.
- Granulometría, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica (σ_g), incluidos los correspondientes métodos de cálculo; se documentarán los análisis granulométricos individuales.

Condiciones del ensayo

- Descripción pormenorizada de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de las materias sólidas o preparar soluciones de la sustancia problema; cuando exista la posibilidad de que los procesos mecánicos hayan alterado la composición de la sustancia problema, se incluirán los resultados de los análisis realizados para verificar dicha composición.
- Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.
- Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficacia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).
- Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

Resultados

- Tabulación de los valores de temperatura, humedad y caudal de aire de la cámara.
- Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.
- Tabulación de los datos de tamaño de partícula, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, granulometría y cálculos de MMAD y σ_g .
- Tabulación de las respuestas y de los niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad, momento de aparición y duración de los efectos).
- Pesos corporales de cada animal registrados en el estudio; fecha y hora de la muerte si se produce antes de la eutanasia programada; cronología de la aparición de los signos de toxicidad e indicación de si estos son reversibles en cada animal.
- Resultados de la autopsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.
- Estimaciones de la letalidad (por ejemplo, CL_{50} , DL_{01}), incluidos los límites de confianza del 95 % y la pendiente (si lo permite el método de evaluación).
- Relación estadística, incluida la estimación del exponente n (protocolo de $C \times t$); se indicará el nombre del paquete informático.

Evaluación e interpretación de los resultados

- Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para cumplir los criterios del presente método de ensayo, esto es, la concentración límite o el tamaño de partícula.
- Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplen los criterios relativos al tamaño de partícula.
- Se facilitará una explicación de si ha sido preciso sacrificar de forma compasiva animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (*Guidance Document on Humane Endpoints*) (8).
- Cuando se haya interrumpido algún estudio conforme al protocolo descrito en el capítulo B.52 del presente anexo (4) para reemplazarlo por el presente método de ensayo B.2, se harán las justificaciones pertinentes.
- En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.
- Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (3) Reglamento CE nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).
- (4) Capítulo B.52 del presente anexo. Toxicidad aguda por inhalación. Método de las clases de toxicidad aguda.

- (5) Capítulo B.40 del presente anexo. Corrosión cutánea *in vitro*: Ensayo de Resistencia eléctrica transcutánea (REI).
- (6) Capítulo B.40bis del presente anexo. Corrosión cutánea *in vitro*: Ensayo con modelo de piel humana.
- (7) OECD (2005), *In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (8) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321-327.
- (10) Phalen RF (2009). *Inhalation Studies: Foundations and Techniques*. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
- (11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160-167.
- (12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15: 278-290.
- (13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2: 105-117.
- (14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21: 65-71.
- (15) OECD (2009). *Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- (16) Finney DJ (1977). *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINICIÓN

Sustancia problema: Toda sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

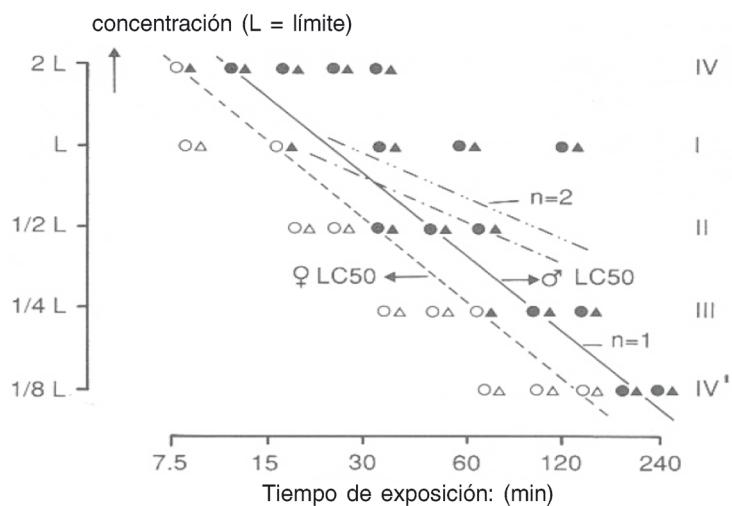
Apéndice 1

Protocolo de C × t

1. El estudio de concentración × tiempo (C × t) en progresión secuencial representa una alternativa al protocolo tradicional en los ensayos de toxicidad por inhalación (12) (13) (14). Se usará preferentemente cuando exista una necesidad científica o normativa específica que imponga la investigación con animales en diferentes períodos, como es el caso de la planificación de actuaciones de urgencia o del uso del suelo. El protocolo suele comenzar con el estudio de una concentración límite (sesión de exposición I), en el que se exponen los animales a la sustancia problema durante cinco intervalos de tiempo (por ejemplo, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos), de modo que dentro de una sesión se investigan distintos tiempos de exposición (véase la figura 1). En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente. Estas concentraciones solo podrán rebasarse cuando exista una necesidad científica o normativa que así lo indique (véase el punto 37 del texto principal de B.2).
2. En los casos en que exista poca o nula información sobre la toxicidad de una sustancia problema se realizará un estudio preliminar, en el que grupos de no más de 3 animales de cada sexo se expondrán a las concentraciones diana seleccionadas por el director del estudio durante 240 minutos como norma general.
3. Si se analiza una concentración límite durante la sesión de exposición I y se observa una mortalidad inferior al 50 %, no hacen falta más ensayos. Si se plantea una necesidad científica o normativa de establecer una relación concentración/tiempo/respuesta a niveles más elevados que la concentración límite indicada, la siguiente exposición se establecerá a un nivel tal que suponga dos veces la concentración límite (es decir, 2L en la figura 1).
4. Si se observa toxicidad a la concentración límite, habrá que hacer nuevos ensayos (estudio principal). Estas exposiciones adicionales tendrán lugar, bien a concentraciones más bajas (en la figura 1: sesiones de exposición II, III o IV), bien a concentraciones más elevadas pero durante períodos más breves (en la figura 1: sesión de exposición IV), acortando los tiempos de exposición y los intervalos entre ellos.
5. El ensayo (de la concentración inicial y las adicionales) se lleva a cabo empleando 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo, o bien 2 animales del sexo más sensible por valor de concentración/tiempo. En algunas circunstancias, el director del estudio puede decidir el uso de 2 ratas por sexo y por valor de concentración/tiempo (o 4 animales del sexo más sensible por valor de concentración/tiempo) (15). El empleo de 2 animales por sexo y por valor de concentración/tiempo puede reducir el sesgo y la variabilidad de los cálculos, mejorar el porcentaje de éxito de la estimación y aumentar el intervalo de confianza en comparación con el protocolo que se describe aquí. Se ofrece más información en el documento de orientación GD 39 (2).
6. Lo ideal es que cada sesión de exposición se efectúe en un día. Esto concede la oportunidad de retrasar la siguiente exposición hasta obtener una seguridad razonable de la supervivencia, y permite al director del estudio ajustar la concentración diana y los tiempos de la siguiente sesión de exposición. Se recomienda iniciar cada sesión de exposición con el lote que va a estar expuesto más tiempo, es decir, comenzar con el lote de 240 minutos de exposición, seguido del lote de 120 minutos, y así sucesivamente. Si, por ejemplo, los animales del lote de 240 minutos mueren ya a los 90 minutos o muestran signos graves de toxicidad (por ejemplo, alteraciones importantes de la pauta de respiración, como dificultad al respirar), carece de sentido exponer otro lote a un tiempo de 120 minutos ya que la mortalidad será probablemente del 100 %. De modo que el director del estudio seleccionará tiempos de exposición más breves para esa concentración (por ejemplo, 90, 65, 45, 33 y 25 minutos).
7. La concentración de la cámara se medirá con frecuencia para determinar la concentración media ponderada de cada período de exposición. Siempre que sea posible, se tomará para el análisis estadístico el momento de la muerte de cada animal (mejor que la duración de la exposición).
8. Los resultados de las cuatro primeras sesiones de exposición se analizarán con objeto de detectar lagunas en los datos de la curva de concentración-tiempo (véase la figura 1). En caso de ajuste insuficiente, se podrá proceder a una nueva exposición (5^a concentración). En ella, la concentración y los períodos de exposición se elegirán para cubrir la laguna detectada.
9. Se tomarán todas las sesiones de exposición (incluida la primera) para calcular la relación concentración-tiempo-respuesta aplicando el análisis estadístico (16). En la medida de lo posible, por cada intervalo de C × t se tomarán la concentración media ponderada en función del tiempo y la duración de la exposición hasta el momento de la muerte (si esta se produce durante la exposición).

Figura 1

Ilustración hipotética de la relación concentración-tiempo-mortalidad en la rata



Símbolos huecos = animales supervivientes; símbolos macizos = animales muertos

Triángulos = hembras; círculos = machos

Línea continua = valores de CL_{50} (intervalo de 7,5-240 min) de los machos, $n = 1$

Línea de trazos = valores de CL_{50} (intervalo de 7,5-240 min) de las hembras, $n = 1$

Líneas de puntos = valores hipotéticos de CL_{50} de machos y hembras, bajo el supuesto de n igual a 2 (12).

Glosario

Concentración:

Tiempo de exposición:

10. A continuación se expone un ejemplo de progresión secuencial:

Sesión de exposición I — Estudio realizado a la concentración límite (figura 1)

- 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total ^(a)
- Concentración diana ^(b) = concentración límite.
- Se exponen cinco lotes de animales a esta concentración diana durante períodos de 15, 30, 60, 120 y 240 minutos, respectivamente.

↓

Sesión de exposición II ^(c) — Estudio principal

- 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

^(a) Si no se dispone de datos de sensibilidad en función del sexo, se usarán ratas de ambos性os, es decir, 1 animal por sexo y por concentración. De existir información previa, o si se pone de manifiesto en esta sesión de exposición que uno de los性os es más sensible, en los siguientes ensayos se someterán 10 animales del sexo sensible (2 por cada valor de concentración/tiempo) a cada nivel de concentración.

^(b) En virtud del Reglamento (CE) n° 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente. Si cabe esperar toxicidad o así lo indican los resultados del estudio preliminar, se seleccionarán concentraciones iniciales más bajas. Por necesidades científicas o normativas se podrán aplicar concentraciones más elevadas.

^(c) Idealmente, la exposición de los animales al siguiente nivel de concentración se retrasará hasta tener una seguridad razonable de la supervivencia de los animales previamente tratados. Ello permitirá al director del estudio ajustar la concentración diana y los tiempos de la siguiente sesión de exposición.

- Se exponen cinco lotes de animales a una concentración inferior ^(d) (1/2L) con tiempos de exposición algo más largos (espaciado de factor $\sqrt{2}$; véase la figura 1).

↓

Sesión de exposición III — Estudio principal

- 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

- Se exponen cinco lotes de animales a una concentración inferior ^(d) (1/4L) con tiempos de exposición algo más largos (espaciado de factor $\sqrt{2}$; véase la figura 1).

↓

Sesión de exposición IV' — Estudio principal

- 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

- Se exponen cinco lotes de animales a una concentración inferior ^(d) (1/8L) con tiempos de exposición algo más largos (espaciado de factor $\sqrt{2}$; véase la figura 1).

↓ o

Sesión de exposición IV — Estudio principal

- 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

- Se exponen cinco lotes de animales a una concentración superior ^(e) (2L) con tiempos de exposición algo más cortos (espaciado de factor $\sqrt{2}$; véase la figura 1).

Tratamiento matemático de los resultados obtenidos con el protocolo de C × t

11. Un estudio de C × t con 4 o 5 concentraciones y cinco períodos de exposición rendirá, respectivamente 20 o 25 puntos de datos. A partir de estos puntos de datos se puede calcular la relación C × t aplicando el análisis estadístico (16):

Ecuación 1:

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

donde C = concentración; t = período de exposición, o

Ecuación 2:

$$\text{Respuesta} = f(C^n t)$$

donde $n = b_1/b_2$.

Aplicando la ecuación 1, se puede calcular el valor de CL₅₀ para un período dado (por ejemplo, 4 horas, 1 hora, 30 minutos o cualquier período dentro del intervalo de períodos estudiados) haciendo P = 5 (50 % de respuesta). Obsérvese que la regla de Haber solo es aplicable para n = 1. La CL₀₁ se puede calcular haciendo P = 2,67.

^(d) La dosis mínima (concentración × tiempo) capaz de inducir mortalidad en el estudio de la concentración inicial (primera sesión de exposición) se tomará como base para establecer la siguiente combinación de concentración y períodos de exposición. Habitualmente, la concentración se reduce a la mitad (1/2L) y los animales se exponen a un cuadriculado temporal más denso, aplicando una división geométrica de los períodos de exposición según un factor de 1,4 ($\sqrt{2}$; véase la referencia 11) en torno al tiempo que corresponde a la dosis letal mínima (tiempo × concentración) observada en la primera sesión de exposición. Según la figura 1, en la sesión de exposición I se observó mortalidad por primera vez a los 15 minutos; los tiempos aplicados durante la sesión II, por tanto, se centrarán en torno a los 30 minutos, y serán de 15, 21, 30, 42 y 60 min. Después de las dos primeras exposiciones, resulta muy aconsejable proyectar los resultados en una gráfica semejante a la indicada más arriba, y comprobar si la relación entre concentración y tiempo presenta un ángulo de 45 grados (n = 1), o si la relación concentración-tiempo-respuesta es de pendiente menos pronunciada (por ejemplo, n = 2) o más pronunciada (por ejemplo, n = 0,8). En los dos últimos casos se recomienda encarecidamente adaptar en consecuencia los siguientes valores de concentración y tiempo aplicados.

^(e) En determinados casos puede ser necesario aumentar la concentración (2L) y aplicar un cuadriculado temporal aún más denso, haciendo una división geométrica de los períodos de exposición por un factor de 1,4 ($\sqrt{2}$) en torno al tiempo que corresponde a la concentración letal mínima observada en la primera exposición. El período mínimo de exposición rebasará preferiblemente los 5 minutos; el período máximo de exposición no debe superar las 8 horas.»

- 4) Los capítulos B.7 y B.8 se sustituyen por el texto siguiente:

«B.7. TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) EN ROEDORES

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 407 de la OCDE (2008). Las directrices de ensayo 407 originales se adoptaron en 1981. En 1995 se adoptó una versión revisada con objeto de obtener nuevos datos de los animales empleados en el estudio, en particular en materia de neurotoxicidad e inmunotoxicidad.
2. En 1998, la OCDE promovió una actuación de alta prioridad orientada a revisar las directrices de ensayo existentes y desarrollar otras nuevas para la selección y evaluación de los alteradores endocrinos potenciales (8). Una faceta de esta actuación consistió en actualizar las directrices de la OCDE sobre "los estudios de toxicidad oral por administración continuada (28 días) en roedores" (TG 407), introduciendo parámetros adecuados para detectar la actividad endocrina de las sustancias problema. El procedimiento se sometió a un extenso programa internacional para evaluar la pertinencia y la practicabilidad de los parámetros añadidos, la funcionalidad de estos parámetros en relación con productos químicos dotados de actividad (anti)estrogénica, (anti)androgénica y (anti)tiroidea, la reproducibilidad intra- e interlaboratorios, y la interferencia entre los nuevos parámetros y los contemplados en las TG 407 anteriores. La ingente cantidad de datos así obtenidos se ha recopilado y evaluado minuciosamente en un exhaustivo informe de la OCDE (9). El presente método de ensayo B.7 actualizado (equivalente a las directrices TG 407) es el fruto de la experiencia y de los resultados derivados del programa de investigación internacional. Este método de ensayo permite poner en relación determinados efectos de mecanismo endocrino con otros efectos toxicológicos.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

3. Al determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia química, el estudio de la toxicidad oral por administración continuada puede estar indicado cuando los ensayos de toxicidad aguda hayan proporcionado información relativa a la toxicidad. El presente método de ensayo se propone investigar los efectos de toxicidad sobre una gran variedad de órganos o sistemas diana. Proporciona información acerca de los posibles riesgos para la salud derivados de la exposición continuada durante un período relativamente limitado, entre ellos los efectos sobre los sistemas nervioso, inmunitario y endocrino. En relación con estos criterios de valoración específicos, deberá identificar sustancias químicas con potencial neurotóxico que puedan justificar investigaciones futuras, o sustancias capaces de interferir en la fisiología de la glándula tiroides. También puede aportar datos sobre las sustancias químicas que afectan a los órganos reproductores masculinos o femeninos en los animales adultos jóvenes, o indicaciones sobre los efectos inmunológicos.
4. Los resultados de este método de ensayo B.7 se aplicarán a la identificación del peligro y a la evaluación del riesgo. Los resultados obtenidos por medio de parámetros endocrinos se valorarán en el "Marco teórico para el estudio y la evaluación de los alteradores endocrinos" (*Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) de la OCDE (11). El método describe el estudio básico de toxicidad por administración continuada que puede aplicarse en el caso de sustancias para las que no está justificado un estudio de 90 días (por ejemplo, cuando el volumen de producción no supera ciertos límites), o bien como ensayo preliminar de un estudio de toxicidad a largo plazo. La duración de la exposición será de 28 días.
5. El programa internacional de validación de los parámetros adecuados para detectar la actividad endocrina potencial de una sustancia química demostró que la calidad de los datos obtenidos mediante este método de ensayo B.7 depende en gran medida de la experiencia del laboratorio de ensayo. Esto se refiere específicamente a la determinación histopatológica de los cambios cíclicos que se producen en los órganos reproductores femeninos, así como de la determinación del peso de órganos con dependencia hormonal que son de pequeño tamaño y difícil disección. Se han puesto a punto unas directrices de histopatología (19), a las que se puede acceder a través de la página web pública de la OCDE, sobre líneas directrices. Con ella se pretende ayudar a los anatomiopatólogos en sus exploraciones y aumentar la sensibilidad del ensayo. Diversos parámetros han resultado ser indicadores de la toxicidad de mediación endocrina y se han incorporado al método de ensayo. Aquellos parámetros que, en el programa de validación, dieron lugar a datos insuficientes o poco significativos sobre su eficacia para ayudar a la detección de los alteradores endocrinos se proponen como criterios de valoración opcionales (véase el apéndice 2).
6. Atendiendo a los datos generados en el proceso de validación, conviene destacar que la sensibilidad del presente ensayo no es suficiente para identificar todas las sustancias con modo de acción (anti)androgénico o (anti)estrogénico (9). Este método de ensayo no se practica en la fase de la vida más sensible a la alteración endocrina. No obstante, en el proceso de validación el método de ensayo se mostró capaz de identificar sustancias que afectan débil o intensamente a la función tiroidea, así como sustancias con actividad endocrina intensa o moderada que actúan por medio de receptores estrogénicos o androgénicos, pero en la mayoría de los casos no consiguió identificar sustancias con actividad endocrina que influyen débilmente en los receptores estrogénicos o androgénicos. Por lo tanto, no podemos definirlo como un ensayo de cribado de la actividad endocrina.
7. Por consiguiente, el hecho de no detectar efectos relacionados con estos modos de acción no se puede interpretar como prueba de la ausencia de efectos sobre el sistema endocrino. Por lo que se refiere a los efectos de mecanismo endocrino, la caracterización de la sustancia no debe basarse exclusivamente en los resultados de este método de ensayo, sino que se sopesarán de las pruebas en relación con todos los datos existentes acerca de la sustancia química para caracterizar la actividad endocrina potencial. Por este motivo, toda decisión normativa acerca de la (o la caracterización de las sustancias con) actividad endocrina ha de tener un enfoque amplio, y no basarse solamente en los resultados de la aplicación del presente método de ensayo.

8. Se entiende que todos los procedimientos relacionados con los animales serán conformes a las normas locales de bienestar animal; las descripciones de cuidado y tratamiento que se facilitan a continuación constituyen requisitos de ejecución mínimos sobre los que prevalecerá la normativa local allí donde sea más estricta. La OCDE facilita también directrices sobre el tratamiento compasivo de los animales (14).
9. En el apéndice 1 se recogen las definiciones empleadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

10. La sustancia problema se administra diariamente por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una misma dosis por lote durante un período de 28 días. A lo largo del período de administración, se observa a los animales todos los días atentamente con el fin de descubrir la posible aparición de signos de toxicidad. Se practicará la autopsia de los animales que mueran o reciban la eutanasia durante el estudio, y cuando este concluya se procederá a la eutanasia y autopsia de los animales supervivientes. Un estudio de 28 días proporciona información sobre los efectos de la exposición oral continuada y permite determinar la necesidad de realizar nuevos estudios a largo plazo. También puede aportar datos para seleccionar las concentraciones que se aplicarán en los estudios más prolongados. Los datos derivados de este método de ensayo deben permitir una caracterización toxicológica de la sustancia problema que oriente sobre la relación dosis-respuesta y permita determinar la máxima concentración sin efectos adversos observados (NOAEL, No Observed Adverse Effect Level).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

11. La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Si los parámetros especificados en el presente método de ensayo B.7 se investigan en otra especie de roedor, habrá que justificarlo minuciosamente. Si bien es biológicamente posible que otras especies respondan a los agentes tóxicos de manera afín a la rata, el uso de especies de menor tamaño conlleva una variabilidad mayor, debido a las dificultades técnicas que plantea la disección de órganos más pequeños. En el programa internacional de validación de la detección de alteradores endocrinos, la única especie utilizada fue la rata. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. La administración ha de empezar lo antes posible tras el destete y, en cualquier caso, antes de que los animales tengan nueve semanas de edad. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo. Cuando se realice un estudio de toxicidad oral por administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad a largo plazo, es preferible que se utilicen en ambos estudios animales procedentes de la misma cepa y del mismo origen.

Alojamiento y alimentación de los animales

12. Todos los procedimientos serán conformes a las normas habituales del cuidado de los animales de laboratorio. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación debe ser artificial, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. Si la sustancia problema se administra con los alimentos, es preciso obtener una mezcla adecuada, lo cual puede influir en la elección de la dieta. Los animales se alojarán en pequeños grupos del mismo sexo; podrán alojarse individualmente si está científicamente justificado. En caso de que se utilicen jaulas colectivas, no habrá más de 5 animales en cada jaula.
13. Se analizará regularmente la comida para detectar posibles contaminantes. Se conservará una muestra de la dieta hasta el momento de concluir el informe.

Preparación de los animales

14. Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes de control. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos 5 días antes de empezar el tratamiento experimental para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

Preparación de las dosis

15. La sustancia problema se administra por sonda o con el alimento o el agua de bebida. El método de administración oral depende del objetivo del estudio y de las propiedades fisicoquímicas y toxicocinéticas de la sustancia problema.
16. En caso necesario, se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o suspensión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características toxicológicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia problema en el vehículo.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

17. Deben utilizarse por los menos 10 animales (cinco hembras y cinco machos) por cada dosis. Si está prevista la eutanasia de algunos animales durante el ensayo, debe aumentarse el número total en una cantidad igual a la que vaya a sufrir la eutanasia antes de terminar el estudio. Puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) en los grupos de control y de dosis más elevada para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición retardada de efectos tóxicos, al menos durante los 14 días siguientes al tratamiento.

Posología

18. Generalmente, se emplean al menos tres lotes tratados y uno de control; pero si, a partir de la evaluación de otros datos, no cabe esperar ningún efecto con la dosis de 1 000 mg/kg peso corporal/día, puede realizarse un ensayo límite. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio (con animales de la misma cepa y procedencia) para ayudar a determinar el intervalo de dosificación que debe emplearse. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben ser tratados de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia problema, el lote de control recibirá el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.
19. Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta la eventual toxicidad existente y los datos cinéticos o toxicocinéticos disponibles en relación con la sustancia problema o compuestos afines. La dosis más elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos pero sin llegar a la muerte ni a un sufrimiento intenso. A partir de ella, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis a fin de poner de manifiesto las posibles respuestas en función de la dosis; y como dosis más baja se escogerá la máxima dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 10) entre dosis.
20. Si se observan signos de toxicidad general (por ejemplo, peso corporal reducido, efectos hepáticos, cardíacos, pulmonares o renales, etc.) u otras alteraciones que no son necesariamente respuestas tóxicas (por ejemplo, ingesta de alimentos reducida, hiperplasia hepática), habrá que interpretar con prudencia los efectos observados sobre las variables inmunitarias, neurológicas o endocrinas.

Ensayo límite

21. Si, en un ensayo en el que se administra un solo nivel de dosis de al menos 1 000 mg/kg peso corporal/día o, en caso de administración en la comida o en el agua de bebida, en el que se alcanza una concentración equivalente en los alimentos o el agua de bebida (según las determinaciones del peso corporal) siguiendo los procedimientos descritos en el presente estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de datos de sustancias estructuralmente afines, no debiera esperarse la aparición de toxicidad, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

Administración de las dosis

22. Las dosis de la sustancia problema se administran diariamente a los animales, 7 días por semana, durante 28 días. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. Dicho volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.
23. En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren en la nutrición normal o el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (en ppm) o bien una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en relación con el peso corporal del animal. Si se realiza un estudio de administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, deberá utilizarse en ambos estudios una dieta similar.

Observaciones

24. El período de observación debe ser de 28 días. Deben mantenerse animales en un lote satélite previsto para las observaciones de seguimiento durante al menos 14 días sin tratamiento, a fin de detectar la aparición retardada, la persistencia o la recuperación de los efectos tóxicos.
25. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registrará el estado de salud de los animales. Se observarán todos los animales al menos dos veces el día para detectar posibles signos de morbilidad y mortalidad.

26. Todos los animales deben someterse a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto) y, después, a una por semana. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas y que las observaciones sean realizadas de preferencia por observadores ajenos al tratamiento. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila y respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (2).
27. En la cuarta semana de exposición se hará una evaluación de la reactividad sensorial frente a estímulos de diferente naturaleza (2) (estímulos auditivos, visuales y propioceptivos) (3) (4) (5), así como de la fuerza prensil (6) y de la actividad motriz (7). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.
28. Las observaciones funcionales de la cuarta semana de exposición pueden omitirse cuando el estudio se realice como fase preliminar de un estudio posterior sobre toxicidad subcrónica (de 90 días). En este caso, las observaciones funcionales deberán incluirse en este estudio de continuación. Por otra parte, la disponibilidad de datos sobre las observaciones funcionales en el estudio de administración continuada puede facilitar la selección de las dosis utilizadas en un estudio posterior sobre toxicidad subcrónica.
29. De forma excepcional, también pueden omitirse las observaciones funcionales en los lotes que muestren signos de toxicidad de otro tipo tales que interfieran significativamente con los resultados de las pruebas funcionales.
30. En la autopsia se podrá determinar (opcionalmente) el ciclo estral de todas las hembras tomando frotis vaginales. Estas observaciones permitirán establecer la fase del ciclo estral en el momento del sacrificio y serán de ayuda en la evaluación histológica de los tejidos sensibles a los estrógenos [véase el documento de orientación sobre histopatología (19)].

Peso corporal y consumo de alimentos y agua

31. Al menos una vez por semana se pesarán todos los animales y se calculará el consumo de alimentos. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, deberá medirse también el consumo de agua al menos semanalmente.

Hematología

32. Deben practicarse los siguientes exámenes hematológicos al final del período de ensayo: hematocrito, concentraciones de hemoglobina, recuento de eritrocitos y reticulocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida del tiempo o capacidad de coagulación sanguínea. Si se sabe o sospecha que la sustancia problema o sus metabolitos potenciales tienen propiedades oxidantes, habrá que determinar además las concentraciones de metahemoglobina y de cuerpos de Heinz.
33. Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado, justo antes de la eutanasia de los animales (o como parte del método de eutanasia), y conservarse en condiciones adecuadas. Los animales estarán en ayunas desde el día anterior a la eutanasia (1).

Bioquímica clínica

34. Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos y, especialmente, en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales justo antes de la eutanasia o como parte del método de eutanasia (aparte de los moribundos o sacrificados antes de que termine el ensayo). Los parámetros medidos en el plasma y el suero deben incluir las concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales y albúminas, al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamil-transpeptidasa, o glutamato-deshidrogenasa) y los ácidos biliares. La determinación de otras enzimas (de origen hepático o no) y de la bilirrubina puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias.
35. Pueden realizarse, con carácter facultativo, las siguientes determinaciones en la última semana del estudio utilizando la recogida programada de orina: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas.

(1) El ayuno desde la víspera es preferible para realizar ciertos análisis en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, el ayuno desde la víspera puede influir en el metabolismo general de los animales y, especialmente en los estudios en que la sustancia problema se administra con los alimentos, puede alterar la exposición diaria a dicha sustancia. Si se adopta el ayuno desde la víspera, deben realizarse análisis de bioquímica clínica después de la realización de las observaciones funcionales en la cuarta semana del estudio.

36. Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores plasmáticos o séricos de lesiones histológicas generales. Otras determinaciones que deben realizarse si se sabe o sospecha que las propiedades conocidas de la sustancia estudiada pueden afectar a las funciones metabólicas correspondientes incluyen las concentraciones de calcio, fosfato, triglicéridos, hormonas específicas y colinesterasa. Debe valorarse la necesidad de hacer estos análisis con las sustancias químicas de determinadas clases o bien según cada caso.
37. Aunque durante la evaluación internacional de los parámetros de tipo endocrino no se pudo demostrar una clara ventaja a favor de la determinación de las hormonas tiroideas (T3, T4) y de la TSH, cuando se observen indicios de algún efecto sobre el eje hipófiso-tiroideo puede ser de utilidad conservar muestras de plasma o suero para hacer valoraciones de T3, T4 y TSH (opcionales). Estas muestras se congelen a - 20 °C para su conservación. Distintos factores pueden influir en la variabilidad y en el valor absoluto de las concentraciones hormonales:
- el momento del sacrificio, debido a la variación diurna de las concentraciones hormonales,
 - el método de eutanasia, que se escogerá para evitar a los animales un sufrimiento indebido que pueda influir en las concentraciones hormonales,
 - los kits de análisis hormonal, que pueden presentar diferencias en sus curvas patrón.

El examen histopatológico es más fiable que el hormonal para llegar a una identificación definitiva de las sustancias químicas con actividad tiroidea.

38. Las muestras de plasma destinadas específicamente al análisis hormonal se obtendrán a la misma hora del día. Se recomienda contemplar la posibilidad de determinar los valores de T3, T4 y TSH basándose en las alteraciones histopatológicas del tiroides. Las cifras obtenidas al analizar concentraciones de hormonas varían con los kits comerciales que se usan para el análisis. En consecuencia, no siempre es posible establecer criterios de valoración basados en datos históricos uniformes. Por otro lado, los laboratorios procurarán mantener los coeficientes de variación por debajo de 25 en el caso de T3 y T4, y por debajo de 35 para la TSH. Todas las concentraciones se expresarán en ng/ml.
39. Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración o, preferiblemente, en un grupo de animales no incluidos en los lotes experimentales.

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Autopsia macroscópica

40. Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidídimo, próstata + vesículas seminales con las glándulas coagulantes en conjunto, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados antes de concluir el ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y pesarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. Al seccionar la próstata y sus anejos se procurará evitar la punción de las vesículas seminales llenas de líquido. Otra posibilidad es diseccionar y pesar las vesículas seminales y la próstata después de fijarlas.
41. Facultativamente, otros dos tejidos se pueden pesar lo antes posible tras la disección para evitar su desecación: los ovarios pareados (peso húmedo) y el útero y cuello del útero [se ofrecen orientaciones sobre la excisión y preparación de los tejidos uterinos para determinar su peso en las TG 440 de la OCDE (18)].
42. El peso de la glándula tiroides puede determinarse (opcionalmente) después de su fijación. Su excisión se hará también de manera cuidadosa y solo después de la fijación para evitar daños tisulares, que comprometerían los resultados del examen histopatológico.
43. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (véase el punto 47): todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia), médula espinal, ojos, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, timo, tiroides, tráquea y pulmones (conservados mediante inflado con fijador seguido de inmersión), gónadas (testículos y ovarios), órganos sexuales secundarios (útero y cuello, epidídimo, próstata + vesículas seminales y glándulas coagulantes), vagina, vejiga urinaria, ganglios linfáticos [además del ganglio más proximal debería obtenerse otro ganglio linfático, dependiendo de la experiencia del laboratorio (15)], nervios periféricos (ciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, músculo esquelético y hueso con la médula ósea (una sección o médula ósea aspirada y recién montada). Se recomienda fijar los testículos mediante inmersión en fijador de Bouin o de Davidson modificado (16) (17). Con una aguja se punciona suave y superficialmente la túnica albugínea por ambos polos del órgano para permitir la rápida penetración del fijador. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema.

44. Los siguientes tejidos pueden proporcionar valiosas indicaciones sobre los efectos de carácter endocrino: gónadas (ovarios y testículos), órganos sexuales secundarios (útero y cuello, epidídimo, vesículas y glándulas seminales, próstata dorsolateral y ventral), vagina, hipófisis, glándula mamaria de machos, tiroides y cápsula suprarrenal. Las alteraciones de las glándulas mamarias de machos no se han documentado suficientemente, pero este parámetro puede ser muy sensible a las sustancias dotadas de actividad estrogénica. La observación de los órganos y tejidos que no se recogen en el punto 43 es opcional (véase el apéndice 2).
45. El documento de orientación sobre histopatología (19) proporciona más información detallada acerca de la disección, fijación, sección e histopatología de los tejidos endocrinos.
46. En el programa internacional de investigación se obtuvieron indicios en el sentido de que es posible identificar los efectos endocrinos sutiles de sustancias que tienen escasa potencia para afectar a la homeostasis de las hormonas sexuales detectando trastornos en la sincronización del ciclo estral de diversos tejidos, antes que las alteraciones histopatológicas evidentes en los órganos sexuales femeninos. Si bien no se ha obtenido una prueba definitiva de tales efectos, se recomienda tener en cuenta los signos de posible asincronía del ciclo estral a la hora de interpretar la histopatología de los ovarios (células folículares, tecales y granulosas), el útero, el cuello y la vagina. Si se determina la fase del ciclo a partir de frotis vaginales, se podría incluir también en la comparación.

Examen histopatológico

47. Es preciso practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados de todos los animales del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote de control. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote con la dosis más elevada, estos exámenes se ampliarán a animales de todos los demás lotes tratados.
48. Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.
49. Si se utiliza un lote satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los grupos tratados.

RESULTADOS E INFORME

Resultados

50. Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión.
51. Siempre que sea posible, los resultados numéricos deberán evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La comparación de los efectos a lo largo de un intervalo de dosis evitaría el uso de múltiples pruebas t. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.
52. Por motivos de control de calidad, se propone recopilar los datos previos relativos a los controles y calcular coeficientes de variación de las variables numéricas, especialmente las relacionadas con la detección de alteradores endocrinos. Estos datos se pueden usar con fines de comparación al evaluar los estudios actuales.

Informe del ensayo

53. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

- Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.

- Datos de identificación.

Vehículo (si procede):

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

Animales sometidos a ensayo:

- Especie y cepa empleada.
- Número, edad y sexo de los animales.
- Procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- Peso de cada animal al inicio del ensayo.
- Justificación de la especie si es distinta de la rata.

Condiciones de ensayo:

- Justificación de la selección de las dosis.
- Datos sobre la formulación de la sustancia problema o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado.
- Datos de la administración de la sustancia problema.
- Factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede.
- Datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Parámetros opcionales

- Listado de parámetros opcionales

Resultados:

- Peso corporal y variaciones del mismo.
- Consumo de alimentos y de agua, si se ha medido.
- Datos de respuestas tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad.
- Naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no).
- Evaluación de la actividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motriz.
- Pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia.
- Pruebas bioquímicas con los correspondientes valores de referencia.
- Peso corporal en el momento de la eutanasia y datos sobre el peso de los órganos.
- Observaciones de la autopsia.
- Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas.
- Datos sobre la absorción, si los hay.
- Tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

*Discusión de los resultados.**Conclusiones.*

Apéndice 1

DEFINICIONES

Actividad antitiroidea: capacidad de una sustancia para inhibir la acción de una hormona tiroidea natural (por ejemplo, T₃) en el organismo de un mamífero.

Actividad tiroidea: capacidad de una sustancia para actuar como una hormona tiroidea natural (por ejemplo, T₃) en el organismo de un mamífero.

Androgenicidad: capacidad de una sustancia para actuar como una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiandrogenicidad: capacidad de una sustancia para inhibir la acción de una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiestrogenicidad: capacidad de una sustancia para inhibir la acción de una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17-beta estradiol) en el organismo de un mamífero.

Dosis: cantidad de sustancia problema administrada. Se expresa en peso de sustancia por unidad de peso del animal y por día (por ejemplo, mg/kg peso corporal/día) o en concentración constante en la dieta.

Estrogenicidad: capacidad de una sustancia química para actuar como una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17-beta-estradiol) en el organismo de un mamífero.

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

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

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla estudiada mediante este método de ensayo.

Toxicidad evidente: término general que describe los signos claros de toxicidad que aparecen tras la administración de una sustancia problema. Estos signos deben ser suficientes para la evaluación del peligro y deben ser tales que, ante un aumento de la dosis administrada, pueda esperarse la aparición de signos tóxicos graves y una mortalidad probable.

Validación: procedimiento científico diseñado para caracterizar los requisitos operativos y las limitaciones de un método de ensayo y para demostrar su fiabilidad y pertinencia en relación con un propósito determinado.

Apéndice 2

Parámetros recomendados para la detección de los alteradores endocrinos (AE) en el presente método de ensayo B.7

Parámetros obligatorios	Parámetros opcionales
Peso	
<ul style="list-style-type: none"> — Testículos — Epidídimo — Cápsulas suprarrenales — Próstata + vesículas seminales y glándulas coagulantes 	<ul style="list-style-type: none"> — Ovarios — Útero y cuello — Tiroídes
Examen histopatológico	
<ul style="list-style-type: none"> — Gónadas: <ul style="list-style-type: none"> — Testículos y — Ovarios — Órganos sexuales secundarios: <ul style="list-style-type: none"> — Epidídimo, — Próstata + vesículas seminales y glándulas coagulantes — Útero y cuello — Cápsulas suprarrenales — Tiroídes — Vagina 	<ul style="list-style-type: none"> — Frotis vaginal — Glándulas mamarias de machos — Hipófisis
Determinaciones hormonales	
	<ul style="list-style-type: none"> — Concentración en sangre de T3 y T4 — Concentración en sangre de TSH

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.
- (2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60
- (3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol Environ. Health* 9: 691-704.
- (5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- (9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

- (10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- (11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html
- (12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.
- (13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.
- (14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- (15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. *Toxicol Pathol* 33: 404-407.
- (16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.
- (17) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524-533.
- (18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N° 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.
- (19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

B.8. TOXICIDAD SUBAGUDA POR INHALACIÓN: ESTUDIO DE 28 DÍAS

ÍNDICE

El presente método de ensayo B.8 ha sido diseñado para caracterizar debidamente la toxicidad por inhalación de una sustancia problema después de la exposición continuada durante un período limitado (28 días), y para recabar datos que permitan hacer una evaluación cuantitativa del riesgo por inhalación. Se forman lotes de al menos 5 roedores machos y 5 hembras y se exponen 6 horas al día durante 28 días a: a) la sustancia problema a tres o más niveles de concentración; b) aire filtrado (control negativo), y/o c) el vehículo (control del vehículo). Habitualmente los animales se exponen 5 días por semana, aunque se acepta exponerlos hasta 7 días por semana. Se estudian siempre animales machos y hembras, pero pueden exponerse a diferentes niveles de concentración si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema. Este método concede al director del estudio suficiente flexibilidad para incluir lotes satélite (reversibilidad), lavados broncoalveolares (BAL), pruebas neurológicas y otras evaluaciones anatomo-patológicas e histopatológicas orientadas a caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema.

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 412 de la OCDE (2009). Las directrices originales sobre ensayos de toxicidad subaguda por inhalación (TG 412) fueron adoptadas en 1981 (1). El presente método de ensayo B.8 (equivalente a las TG 412 revisadas) se ha actualizado para reflejar el estado actual de la ciencia y satisfacer las necesidades normativas actuales y futuras.
2. Este método permite caracterizar los efectos adversos que se producen después de la exposición por inhalación diaria continuada de una sustancia problema durante 28 días: Los datos derivados de los estudios de toxicidad subaguda por inhalación durante 28 días pueden servir para efectuar evaluaciones cuantitativas del riesgo [siempre que no vayan seguidos de un estudio de toxicidad subcrónica por inhalación durante 90 días (capítulo B.29 del presente anexo)]. Los mismos datos pueden además orientar en la selección de las concentraciones aplicadas en estudios más prolongados, como los de toxicidad subcrónica por inhalación durante 90 días. El presente método de ensayo no está específicamente destinado a la investigación de nanomateriales. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento GD 39 (2).

CONSIDERACIONES INICIALES

3. Antes de comenzar el estudio y con el fin de mejorar su calidad y minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de ensayo tendrá en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema. En la selección de las concentraciones idóneas de estudio resulta útil toda información referente a: identidad, estructura química y propiedades fisiocoquímicas de la sustancia problema, resultados de anteriores ensayos de toxicidad *in vivo* o *in vitro*, uso(s) previsto(s) y posible exposición humana, datos de (Q)SAR previos y datos toxicológicos acerca de compuestos químicos estructuralmente afines, y resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda por inhalación. Si se prevé o se observa neurotoxicidad en el transcurso del estudio, el director del mismo puede decidir la incorporación de las evaluaciones pertinentes, como una batería de observación funcional (FOB) y registros de la actividad motriz. Si bien el calendario de las exposiciones en relación con las evaluaciones concretas puede ser crítico, la realización de estas actividades complementarias no debe interferir en el diseño básico del estudio.
4. Se pueden estudiar diluciones de sustancias corrosivas o irritantes a concentraciones capaces de inducir el grado de toxicidad esperado [véase GD 39 (2)]. Al exponer los animales a estos productos, las concentraciones diana deben ser lo bastante bajas para no provocar un dolor y sufrimiento intensos, pero suficientes para obtener una curva de concentración-respuesta que satisfaga los objetivos científicos y normativos del ensayo. Dichas concentraciones se escogerán según cada caso, preferiblemente sobre la base de estudios del intervalo analítico debidamente diseñados que arrojen información sobre el parámetro principal, el umbral de irritación y el tiempo de aparición de los síntomas (véanse los puntos 11-13). Se justificará la elección de las concentraciones.
5. Los animales moribundos o que presenten signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva. Los animales moribundos se contabilizan como muertes durante el ensayo. En el documento de orientación sobre criterios de tratamiento compasivo [Guidance Document on Humane Endpoints de la OCDE (3)] se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

6. Hay que utilizar roedores adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie preferida es la rata. Deberá justificarse el empleo de otra especie.

Preparación de los animales

7. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la asignación aleatoria, los animales serán adultos jóvenes de entre 7 y 9 semanas de edad. Los pesos corporales se desviaran a lo sumo en $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo. Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar el ensayo, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

Zootecnia

8. Los animales se identificarán de manera individual, a ser posible con transpondedores subcutáneos, a fin de facilitar la observación y evitar confusiones. La temperatura de los animalarios debe ser de $22 \pm 3^\circ\text{C}$. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por grupos de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario acostumbrar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales tensiones físicas, térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre a través del pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. La iluminación será artificial, con una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Cámaras de inhalación

9. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzar mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el documento GD 39 (2) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y de solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

ESTUDIOS DE TOXICIDAD

Concentraciones límite

10. A diferencia de los estudios de toxicidad aguda, en los estudios de toxicidad subaguda por inhalación durante 28 días no hay concentraciones límite definidas. La concentración máxima estudiada dependerá de: 1) la máxima concentración alcanzable, 2) el nivel de exposición humana en "el escenario más desfavorable", 3) la necesidad de mantener un suministro de oxígeno adecuado, y/o 4) la atención al bienestar de los animales. Si no se dispone de datos de concentración límite, es aplicable el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (13) [hasta una concentración máxima de 5 mg/l para los aerosoles, de 20 mg/l para los vapores y de 20 000 ppm para los gases; véase el documento GD 39 (2)]. Cuando sea preciso superar estos límites en el estudio de gases o sustancias problemáticas altamente volátiles (por ejemplo, refrigerantes), habrá que justificar los motivos. La concentración límite será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).

Estudio de determinación del intervalo

11. Antes de proceder al estudio principal, puede ser necesario realizar un estudio para determinar el intervalo analítico. Un estudio de determinación del intervalo es más completo que un estudio preliminar, por cuanto no se limita a la selección de las concentraciones. La información recabada en este tipo de estudio puede ser decisiva para el éxito del estudio principal. Un estudio de determinación del intervalo puede, por ejemplo, aportar información técnica referente a los métodos analíticos y a la granulometría, la detección de los mecanismos de toxicidad, los parámetros anatomo-patológicos e histopatológicos, y las estimaciones de lo que podrán ser el NOAEL y la concentración tóxica mínima en un estudio principal. El director de la investigación decidirá si ha de basarse en el estudio de determinación del intervalo para identificar el umbral de irritación de las vías respiratorias (con la histopatología de las vías respiratorias, las pruebas de la función pulmonar o el lavado broncoalveolar), la concentración máxima tolerada sin causar un sufrimiento indebido a los animales y los parámetros que caractericen mejor la toxicidad de la sustancia problema.
12. Un estudio de determinación del intervalo puede hacerse con uno o más niveles de concentración. A cada nivel de concentración no deben exponerse más de tres machos y tres hembras. El estudio de determinación del intervalo tendrá una duración mínima de 5 días y máxima (generalmente) de 14 días. En el informe del estudio se justificará la selección de las concentraciones destinadas al estudio principal. La finalidad del estudio principal es demostrar una relación concentración-respuesta basada en lo que se supone el parámetro más sensible. La concentración más baja será idealmente una en la que no se observen efectos adversos, mientras que la concentración más alta será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).
13. A la hora de elegir los niveles de concentración para el estudio de determinación del intervalo, se tendrá en cuenta toda la información disponible, incluidos las relaciones entre estructura y actividad y los datos de sustancias afines (véase el punto 3). Un estudio de determinación del intervalo puede verificar o refutar los parámetros relacionados con los mecanismos de acción que *a priori* se consideran más sensibles, como la inhibición de la colinesterasa por los organofosforados, la formación de metahemoglobina por agentes eritrotóxicos, las hormonas tiroideas (T_3 y T_4), en el caso de tirotóxicos, y la presencia de proteínas, LDH, o neutrófilos en el lavado broncoalveolar en el caso de partículas inocuas escasamente solubles o de aerosoles que son irritantes pulmonares.

Estudio principal

14. El estudio principal de toxicidad subaguda comprende habitualmente tres niveles de concentración, además de lotes de control negativo (aire) y/o testigo del vehículo (véase el punto 17). Se recurrirá a todos los datos disponibles para ayudar a la selección de los niveles de exposición adecuados, incluidos los resultados de los estudios de toxicidad sistémica, metabólicos y cinéticos (poniendo especial atención para evitar niveles de concentración elevados que saturen los procesos cinéticos). Cada lote de ensayo se compone de al menos 10 roedores (5 machos y 5 hembras), que se exponen a la sustancia química estudiada 6 horas al día en un régimen de 5 días por semana durante un período de 4 semanas (la duración total del estudio es de 28 días). También se admite exponer a los animales 7 días por semana (por ejemplo, cuando se estudian productos farmacéuticos para inhalación). Si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema, podrán exponerse los dos sexos a diferentes niveles de concentración con el fin de optimizar la relación concentración-respuesta, tal como se describe en el punto 15. Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificarán los motivos cuando el tiempo de exposición sea inferior a 6 horas/día o cuando sea necesario efectuar un estudio de exposición de cuerpo entero de larga duración (por ejemplo, 22 horas/día) [véase el documento GD 39 (2)]. Se privará de comida a los animales durante el período de exposición, a menos que este exceda de 6 horas. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.
15. Las concentraciones diana seleccionadas deben servir para identificar el órgano o los órganos diana y para demostrar una clara relación concentración-respuesta.
- El nivel de concentración más elevado debe inducir efectos tóxicos, pero sin provocar letalidad o daños persistentes que impidan hacer una evaluación significativa.
 - El nivel o los niveles de concentración intermedios se espaciarán para obtener una graduación o escala de los efectos tóxicos desde el nivel más bajo al más elevado.
 - La concentración más baja debe producir escasos o nulos signos de toxicidad.

Estudio satélite (de reversibilidad)

16. Es posible recurrir a un estudio satélite (de reversibilidad) para observar la reversibilidad, persistencia o aparición retardada de toxicidad durante un período de duración adecuada, pero nunca inferior a 14 días, después del tratamiento. Los lotes satélite (de reversibilidad) se componen de 5 machos y 5 hembras, que se exponen simultáneamente a los animales de experimentación del estudio principal. Los lotes del estudio satélite (de reversibilidad) deben exponerse a la sustancia problema al nivel de concentración más elevado y, en la medida necesaria, se emplearán simultáneamente lotes testigo con aire y/o con el vehículo (véase el punto 17).

Animales de control

17. Los animales de control negativo (con aire) simultáneo se tratan de manera idéntica a los animales del lote experimental, excepto en que se exponen al aire filtrado en lugar de a la sustancia problema. Cuando se utiliza agua o cualquier otra sustancia para ayudar a crear la atmósfera experimental, en el estudio debe incluirse un lote testigo del vehículo, en lugar del lote de control negativo (con aire). Como vehículo se usará agua en la medida de lo posible. Cuando se use agua como vehículo, los animales de control se expondrán a una atmósfera de aire con la misma humedad relativa que los grupos expuestos a la sustancia problema. La selección de un vehículo idóneo se basará en un ensayo preliminar debidamente realizado o bien en los datos históricos. Cuando no se conoce bien la toxicidad de un vehículo, el director del estudio puede decidir el uso de ambos lotes, el de control negativo (con aire) y el testigo del vehículo, pero no es en absoluto recomendable. Si los datos previos revelan que un vehículo es atóxico, no hay necesidad de emplear un grupo de control negativo (con aire), y solo se usará un lote testigo del vehículo. Si un ensayo preliminar de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada y debe utilizarse este control del vehículo.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN**Administración de las concentraciones**

18. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. El estado físico investigado dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de la concentración seleccionada y/o de la forma física más probable que adoptará dicha sustancia durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas. Los materiales particulados pueden someterse a procesos mecánicos para reducir el tamaño de partícula. Se ofrecen más orientaciones en el documento de orientación GD 39 (2).

Distribución del tamaño de partícula

19. Se controlará la granulometría de todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 3 μm , con una desviación típica geométrica (σ_g) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (4). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Así, por ejemplo, las partículas de los humos metálicos pueden tener un tamaño inferior al mencionado intervalo, mientras que las partículas con carga y las fibras pueden superarlo.

Preparación de la sustancia problema en un vehículo

20. En condiciones ideales, la sustancia problema debería estudiarse sin ningún vehículo. Si es necesario emplear un vehículo para generar una concentración de sustancia problema y un tamaño de partícula adecuados, se le dará preferencia al agua. Siempre que una sustancia problema se disuelva en un vehículo, debe demostrarse su estabilidad.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN**Caudal de aire de la cámara**

21. El caudal de aire de la cámara de exposición se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión en tiempo real de la concentración atmosférica (o la estabilidad temporal) del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de la inhalación que resultan de interés. Si la concentración se supervisa en tiempo real, es posible reducir la frecuencia de medición del caudal de aire limitándola a una sola medición por exposición y día. Habrá que tomar especiales precauciones para evitar la reinspiración en las cámaras de exposición solo por la nariz. La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no se van a respetar estos valores de referencia, habrá que medir las concentraciones de ambos gases. Si las mediciones del primer día de exposición revelan que estos gases están presentes a las concentraciones adecuadas, no serán necesarias nuevas mediciones.

Temperatura y humedad relativa de la cámara

22. La temperatura de la cámara se mantendrá en $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Siempre que sea posible, la humedad relativa presente en la zona de respiración de los animales, tanto en las exposiciones de solo por la nariz como en las de cuerpo entero, se supervisará de manera continua y se registrará cada hora durante la exposición. La humedad relativa debe mantenerse preferiblemente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia problema con el método de ensayo).

Sustancia problema: concentración nominal

23. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara de inhalación. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en la generación de la atmósfera.

Sustancia problema: concentración real

24. La concentración real es la concentración de sustancia problema comprobada por muestreo en la zona de respiración de los animales de una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior valoración analítica) o bien con métodos inespecíficos, como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia problema. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material aerotransportado es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, en estado aerotransportado) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trata de productos en forma de aerosol capaces de evaporarse o sublimarse, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases.
25. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema durante todo el estudio, lote que se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia problema consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa del pico, peso molecular determinado mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gases y otras determinaciones. Si bien la identidad de la muestra de ensayo no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).
26. La atmósfera de exposición debe mantenerse constante en la medida de lo posible. Para demostrar la estabilidad de las condiciones de exposición se puede usar un equipo de supervisión en tiempo real, como un fotómetro de proceso para aerosoles o un analizador de hidrocarburos totales para vapores. La concentración real presente en la cámara deberá medirse al menos 3 veces por cada nivel y día de exposición. Pero si ello no es posible debido a un caudal de aire limitado o a que las concentraciones son bajas, se acepta una muestra por período de exposición. En ese caso, lo ideal es recoger la muestra durante todo el período de exposición. Las concentraciones individuales medidas en la cámara no deben desviarse de la concentración media en $\pm 10\%$ cuando se trata de gases y vapores, ni en más de $\pm 20\%$ en el caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y documentará el tiempo de equilibrado (t_{95}) de la cámara. La duración de una exposición incluye el tiempo durante el cual se genera la sustancia problema. Este abarca los tiempos transcurridos hasta alcanzar el equilibrio en la cámara (t_{95}) y hasta la extinción. Se ofrecen indicaciones para el cálculo de t_{95} en el documento de orientación nº 39 (2).
27. Cuando se manejan mezclas muy complejas formadas por gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos fabricados con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación. Por consiguiente, se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente la sustancia activa principal de la mezcla, por cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla total y no solo de la sustancia indicadora o del componente activo (analito). Se ofrece más información sobre las concentraciones reales en el documento de orientación nº 39 (2).
28. La granulometría de los aerosoles debe determinarse al menos con periodicidad semanal por cada nivel de concentración, con ayuda de un impactador de cascada o un aparato alternativo, como un cribador de partículas. Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio.
29. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de purga, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis por tamaños de partícula tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración en masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase el documento GD 39 (2)]. Si es posible demostrar su equivalencia para todas las concentraciones analizadas en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir el ensayo.
30. Se controlará la granulometría en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases.

OBSERVACIONES

31. Los animales se someterán a observación clínica frecuente antes, durante y después del período de exposición. Pueden estar indicadas observaciones más frecuentes, dependiendo de la respuesta de los animales durante la exposición. Cuando la observación de los animales esté dificultada por el uso de tubos de sujeción, por la escasa iluminación de las cámaras de cuerpo entero o por la opacidad ambiental, se someterán a observación minuciosa después de la exposición. Las observaciones realizadas con anterioridad a la exposición del día siguiente permiten determinar la posible reversibilidad o exacerbación de los efectos tóxicos.
32. Todas las observaciones se registrarán en fichas individuales de cada animal. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.
33. Las observaciones en la jaula deberían incluir los cambios en la piel, ojos y membranas mucosas; los cambios en los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipo/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento. En el protocolo del estudio se pueden incluir otras evaluaciones del tipo de pruebas cinéticas, biovigilancia, pruebas de la función pulmonar, retención de materiales escasamente solubles que puedan acumularse en el tejido pulmonar y cambios comportamentales.

PESO CORPORAL

34. Se registrará el peso de cada animal poco antes de la primera exposición (día 0), y después dos veces por semana (por ejemplo, los viernes y lunes para demostrar la recuperación durante un fin de semana sin exposición, o en un intervalo que permita evaluar la toxicidad sistémica) y en el momento de la muerte o la eutanasia. Si no se observan efectos en las 2 primeras semanas, el peso corporal se podrá registrar semanalmente durante el resto del estudio. Si se utilizan animales satélite (reversibilidad), se seguirán pesando semanalmente durante todo el período de recuperación. Al concluir el estudio, se pesarán todos los animales poco antes del sacrificio para permitir calcular sin sesgos la relación entre el peso de los órganos y el peso corporal.

CONSUMO DE AGUA Y DE ALIMENTOS

35. El consumo alimentario se medirá cada semana. También se puede medir el consumo de agua.

PATOLOGÍA CLÍNICA

36. Deben hacerse evaluaciones de patología clínica en todos los animales, incluidos los testigo y los satélite (reversibilidad), cuando sean sacrificados. Se registrará el intervalo de tiempo transcurrido entre el final de la exposición y la toma de muestras de sangre, particularmente si la recuperación del parámetro valorado es rápida. Está indicado obtener muestras al final del período de exposición cuando se trata de parámetros con una semivida plasmática corta (por ejemplo, COHb, CHE y MetHb).
37. En el cuadro 1 se recogen los parámetros de patología clínica que se suelen exigir en todos los estudios toxicológicos. El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino solo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos. El director del estudio puede decidir la evaluación de otros parámetros para caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema (colinesterasa, lípidos, hormonas, equilibrio ácido-base, metahemoglobina o cuerpos de Heinz, creatina-cinasa, cociente mieloide/eritroide, troponinas, gases en sangre arterial, lactato-deshidrogenasa, sorbitol-deshidrogenasa, glutamato-deshidrogenasa y gamma-glutamil-transpeptidasa).

Cuadro 1

Parámetros de patología clínica habituales

Hematología	
Recuento de eritrocitos	Recuento de leucocitos
Hematocrito	Fórmula leucocitaria
Concentración de hemoglobina	Recuento de plaquetas
Hemoglobina corpuscular media	Capacidad de coagulación (seleccionar una):
Volumen corpuscular medio	— Tiempo de protrombina
Concentración de hemoglobina corpuscular media	— Tiempo de coagulación
Reticulocitos	— Tiempo de tromboplastina parcial

Bioquímica

Glucosa (*)	Alanina-aminotransferasa
Colesterol total	Aspartato-aminotransferasa
Triglicéridos	Fosfatasa alcalina
Nitrógeno ureico en sangre	Potasio
Bilirrubina total	Sodio
Creatinina	Calcio
Proteínas totales	Fósforo
Albúmina	Cloruros
Globulinas	

Análisis de orina (opcional)

Aspecto (color y turbidez)	Proteínas totales
Volumen	Glucosa
Densidad y osmolalidad	Sangre/células sanguíneas
pH	

(*) Puesto que un período de ayuno prolongado puede introducir un sesgo en las determinaciones de glucosa entre los animales de control y los tratados, el director del estudio decidirá si es apropiado o no imponer dicho ayuno a los animales. Si se impone un período de ayuno, será acorde a la especie empleada; para las ratas puede ser de 16 horas (ayuno desde la víspera). La determinación de la glucosa en ayunas puede hacerse con ayuno desde la víspera durante la última semana de exposición, o bien con ayuno desde la víspera antes de proceder a la autopsia (en este último caso, con la determinación de todos los restantes parámetros de patología clínica).

38. Cuando hay indicios de que las vías respiratorias bajas (alvéolos) son el lugar principal de depósito y retención, el lavado broncoalveolar (BAL) puede ser la técnica de elección para analizar cuantitativamente los parámetros hipotéticamente dependientes de la dosis relacionados con la aparición de alveolitis, inflamación pulmonar y fosfolipidosis. Ello permite demostrar debidamente la relación dosis-respuesta y la evolución en el tiempo del daño alveolar. En el fluido BAL se puede efectuar el recuento de leucocitos y la fórmula leucocitaria, y medir las proteínas totales y la lactato deshidrogenasa. Otros parámetros dignos de tenerse en cuenta son los indicadores de daño lisosomal, fosfolipidosis, fibrosis e inflamación alérgica o irritativa, como puede ser la determinación de las citocinas o quimiocinas proinflamatorias. Generalmente, las determinaciones realizadas en el BAL son complementarias de los resultados del examen histopatológico, pero no pueden sustituirlos. En el documento GD 39 (2) se facilitan indicaciones sobre el modo de realizar un lavado pulmonar.

ANATOMÍA PATOLÓGICA MACROSCÓPICA Y PESO DE LOS ÓRGANOS

39. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminan del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a sangrado total (de ser factible) y a autopsia macroscópica. Se documentará el tiempo transcurrido entre el final de la última exposición de cada animal y su sacrificio. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de comprobar la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a una temperatura suficientemente baja para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención a las alteraciones de las vías respiratorias.
40. En el cuadro 2 se indican los órganos y tejidos que durante la autopsia macroscópica deben conservarse en un medio idóneo para su examen histopatológico. La conservación de los órganos y tejidos entre corchetes, así como de cualquier otro órgano o tejido, se hará a criterio del director del estudio. Los órganos destacados **en negrita** se deben limpiar de adherencias y pesar lo antes posible después de la disección para evitar su desecación. El tiroides y los epidídimos solo se pesarán en caso necesario, porque artefactos debidos a las adherencias pueden dificultar la evaluación histopatológica. Los tejidos y órganos se fijan en formol con amortiguador al 10 % o en otro fijador apropiado inmediatamente después de la autopsia, dejando pasar un mínimo de 24-48 horas antes de la limpieza de adherencias, dependiendo del fijador empleado.

Cuadro 2

Órganos y tejidos conservados durante la autopsia macroscópica

Cápsulas suprarrenales	Vesículas seminales
Médula ósea (y/o aspirado reciente)	Médula espinal (cervical, medio dorsal y lumbar)
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia)	Bazo
[Ojos (retina, nervio óptico) y párpados]	Estómago
Corazón	Testículos
Riñones	Timo
Laringe (3 secciones de corte histológico, 1 de ellas de la base de la epiglótis)	Tiroides
Hígado	Tráquea (como mínimo 2 secciones, 1 sección longitudinal que pase por la carina traqueal y 1 sección transversal)
Pulmón (todos los lóbulos en una sección de corte, incluidos los bronquios primarios)	[Vejiga urinaria]
Ganglios linfáticos de la región hilar del pulmón, especialmente cuando se estudian sustancias problemáticas particuladas escasamente solubles. Si se trata de exámenes más minuciosos o de carácter inmunológico, pueden tomarse en consideración otros ganglios linfáticos, por ejemplo de las regiones mediastínica, cervical/submandibular o auricular.	Útero
Tejidos nasofaríngeos [como mínimo 4 secciones; 1 sección incluirá el conducto nasofaríngeo y el tejido linfoide asociado a la nariz (Nasal Associated Lymphoid Tissue, NALT)]	Todas las lesiones macroscópicas
Esófago	
[Bulbo olfativo]	
Ovarios	

41. El pulmón se debe extraer intacto, pesar e instilar con un fijador apropiado a una presión de 20-30 cm de agua para asegurar el mantenimiento de la estructura pulmonar (5). Se preparan cortes de todos los lóbulos a un solo nivel, incluyendo los bronquios primarios, pero, si se practica un lavado pulmonar, el lóbulo no lavado se seccionará a tres niveles (no en cortes seriados).
42. Deben examinarse como mínimo 4 secciones de los tejidos nasofaríngeos, una de los cuales incluirá el conducto nasofaríngeo (5) (6) (7) (8) (9) para permitir una observación adecuada de los epitelios escamoso, transicional (respiratorio no ciliado) y olfativo, y el tejido de drenaje linfático [NALT; (10) (11)]. Se examinarán tres secciones de la laringe, una de las cuales debe incluir la base de la epiglótis (12). Deben examinarse como mínimo 2 secciones de la tráquea, entre ellas un corte longitudinal que pase por la carina de bifurcación de los bronquios extrapulmonares y un corte transversal.

EXAMEN HISTOPATOLÓGICO

43. La evaluación histopatológica de todos los órganos y tejidos mencionados en el cuadro 2 se llevará a cabo en el lote de control y en el de concentración más elevada, así como en todos los animales que mueran o sean sacrificados durante el estudio. Se prestará especial atención a las vías respiratorias, los órganos diana y las lesiones macroscópicas. Aquellos órganos y tejidos que presenten lesiones en el lote de concentración más elevada se examinarán en todos los grupos. Con objeto de demostrar una clara relación concentración-respuesta, el director del estudio puede decidir la realización de evaluaciones histopatológicas en otros grupos. Si se utiliza un lote satélite (reversibilidad), debe hacerse un examen histopatológico de todos los órganos y tejidos que presenten efectos en los lotes tratados. Si en el lote de exposición elevada se producen muertes prematuras u otras contrariedades que comprometan la interpretación de los datos, se practicarán evaluaciones histopatológicas en el lote de la concentración inmediatamente inferior. Se procurará correlacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

DATOS E INFORME

Datos

44. Se documentarán los datos de cada animal referentes a peso corporal, consumo de alimento, patología clínica, anatomía patológica macroscópica, peso de los órganos e histopatología. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada lote de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la autopsia. Todos los resultados, cuantitativos y fortuitos, se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido; los métodos estadísticos aplicados deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

Informe del ensayo

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

Animales de experimentación y zootecnia

- Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.
- Especie o variedad empleada y justificación del uso de una especie distinta de la rata. Podrán indicarse la procedencia y los datos previos, siempre que correspondan a animales sometidos a condiciones parecidas de exposición, alojamiento y alimentación.
- Número, edad y sexo de los animales.
- Método de asignación al azar.
- Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

Sustancia problema

- Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).
- Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

Vehículo

- Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).
- Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

Cámara de inhalación

- Descripción pormenorizada de la cámara de inhalación, incluido el volumen, y acompañada de un diagrama.
- Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.
- Instrumental empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.
- Fuente del aire y sistema de acondicionamiento.
- Métodos de calibración del instrumental para garantizar una atmósfera experimental homogénea.
- Diferencia de presión (positiva o negativa).
- Puertos de exposición por cámara (solo por la nariz); ubicación de los animales en la cámara (de cuerpo entero).

- Estabilidad de la atmósfera experimental.
- Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.
- Tratamiento del aire suministrado/extráido.
- Caudales de aire, caudal de aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).
- Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (t_{95}) en la cámara de inhalación.
- Número de variaciones de volumen por hora.
- Dispositivos de dosificación (si procede).

Datos relativos a la exposición

- Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.
- Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).
- Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que dan lugar a formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada una de ellas por separado.
- Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (mg/l, mg/m³, etc.) y no en unidades de volumen (ppm, ppmm, etc.).
- Distribución granulométrica, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica (σ_g), incluidos los correspondientes métodos de cálculo. Se documentarán los análisis granulométricos individuales.

Condiciones del ensayo

- Pormenores de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de los sólidos o preparar soluciones de la sustancia problema.
- Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.
- Descripción pormenorizada del instrumental empleado para controlar la temperatura, la humedad y el caudal de aire de la cámara (creación de una curva de calibración).
- Descripción pormenorizada del equipo empleado para tomar las muestras con el fin de medir la concentración de la cámara y la distribución por tamaño de partícula.
- Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficiencia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).
- Método aleatorio de asignación de los animales a los lotes de exposición y de control (testigo).
- Pormenores sobre la calidad del alimento y del agua (incluido el tipo o procedencia de la alimentación y el origen del agua).
- Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

Resultados

- Tabulación de los valores de temperatura, humedad y caudal de aire de la cámara.
- Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.

- Tabulación de los datos de granulometría, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, distribución granulométrica y cálculos de MMAD y σ_g .
- Tabulación de las respuestas y de los niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad, momento de aparición y duración de los efectos).
- Tabulación de los pesos de los animales individuales.
- Tabulación del consumo de alimentos.
- Tabulación de los datos de patología clínica.
- Resultados de la autopsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.
- Tabulación de cualesquiera otros parámetros analizados.

Evaluación e interpretación de los resultados

- Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para satisfacer los criterios del presente método de ensayo como, por ejemplo, la concentración límite o el tamaño de partícula.
- Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplen los criterios relativos al tamaño de partícula.
- En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.
- Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.
- Se facilitará una explicación de por qué ha sido preciso sacrificar de forma compasiva los animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre parámetros de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (3).
- Se identificarán el órgano o los órganos diana.
- Se determinarán los valores de NOAEL y LOAEL.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- (5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.
- (6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.
- (7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

-
- (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) *Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series*, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219-224.
- (11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
- (12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
- (13) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).
-

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.»

- 5) Se sustituyen los capítulos B.29 y B.30 por el texto siguiente:

«B.29. TOXICIDAD SUBCRÓNICA POR INHALACIÓN: ESTUDIO DE 90 DÍAS

RESUMEN

El presente método de ensayo B.29 se ha diseñado para caracterizar debidamente la toxicidad por inhalación de una sustancia química después de una exposición subcrónica (90 días de duración), y para recabar datos robustos que permitan hacer una evaluación cuantitativa del riesgo por inhalación. Se forman lotes de al menos 10 roedores machos y 10 hembras y se exponen 6 horas al día durante un período de 90 días (13 semanas) a: a) la sustancia problema a tres o más niveles de concentración; b) aire filtrado (testigo negativo), y/o c) el vehículo (testigo del vehículo). Habitualmente los animales se exponen 5 días por semana, aunque se acepta una pauta de 7 días por semana. Se estudian siempre animales machos y hembras, pero pueden exponerse a diferentes niveles de concentración si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema. Este método concede al director del estudio suficiente flexibilidad para incluir lotes satélite (reversibilidad), sacrificios durante el ensayo, lavados broncoalveolares (BAL), pruebas neurológicas y otras evaluaciones de patología clínica y de histopatología orientadas a caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema.

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 413 de la OCDE (2009). Las directrices originales sobre ensayos de toxicidad subcrónica por inhalación (TG 413) fueron adoptadas en 1981 (1). El presente método de ensayo B.29 [equivalente a las TG 413 (2009) revisadas] se ha actualizado para reflejar el estado actual de la ciencia y satisfacer las necesidades normativas actuales y futuras.
2. Los estudios de toxicidad subcrónica por inhalación sirven fundamentalmente para establecer las concentraciones normativas que permitan evaluar el riesgo de los trabajadores en el entorno laboral. Permiten además evaluar el riesgo en la vivienda humana, el transporte y el medio ambiente. Este método permite caracterizar los efectos adversos que se producen después de la exposición por inhalación diaria continua de una sustancia problema durante 90 días (aproximadamente el 10 % de la vida de la rata). A partir de los datos derivados de los estudios de toxicidad subcrónica por inhalación, se pueden hacer evaluaciones cuantitativas del riesgo y seleccionar las concentraciones aplicables a los estudios de toxicidad crónica. El presente método de ensayo no está específicamente destinado a la investigación de nanomateriales. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento de orientación nº 39 (2).

CONSIDERACIONES INICIALES

3. Antes de comenzar el estudio y con el fin de mejorar su calidad y minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de ensayo tendrá en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema. En la selección de las concentraciones idóneas de estudio resulta útil toda información referente a: identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, resultados de anteriores ensayos de toxicidad *in vivo* o *in vitro*, uso(s) previsto(s) y posible exposición humana, datos de (Q)SAR previos y datos toxicológicos acerca de compuestos químicos estructuralmente afines, y resultados obtenidos en otros estudios de exposición continua. Si se prevé o se observa neurotoxicidad en el transcurso del estudio, el director del mismo puede decidir la incorporación de las evaluaciones pertinentes, como una batería de observación funcional (FOB) y registros de la actividad motriz. Si bien el calendario de las exposiciones en relación con las evaluaciones concretas puede ser crítico, la realización de estas actividades complementarias no debe interferir en el diseño básico del estudio.
4. Las diluciones de sustancias problema corrosivas o irritantes se pueden estudiar a concentraciones capaces de inducir el grado de toxicidad esperado. Se ofrece más información en el documento de orientación nº 39 (2). Al exponer los animales a estos productos, las concentraciones diana deben ser lo bastante bajas para no provocar un dolor y sufrimiento intensos, pero suficientes para obtener una curva de concentración-respuesta que satisfaga los objetivos científicos y normativos del ensayo. Dichas concentraciones se escogerán según cada caso, preferiblemente sobre la base de estudios del intervalo analítico debidamente diseñados que arrojen información sobre el parámetro crítico principal, el eventual umbral de irritación y el tiempo de aparición de los síntomas (véanse los puntos 11-13). Se justificará la elección de las concentraciones.
5. Los animales moribundos o que presenten signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva. Los animales moribundos se contabilizan como muertes durante el ensayo. En el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (3) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

6. Hay que utilizar roedores adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie preferida es la rata. Deberá justificarse el empleo de otra especie.

Preparación de los animales

7. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la asignación aleatoria, los animales serán adultos jóvenes de entre 7 y 9 semanas de edad. Los pesos corporales se desviará a lo sumo $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo. Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar el ensayo, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

Zootecnia

8. Los animales se identificarán de manera individual, preferiblemente con transpondedores subcutáneos, a fin de facilitar la observación y evitar confusiones. La temperatura de los animalarios debe ser de $22 \pm 3^\circ\text{C}$. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por lotes de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario aclimatar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales tensiones físicas, térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre por el pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. La iluminación será artificial, con una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Cámaras de inhalación

9. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzar mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el documento de orientación nº 39 (2) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

ESTUDIOS DE TOXICIDAD

Concentraciones límite

10. A diferencia de los estudios de toxicidad aguda, en los estudios de toxicidad subcrónica por inhalación no hay concentraciones límite definidas. La concentración máxima estudiada dependerá de: 1) la máxima concentración alcanzable, 2) el nivel de exposición humana en el caso más desfavorable, 3) la necesidad de mantener un suministro de oxígeno adecuado, y/o 4) la atención al bienestar de los animales. Si no se dispone de datos de concentración límite, es aplicable el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (13) [hasta una concentración máxima de 5 mg/l para los aerosoles, de 20 mg/l para los vapores y de 20 000 ppm para los gases; véase el documento GD 39 (2)]. Cuando sea preciso superar estos límites en el estudio de gases o sustancias altamente volátiles (por ejemplo, refrigerantes), habrá que justificar los motivos. La concentración límite será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).

Estudio de determinación del intervalo

11. Antes de proceder al estudio principal, generalmente es necesario realizar un estudio para determinar el intervalo analítico. Un estudio de determinación del intervalo es más completo que un estudio preliminar, por cuanto no se limita a la selección de las concentraciones. La información recabada en este tipo de estudio puede ser decisiva para el éxito del estudio principal. Un estudio de determinación del intervalo puede, por ejemplo, aportar información técnica referente a los métodos analíticos y al tamaño de partícula, la detección de los mecanismos de toxicidad, los datos de patología clínica y de histopatología, y las estimaciones de lo que podrán ser el NOAEL y la concentración tóxica mínima en un estudio principal. El director de la investigación decidirá si basarse en el estudio de determinación del intervalo para identificar el umbral de irritación de las vías respiratorias (con la histopatología de las vías respiratorias, las pruebas de la función pulmonar o el lavado broncoalveolar), la concentración máxima tolerada sin causar un sufrimiento indebido a los animales y los parámetros que caractericen mejor la toxicidad de la sustancia problema.

12. Un estudio de determinación del intervalo puede hacerse con uno o más niveles de concentración. Dependiendo de los parámetros elegidos, a cada nivel de concentración se expondrán de tres a seis machos y de tres a seis hembras. El estudio de determinación del intervalo tendrá una duración mínima de 5 días y máxima (generalmente) de 28 días. En el informe del estudio se justificará la selección de las concentraciones destinadas al estudio principal. La finalidad del estudio principal es demostrar una relación concentración-respuesta basada en lo que se prevé como el parámetro más sensible. La concentración más baja será idealmente una en la que no se observen efectos adversos, mientras que la concentración más alta será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).
13. A la hora de elegir los niveles de concentración para el estudio de determinación del intervalo, se tendrá en cuenta toda la información disponible, incluidos las relaciones entre estructura y actividad y los datos de sustancias afines (véase el punto 3). Un estudio de determinación del intervalo puede verificar o refutar los parámetros relacionados con los mecanismos de acción que *a priori* se consideran más sensibles, como la inhibición de la colinesterasa por los organofosforados, la formación de metahemoglobina por agentes eritrotóxicos, las hormonas tiroideas (T_3 y T_4), en el caso de tirotóxicos, y la presencia de proteínas, LDH o neutrófilos en el lavado broncoalveolar en el caso de partículas inocuas escasamente solubles o de aerosoles que son irritantes pulmonares.

Estudio principal

14. El estudio principal de toxicidad subcrónica comprende habitualmente tres niveles de concentración, además de lotes de control negativo (aire) y/o testigo del vehículo (véase el punto 18). Se recurrirá a todos los datos disponibles para basar la selección de los niveles de exposición adecuados, incluidos los resultados de los estudios de toxicidad sistémica, metabólicos y cinéticos (poniendo especial atención para evitar niveles de concentración elevados que saturen los procesos cinéticos). Cada lote de ensayo se compone de 10 roedores machos y de 10 hembras, que se exponen a la sustancia química 6 horas al día en un régimen de 5 días por semana durante un período de 13 semanas (la duración total del estudio es de 90 días como mínimo). También se admite exponer a los animales 7 días por semana (por ejemplo, cuando se estudian productos farmacéuticos para inhalación). Si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema, podrán exponerse los dos sexos a diferentes niveles de concentración con el fin de optimizar la relación concentración-respuesta, tal como se describe en el punto 15. Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificarán los motivos cuando el tiempo de exposición sea inferior a 6 horas/día o cuando sea necesario efectuar un estudio de exposición de cuerpo entero de larga duración (por ejemplo, 22 horas/día) [véase el documento GD 39 (2)]. Se privará de comida a los animales durante el período de exposición, a menos que este exceda de 6 horas. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.
15. Las concentraciones diana seleccionadas deben servir para identificar el órgano o los órganos diana y para demostrar una clara relación concentración-respuesta.
 - El nivel de concentración más elevado debe inducir efectos tóxicos, pero sin provocar letalidad o daños persistentes que impidan hacer una evaluación significativa.
 - El nivel o los niveles de concentración intermedios se espaciarán para obtener una graduación o escala de los efectos tóxicos desde el nivel más bajo al más elevado.
 - La concentración más baja debe producir escasos o nulos signos de toxicidad.

Sacrificios durante el estudio

16. Si se proyecta hacer sacrificios durante la investigación, el número de animales incluido en cada nivel de exposición se incrementará en el número que vaya a ser sacrificado antes de que concluya el estudio. Se justificará la necesidad de hacer tales sacrificios, que se computarán oportunamente en los análisis estadísticos.

Estudio satélite (de reversibilidad)

17. Es posible recurrir a un estudio satélite (de reversibilidad) para observar la reversibilidad, persistencia o aparición retardada de toxicidad durante un período de duración adecuada, pero nunca inferior a 14 días, después del tratamiento. Los lotes satélite (de reversibilidad) se componen de 10 machos y 10 hembras, que se exponen simultáneamente a los animales de experimentación del estudio principal. Los lotes del estudio satélite (de reversibilidad) deben exponerse a la sustancia problema al nivel de concentración más elevado y, en la medida necesaria, se emplearán simultáneamente lotes de control con aire y/o con el vehículo (véase el punto 18).

Animales de control

18. Los animales de control negativo (con aire) en paralelo se tratan de manera idéntica a los animales del lote experimental, excepto en que se exponen al aire filtrado en lugar de a la sustancia problema. Cuando se utiliza agua o cualquier otra sustancia para ayudar a crear la atmósfera experimental, en el estudio debe incluirse un lote testigo del vehículo, en lugar del lote de control negativo (con aire). Como vehículo se usará agua en la medida de lo posible. Cuando se use agua como vehículo, los animales de control se expondrán a una atmósfera de aire

con la misma humedad relativa que los grupos expuestos a la sustancia problema. La selección de un vehículo idóneo se basará en un ensayo preliminar debidamente realizado o bien en los datos previos. Cuando no se conoce bien la toxicidad de un vehículo, el director del estudio puede decidir el uso de ambos grupos, el de control negativo (con aire) y el testigo del vehículo, pero no es en absoluto recomendable. Si los datos previos revelan que un vehículo es atóxico, no hay necesidad de emplear un grupo de control negativo (con aire), y solo se usará un lote testigo del vehículo. Si un ensayo preliminar de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada y es el que debe utilizarse como control.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Administración de las concentraciones

19. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. El estado físico investigado dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de las concentraciones seleccionadas y/o de la forma física más probable que adoptará la sustancia química durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas. Las materias particuladas pueden someterse a procesos mecánicos para reducir el tamaño de partícula. Se ofrecen más orientaciones en el documento de orientación nº 39 (2).

Distribución granulométrica

20. Se controlará el tamaño de partícula en todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 3 μm , con una desviación típica geométrica (σ_g) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (4). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Así, por ejemplo, las partículas de los humos metálicos tienen un tamaño inferior al mencionado intervalo, mientras que las partículas con carga y las fibras pueden superarlo.

Preparación de la sustancia problema en un vehículo

21. En condiciones ideales, la sustancia problema debería estudiarse sin ningún vehículo. Si es necesario emplear un vehículo para generar una concentración de sustancia problema y un tamaño de partícula adecuados, se le dará preferencia al agua. Siempre que una sustancia problema se disuelva en un vehículo, debe demostrarse su estabilidad.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Caudal de aire de la cámara

22. El caudal de aire de la cámara de exposición se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión en tiempo real de la concentración atmosférica (o la estabilidad temporal) del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de la inhalación que resultan de interés. Si la concentración se supervisa en tiempo real, es posible reducir la frecuencia de medición del caudal de aire limitándola a una sola medición por exposición y día. Habrá que tomar especiales precauciones para evitar la reinspiración en las cámaras de solo por la nariz. La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no se van a conseguir estos valores de referencia, habrá que determinar las concentraciones de ambos gases. Si las mediciones del primer día de exposición revelan que estos gases están presentes a las concentraciones adecuadas, no serán necesarias nuevas determinaciones.

Temperatura y humedad relativa de la cámara

23. La temperatura de la cámara se mantendrá en $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Siempre que sea posible, la humedad relativa presente en la zona de respiración de los animales, tanto en las exposiciones de solo por la nariz como de cuerpo entero, se supervisará de manera continua y se registrará cada hora durante la exposición. La humedad relativa debe mantenerse preferiblemente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia con el método de ensayo).

Sustancia problema: concentración nominal

24. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara de inhalación. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en la generación de la atmósfera.

Sustancia problema: concentración real

25. La concentración real es la concentración de sustancia problema comprobada por muestreo en la zona de respiración de los animales en una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior valoración analítica) o bien con métodos inespecíficos como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia problema. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material aerotransportado es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, en estado aerotransportado) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trata de productos en forma de aerosol capaces de evaporarse o sublimarse, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases.
26. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema a lo largo de todo el estudio, lote que se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa del pico, peso molecular determinado mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gases y otras determinaciones. Si bien la identidad de la muestra de ensayo no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).
27. La atmósfera de exposición debe mantenerse constante en la medida de lo posible. Para demostrar la estabilidad de las condiciones de exposición se puede usar un equipo de supervisión en tiempo real, como un fotómetro de proceso para aerosoles o un analizador de hidrocarburos totales para análisis de vapores. La concentración real presente en la cámara deberá medirse al menos 3 veces por cada nivel y día de exposición. Pero si ello no es posible debido a un caudal de aire limitado o a que las concentraciones son bajas, se acepta una muestra por período de exposición. En ese caso, lo ideal es recoger la muestra durante todo el período de exposición. Las concentraciones individuales medidas en la cámara no deben desviarse de la concentración media en más de un $\pm 10\%$ cuando se trata de gases y vapores, ni en más de un $\pm 20\%$ en el caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y documentará el tiempo de equilibrio (t_{95}) de la cámara. La duración de una exposición incluye el tiempo durante el cual se genera la sustancia problema. Este abarca los tiempos transcurridos hasta alcanzar el equilibrio en la cámara (t_{95}) y hasta la extinción. Se ofrecen indicaciones para el cálculo de t_{95} en el documento de orientación nº 39 (2).
28. Cuando se manejan mezclas muy complejas formadas por gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos fabricados con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación. Por consiguiente, se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente el componente activo principal de la mezcla, para cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla total y no solo de la sustancia indicadora o el componente activo (analito). Se ofrece más información sobre las concentraciones reales en el documento de orientación nº 39 (2).

Sustancia problema: distribución granulométrica

29. La distribución granulométrica de los aerosoles debe determinarse al menos con periodicidad semanal por cada nivel de concentración, con ayuda de un impactador de cascada o un aparato alternativo, como un medidor del tamaño aerodinámico de partícula (APS). Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio.
30. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de purga, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis granulométrico tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración en masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase el documento GD 39 (2)]. Si es posible demostrar su equivalencia para todas las concentraciones analizadas en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir el ensayo.
31. Se controlará el tamaño de partícula en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases.

OBSERVACIONES

32. Los animales se someterán a observación clínica frecuente antes, durante y después del período de exposición. Pueden estar indicadas observaciones más frecuentes, dependiendo de la respuesta de los animales durante la exposición. Cuando la observación de los animales esté dificultada por el uso de tubos de sujeción, por la escasa iluminación de las cámaras de cuerpo entero o por la opacidad ambiental, se someterán a observación minuciosa después de la exposición. Las observaciones realizadas con anterioridad a la exposición del día siguiente permiten determinar la posible reversibilidad o exacerbación de los efectos tóxicos.
33. Todas las observaciones se registrarán en fichas individuales de cada animal. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.
34. Las observaciones fuera de la jaula deberían incluir los cambios en la piel, pelo, ojos y membranas mucosas; los cambios en los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipó/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento. En el protocolo del estudio se pueden incluir otras evaluaciones del tipo de pruebas cinéticas, biovigilancia, pruebas de la función pulmonar, retención de materiales escasamente solubles que puedan acumularse en el tejido pulmonar y cambios comportamentales.

PESO CORPORAL

35. Se registrará el peso de cada animal poco antes de la primera exposición (día 0), y después dos veces por semana (por ejemplo, los viernes y lunes para demostrar la recuperación durante un fin de semana sin exposición, o con un intervalo que permita evaluar la toxicidad sistémica) y en el momento de la muerte o la eutanasia. Si no se observan efectos en las 4 primeras semanas, el peso corporal se podrá registrar semanalmente durante el resto del estudio. Si se utilizan animales satélite (reversibilidad), se seguirán pesando semanalmente durante todo el período de recuperación. Al concluir el estudio, se pesarán todos los animales poco antes del sacrificio para permitir calcular sin sesgos la relación entre el peso de los órganos y el peso corporal.

CONSUMO DE AGUA Y DE ALIMENTOS

36. El consumo alimentario se medirá cada semana. También se puede medir el consumo de agua.

PATOLOGÍA CLÍNICA

37. Deben hacerse evaluaciones de patología clínica en todos los animales, incluidos los testigo y los satélite (reversibilidad), cuando sean sacrificados. Se registrará el intervalo de tiempo transcurrido entre el final de la exposición y la toma de muestras de sangre, particularmente si la recuperación del parámetro valorado es rápida. Está indicado obtener muestras al final del período de exposición cuando se trata de parámetros con una semivida plasmática corta (por ejemplo, COHb, CHE y MetHb).
38. En el cuadro 1 se recogen los parámetros de patología clínica que se suelen exigir en todos los estudios toxicológicos. El análisis de orina no es necesario hacerlo de forma sistemática, sino solo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos. El director del estudio puede decidir la evaluación de otros parámetros para caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema (colinesterasa, lípidos, hormonas, equilibrio ácido-base, metahemoglobina o cuerpos de Heinz, creatina-cinasa, cociente mieloide/eritroide, troponinas, gases en sangre arterial, lactato-deshidrogenasa, sorbitol-deshidrogenasa, glutamato-deshidrogenasa y gamma-glutamil-transpeptidasa).

Cuadro 1
Parámetros de patología clínica habituales

Hematología	
Recuento de eritrocitos	Recuento de leucocitos
Hematocrito	Fórmula leucocitaria
Concentración de hemoglobina	Recuento de plaquetas
Hemoglobina corpuscular media	Capacidad de coagulación (seleccionar una):
Volumen corpuscular medio	— Tiempo de protrombina
Concentración de hemoglobina corpuscular media	— Tiempo de coagulación
Reticulocitos	— Tiempo de tromboplastina parcial

Bioquímica clínica

Glucosa (*)	Alanina-aminotransferasa
Colesterol total	Aspartato-aminotransferasa
Triglicéridos	Fosfatasa alcalina
Nitrógeno ureico en sangre	Potasio
Bilirrubina total	Sodio
Creatinina	Calcio
Proteínas totales	Fósforo
Albúmina	Cloruros
Globulinas	

Análisis de orina (opcional)

Aspecto (color y turbidez)	Proteínas totales
Volumen	Glucosa
Densidad y osmolalidad	Sangre/células sanguíneas
pH	

(*) Puesto que un período de ayuno prolongado puede introducir un sesgo en las determinaciones de glucosa entre los animales testigo y los tratados, el director del estudio decidirá si es apropiado o no imponer dicho ayuno a los animales. Si se impone un período de ayuno, será acorde a la especie empleada; para las ratas puede ser de 16 horas (ayuno desde la víspera). La determinación de la glucosa en ayunas puede hacerse previo ayuno desde la víspera durante la última semana de exposición, o bien previo ayuno desde la víspera antes de proceder a la autopsia (en este último caso, con la determinación de los restantes parámetros de patología clínica).

39. Cuando hay indicios de que las vías respiratorias bajas (alvéolos) son el lugar principal de depósito y retención, el lavado broncoalveolar (BAL) puede ser la técnica de elección para analizar cuantitativamente los parámetros hipotéticamente dependientes de la dosis relacionados con la aparición de alveolitis, inflamación pulmonar y fosfolipidosis. Ello permite demostrar debidamente la relación dosis-respuesta y la evolución en el tiempo del daño alveolar. En el fluido BAL se pueden analizar el recuento de leucocitos y la fórmula leucocitaria, las proteínas totales y la lactato-deshidrogenasa. Otros parámetros dignos de tener en cuenta son los indicadores de daño lisosomal, fosfolipidosis, fibrosis e inflamación alérgica o irritativa, como puede ser la determinación de las citocinas o quimiocinas proinflamatorias. Generalmente, las determinaciones realizadas en el BAL son complementarias de los resultados del examen histopatológico, pero no pueden sustituirlos. En el documento GD 39 (2) se facilitan indicaciones sobre el modo de realizar un lavado pulmonar.

EXAMEN OFTALMOLÓGICO

40. Con ayuda de un oftalmoscopio o instrumento equivalente, se realizarán exploraciones oftalmológicas del fondo de ojo, los medios refringentes, el iris y la conjuntiva de todos los animales antes de la administración de la sustancia problema, y del grupo sometido a concentración más elevada al concluir el estudio. Si se aprecian alteraciones oculares, se examinará a todos los animales, incluidos los del lote satélite (de reversibilidad).

ANATOMÍA PATOLÓGICA MACROSCÓPICA Y PESO DE LOS ÓRGANOS

41. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminan del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a autopsia macroscópica. Se documentará el tiempo transcurrido entre el final de la última exposición de cada animal y su sacrificio. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de descubrir la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a una temperatura suficientemente baja para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención en las alteraciones de las vías respiratorias.

42. En el cuadro 2 se indican los órganos y tejidos que durante la autopsia macroscópica deben conservarse en un medio idóneo para su examen histopatológico. La conservación de los órganos y tejidos entre corchetes, así como de cualquier otro órgano o tejido, se hará a criterio del director del estudio. Los órganos destacados **en negrita** se deben limpiar de adherencias y pesar lo antes posible después de la disección para evitar su desecación. El tiroides y los epidídimos solo se pesarán en caso necesario, porque los artefactos debidos a las adherencias pueden dificultar la evaluación histopatológica. Los tejidos y órganos se fijan en formol con amortiguador al 10 % o en otro fijador apropiado inmediatamente después de la autopsia, dejando pasar un mínimo de 24-48 horas antes de la limpieza de adherencias, dependiendo del fijador empleado.

Cuadro 2

Órganos y tejidos conservados durante la autopsia macroscópica

Cápsulas suprarrenales	Esófago
Aorta	[Bulbo olfativo]
Médula ósea (y/o aspirado reciente)	Ovarios
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia)	Páncreas
Intestino ciego	Glándulas paratiroides
Colon	Nervios periféricos (ciático o tibial, preferiblemente próximos al músculo)
Duodeno	Hipófisis
[Epidídimos]	Próstata
[Ojos (retina, nervio óptico) y párpados]	Recto
Fémur y articulación tibiofemoral	Glándulas salivales
Vesícula biliar (de estar presente)	Vesículas seminales
[Glándula de Harder]	Piel
Corazón	Médula espinal (cervical, medio-dorsal y lumbar)
Íleo	Bazo
Yeyuno	Esternón
Riñones	Estómago
[Glándulas lacrimales (extraorbitarias)]	Dientes
Laringe (3 secciones, incluida la base de la epiglótis)	Testículos
Hígado	Timo
Pulmón (todos los lóbulos en una sección de corte, incluidos los bronquios primarios)	Glándula tiroides
Ganglios linfáticos de la región hilar del pulmón, especialmente cuando se estudian sustancias problema particuladas escasamente solubles. Si se trata de exámenes más minuciosos o de carácter inmunológico, pueden tomarse en consideración otros ganglios linfáticos, por ejemplo de las regiones mediastínica, cervical/submandibular o auricular.	[Lengua]
Ganglios linfáticos (distales de la vía de acceso)	Tráquea (como mínimo 2 secciones, 1 longitudinal que pase por la carina traqueal y 1 sección transversal)
Glándulas mamarias (femeninas)	[Uréteres]
Músculo (muslo)	[Uretra]
Tejidos nasofaríngeos [como mínimo 4 secciones; una sección incluirá el conducto nasofaríngeo y el tejido linfóide asociado a la nariz (Nasal Associated Lymphoid Tissue, NALT)]	[Vejiga urinaria]
	Útero
	Órganos diana
	Todas las masas y lesiones macroscópicas

43. El pulmón se debe extraer intacto, pesar e instilar con un fijador apropiado a una presión de 20-30 cm de agua para asegurar el mantenimiento de la estructura pulmonar (5). Se preparan cortes de todos los lóbulos a un solo nivel, incluyendo los bronquios primarios, pero, si se practica un lavado pulmonar, el lóbulo no lavado se seccionará a tres niveles (no en cortes seriados).

44. Deben examinarse como mínimo 4 secciones de los tejidos nasofaríngeos, una de las cuales incluirá el conducto nasofaríngeo (5) (6) (7) (8) (9) para permitir una observación adecuada de los epitelios escamoso, transicional (respiratorio no ciliado) y olfativo, y el tejido de drenaje linfático (NALT) (10) (11). Se examinarán tres secciones de la laringe, una de las cuales debe incluir la base de la epiglotis (12). Deben examinarse como mínimo 2 secciones de la tráquea, entre ellas un corte longitudinal que pase por la carina de bifurcación de los bronquios extrapulmonares y un corte transversal.

EXAMEN HISTOPATOLÓGICO

45. La evaluación histopatológica de todos los órganos y tejidos mencionados en el cuadro 2 se llevará a cabo en el lote de control y en el de concentración más elevada, así como en todos los animales que mueran o sean sacrificados durante el estudio. Se prestará especial atención a las vías respiratorias, los órganos diana y las lesiones macroscópicas. Aquellos órganos y tejidos que presenten lesiones en el lote de concentración más elevada se examinarán en todos los grupos. Con objeto de demostrar una clara relación concentración-respuesta, el director del estudio puede decidir la realización de evaluaciones histopatológicas en otros lotes. Si se utiliza un lote satélite (reversibilidad), debe hacerse un examen histopatológico de todos los órganos y tejidos que presenten efectos en los lotes tratados. Si en el lote de exposición elevada se producen muertes prematuras u otras dificultades que comprometan la interpretación de los datos, se practicarán evaluaciones histopatológicas en el lote de la concentración inmediatamente inferior. Se procurará correlacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

DATOS E INFORME

Datos

46. Se documentarán los datos de cada animal referentes a peso corporal, consumo de alimento, patología clínica, anatomía patológica macroscópica, peso de los órganos e histopatología. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la autopsia. Todos los resultados, cuantitativos y fortuitos, se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido; los métodos estadísticos aplicados deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

Informe del ensayo

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

Animales de experimentación y zootecnía

- Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.
- Especie o variedad empleada y justificación del uso de una especie distinta de la rata. Podrán indicarse la procedencia y los datos previos, siempre que correspondan a animales sometidos a condiciones parecidas de exposición, alojamiento y alimentación.
- Número, edad y sexo de los animales.
- Método de asignación al azar.
- Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

Sustancia problema

- Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).
- Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

Vehículo

- Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).
- Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

Cámara de inhalación

- Descripción pormenorizada de la cámara de inhalación, incluido el volumen, y acompañada de un diagrama.
- Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.
- Instrumental empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.
- Fuente del aire y sistema de acondicionamiento.
- Métodos de calibración del instrumental para garantizar una atmósfera experimental homogénea.
- Diferencia de presión (positiva o negativa).
- Puertos de exposición por cámara (solo por la nariz); ubicación de los animales en la cámara (de cuerpo entero).
- Estabilidad de la atmósfera experimental.
- Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.
- Tratamiento del aire suministrado/extraído.
- Caudales de aire, caudal de aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).
- Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (t_{95}) en la cámara de inhalación.
- Número de variaciones de volumen por hora.
- Dispositivos de dosificación (si procede).

Datos relativos a la exposición

- Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.
- Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).
- Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que dan lugar a formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada una de ellas por separado.
- Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (mg/l, mg/m³, etc.) y no en unidades de volumen (ppm, ppmm, etc.).
- Distribución granulométrica, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica (σ_g), incluidos los correspondientes métodos de cálculo. Se documentarán los análisis granulométricos individuales.

Condiciones del ensayo

- Descripción pormenorizada de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de las materias sólidas o preparar soluciones de la sustancia problema.
- Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.
- Descripción pormenorizada del instrumental empleado para controlar la temperatura, la humedad y el caudal de aire de la cámara (creación de una curva de calibración).
- Descripción pormenorizada del equipo empleado para tomar las muestras con el fin de medir la concentración de la cámara y la distribución por tamaño de partícula.
- Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficiencia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).

- Método aleatorio de asignación de los animales a los lotes de exposición y de control (testigo).
- Pormenores de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo/origen de la alimentación y el origen del agua).
- Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

Resultados

- Tabulación de los valores de temperatura, humedad y caudal de aire de la cámara.
- Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.
- Tabulación de los datos de granulometría, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, distribución granulométrica y cálculos de MMAD y σ_g .
- Tabulación de las respuestas y de los niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad, momento de aparición y duración de los efectos).
- Tabulación de los pesos de los animales individuales.
- Tabulación del consumo de alimentos.
- Tabulación de los datos de patología clínica.
- Resultados de la autopsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

Evaluación e interpretación de los resultados

- Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para satisfacer los criterios del presente método de ensayo como, por ejemplo, la concentración límite o el tamaño de partícula.
- Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplen los criterios relativos al tamaño de partícula.
- En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.
- Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.
- Se facilitará una explicación de por qué ha sido preciso sacrificar de forma compasiva los animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre parámetros de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (3).
- Se identificarán el órgano o los órganos diana.
- Se determinarán los valores de NOAEL y LOAEL.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (4) Whalan E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

- (5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.
- (6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309-312.
- (7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. *Environ. Health Perspect.* 85: 231-238.
- (8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) *Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series*, Raven Press, New York, 215-263.
- (9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353-372.
- (10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219-224.
- (11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140-141: 281-285.
- (12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419-428.
- (13) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

B.30. ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 452 de la OCDE (2009). Las TG 452 originales fueron adoptadas en 1981. Se consideró necesario adaptar este método de ensayo B.30 para dar cuenta de los avances recientes en materia de bienestar animal que plantean nuevas necesidades normativas (1) (2) (3) (4). La actualización de este método de ensayo B.30 se ha realizado en paralelo con las revisiones de los capítulos del presente anexo B.32. Ensayo de carcinogénesis y B.33. Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis, con el fin de obtener más información acerca de los animales utilizados en el estudio y recabar nuevos datos sobre la selección de las dosis. El presente método de ensayo ha sido diseñado para el estudio de una amplia gama de sustancias, incluso plaguicidas y productos químicos industriales.
2. La mayoría de los ensayos de toxicidad crónica se realizan con especies de roedores, por lo que este método de ensayo se ha diseñado básicamente para el estudio de dichas especies. Cuando fuere preciso realizar estos ensayos en especies no roedoras, serán así mismo de aplicación los principios y procedimientos descritos en este método de ensayo, además de los descritos en el capítulo B.27 del presente anexo, Ensayo de toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores (5), con las debidas modificaciones, tal como se especifica en el documento de orientación nº 116 de la OCDE sobre diseño y realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (6).
3. Las tres vías de administración principales que se estudian en los ensayos de toxicidad crónica son la oral, la cutánea y la inhalatoria. La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía de exposición predominante en seres humanos. Se ofrece más información sobre la vía de exposición en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (6).
4. El presente método de ensayo centra el interés en la exposición por vía oral, la más frecuentemente usada en los estudios de toxicidad crónica. Si bien los estudios de toxicidad crónica a largo plazo que entrañan la exposición por vía cutánea o inhalatoria pueden ser igualmente necesarios en la evaluación del riesgo para la salud humana o en determinados marcos legislativos, estas dos vías de exposición plantean una complejidad técnica considerable. Tales estudios tendrán que diseñarse según cada caso; sin embargo, el método de ensayo que aquí se describe para la determinación y evaluación de la toxicidad crónica por administración oral podría sentar las bases de un protocolo para los estudios de toxicidad por inhalación o absorción dérmica en lo que se refiere a recomendación de períodos de tratamiento, parámetros clínicos e histopatológicos, etc. La OCDE dispone de documentación de orientación sobre la administración de las sustancias problema por inhalación (6) (7) y por vía cutánea (6). Para el diseño de estudios a más largo plazo que contemplan la exposición por vía inhalatoria deben consultarse específicamente los capítulos B.8 (8) y B.29 (9) del presente anexo, además del documento de orientación de la OCDE sobre estudios de toxicidad aguda por inhalación (7). Cuando se trate de estudios que contemplen la vía cutánea se consultará el capítulo B.9 (10) del presente anexo.
5. Un ensayo de toxicidad crónica proporciona información sobre el peligro para la salud que supone la exposición continuada de la especie estudiada durante una parte considerable de su ciclo vital. El estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos de la sustancia problema; indica los órganos diana y la posibilidad de acumulación. Puede proporcionar además una estimación del nivel máximo sin efectos adversos observados, que puede ser útil para establecer los criterios de seguridad de la exposición humana. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible.
6. Los objetivos de los estudios realizados según este método de ensayo son:
 - la identificación de la toxicidad crónica de una sustancia problema,
 - la identificación de los órganos diana,
 - la caracterización de la relación dosis-respuesta,
 - la identificación del nivel máximo sin efectos adversos observados (NOAEL), o punto de partida para determinar una dosis de referencia (Benchmark Dose, BMD),
 - la predicción de los efectos de toxicidad crónica que se producirán a los niveles de exposición humana,
 - la recopilación de datos para investigar las hipótesis referentes al mecanismo de acción (6).

CONSIDERACIONES INICIALES

7. En la determinación y evaluación de las características toxicológicas de una sustancia problema, el laboratorio de ensayo deberá tener en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia química antes de emprender el estudio, para así poder centrarse de manera más eficaz en la toxicidad crónica potencial y minimizar el uso de animales. En el diseño del estudio serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema; cualquier información referente al mecanismo de acción; los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo*; el uso o los usos previstos y la exposición humana potencial; los datos de (Q)SAR previos y los datos toxicológicos sobre sustancias estructuralmente afines; los datos toxicocinéticos disponibles (cinética de dosis única y, en su caso, de acumulación por dosis repetidas) y los datos derivados de otros estudios de exposición continuada. La determinación de la toxicidad crónica solo debe emprenderse una vez que se ha recabado la información toxicológica inicial en los ensayos de toxicidad por administración repetida durante 28 días y/o 90 días. Se hará un planteamiento escalonado de los estudios de toxicidad crónica como parte de la evaluación global de los potenciales efectos adversos que puede tener para la salud una sustancia determinada (11) (12) (13) (14).
8. Antes de iniciar el estudio se establecerán los métodos estadísticos más adecuados para el análisis de los resultados, en función del diseño y de los objetivos experimentales. Una cuestión importante es si la evaluación estadística debe incorporar ajustes de la supervivencia y los análisis en caso de terminación prematura de uno o varios lotes. Se ofrecen orientaciones para realizar el análisis estadístico adecuado y referencias a los métodos estadísticos internacionalmente aceptados en el documento de orientación (GD) nº 116 (6) y en el GD nº 35 sobre análisis y evaluación de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (15).
9. Cuando se efectúa un estudio de toxicidad crónica, son de aplicación los principios y consideraciones recogidos en el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, la evaluación y la aplicación de los signos clínicos con criterios compasivos en los animales experimentales que se usan para evaluar la seguridad (16), en particular su punto 62. Dicho punto especifica que en los estudios de administración continuada, cuando un animal muestre signos clínicos progresivos que entrañen un deterioro creciente de su estado, habrá que decidir con conocimiento de causa si se sacrifica de forma compasiva. La decisión sopesará el valor de la información que puede obtenerse si se mantiene al animal en el estudio frente al desgaste de su estado general. Si se decide mantener al animal en el ensayo, se aumentará la frecuencia de las observaciones en la medida necesaria. Cabe también la posibilidad de, sin perjudicar a los fines de la investigación, suspender temporalmente la administración para aliviar el dolor o sufrimiento, o reducir la dosis experimental.
10. Se ofrecen orientaciones y comentarios detallados sobre los principios que deben orientar la selección de la dosis en los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 (6) y en dos publicaciones del International Life Sciences Institute (17) (18). El núcleo de la estrategia de selección de la dosis depende del objetivo o los objetivos principales del estudio (punto 6). Al elegir un intervalo posológico adecuado, debe buscarse un equilibrio entre el cribado de los peligros, por un lado, y la caracterización de las respuestas ante dosis bajas y su importancia, por otro. Ello tiene especial trascendencia cuando se proyecta (punto 11) un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 del presente anexo).
11. Se considerará la posibilidad de efectuar un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) en lugar de realizar por separado un ensayo de toxicidad crónica (presente método de ensayo B.30) y un ensayo de carcinogénesis (capítulo B.32 de este anexo). El ensayo combinado permite una mayor eficiencia que los estudios separados en términos de tiempo y costes, sin comprometer la calidad de los datos ni en la fase de toxicidad crónica ni en la fase de carcinogénesis. Sin embargo, cuando se emprenda un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) habrá que considerar detenidamente los principios de la selección de la dosis (puntos 9 y 20-25) y, por otro lado, se entiende que determinados marcos legislativos pueden imponer la realización de ensayos separados.
12. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento GD 116 (6).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

13. La sustancia problema se administra diariamente en dosis escalonadas a varios lotes de animales experimentales, normalmente durante un período de 12 meses, si bien este puede reducirse o prolongarse en función de los requisitos normativos (véase el punto 33). Dicho período se ha seleccionado por ser suficientemente largo para permitir que se manifiesten los eventuales efectos de toxicidad acumulativa, pero sin que se confundan con las alteraciones geriátricas. Toda desviación de este período de exposición de 12 meses deberá justificarse, particularmente si es en el sentido de acortarlo. La sustancia problema se administra generalmente por vía oral, aunque también se aceptan las vías inhalatoria y cutánea. El diseño del estudio puede contemplar el sacrificio de uno o más animales durante el ensayo, por ejemplo a los 3 y a los 6 meses, y a tal efecto se podrán prever lotes complementarios de animales (véase el punto 19). A lo largo del período de administración, se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

14. El presente método de ensayo se destina principalmente a la evaluación de la toxicidad crónica en roedores (véase el punto 2), si bien se acepta que en determinados marcos legislativos puedan hacerse estudios parecidos en especies no roedoras. Se justificará la elección de la especie. El diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica en especies no roedoras, cuando proceda, se basará en los principios que se recogen en el presente método de ensayo y en el capítulo B.27 de este anexo, Toxicidad oral por administración continuada (28 días) en no roedores (5). Se ofrece más información sobre la elección de la especie y la cepa de laboratorio en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (6).
15. La especie recomendada en este método de ensayo es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Las ratas y los ratones se prefieren como modelos experimentales debido a su ciclo vital relativamente corto, su amplia utilización en los estudios farmacológicos y toxicológicos, su sensibilidad a la inducción tumoral y la disponibilidad de cepas de laboratorio suficientemente caracterizadas. Debido a todas estas características, se ha podido hacer un gran acopio de información acerca de su fisiología y anatomopatología. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos de una variedad de laboratorio de uso habitual. El estudio de toxicidad crónica debe efectuarse en animales de la misma variedad y procedencia que los usados en el estudio o los estudios preliminares de toxicidad de más breve duración. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas.

Condiciones de alojamiento y alimentación

16. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo; el enjaulamiento individual se considerará solo si está científicamente justificado (19) (20) (21). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La dieta debe satisfacer todas las necesidades nutricionales de la especie estudiada, y se mantendrá en el mínimo posible su contenido en contaminantes alimentarios, entre otros los residuos de plaguicidas, contaminantes orgánicos persistentes, fitoestrógenos, metales pesados y micotoxinas que pudieran influir en los resultados experimentales. La información analítica sobre el contenido de nutrientes y contaminantes alimentarios se consignará de forma periódica, como mínimo al inicio del estudio y cada vez que se varíe el lote de producto empleado, y se documentará en el informe final. Así mismo se consignará la información analítica sobre el agua de bebida empleada en el estudio. Cuando la sustancia problema se administra con el alimento, la elección de la dieta se basa en la necesidad de conseguir una mezcla apropiada de la sustancia problema y de satisfacer al mismo tiempo las necesidades nutricionales de los animales.

Preparación de los animales

17. Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 7 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. En el caso de los roedores, la administración comenzará lo antes posible tras su destete y aclimatación, preferiblemente antes de que los animales cumplan 8 semanas de edad. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad de los, animales de experimentación. La diferencia de peso entre los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Despues de la asignación al azar, no debe haber diferencias significativas entre los grupos en las medias de peso corporal de cada sexo. De observarse diferencias estadísticamente significativas, el proceso de asignación aleatoria a los grupos deberá repetirse en la medida de lo posible. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto, con el que se marca de manera permanente mediante tatuaje, implante de microchip o cualquier otro medio adecuado.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

18. Se emplearán animales de ambos性. Se empleará un número de individuos tal que al concluir el estudio queden suficientes animales en cada grupo para permitir una exhaustiva evaluación biológica y estadística. Tratándose de roedores, se emplean al menos 20 animales por sexo y lote en cada nivel de dosificación, mientras que en el caso de no roedores se recomienda un mínimo de 4 animales por sexo y lote. En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales en cada grupo de dosificación para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias.

Provisión de animales para el sacrificio durante el ensayo, los lotes satélite y los lotes centinela

19. Si está científicamente justificado, se podrán hacer provisiones para el sacrificio de animales (como mínimo 10 por sexo y lote) durante el ensayo, por ejemplo a los 6 meses, a fin de obtener información sobre la progresión de las alteraciones toxicológicas y sobre el mecanismo de acción. Si tal información ha sido ya proporcionada por estudios previos de toxicidad por administración repetida realizados con la misma sustancia problema, el sacrificio de animales durante el ensayo puede no estar científicamente justificado. Cabe la posibilidad de incluir lotes satélite para controlar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia

problema; generalmente, se limitan al lote del nivel de dosis más elevado del estudio y al lote testigo. Se podrá incluir además un lote de animales centinela (habitualmente 5 individuos de cada sexo) para supervisar su estado en cuanto a enfermedades, en caso necesario, durante el estudio (22). Si está previsto el sacrificio de animales durante el ensayo o la inclusión de lotes satélite o centinela, el diseño experimental se incrementará en el número de animales que vaya a ser sacrificado antes de que concluya el estudio. Estos animales se someten generalmente a las mismas observaciones (peso corporal, consumo de agua y alimentos, valoraciones de hematología y bioquímica clínica e investigaciones anatopatológicas) que los animales observados en la fase de toxicidad crónica del estudio principal, aunque se puede establecer que en los lotes que se sacrificuen durante el ensayo, se restrinja dicha evaluación a aspectos cruciales como la neurotoxicidad o la immunotoxicidad.

Grupos de dosis y posología

20. Se ofrecen indicaciones sobre todos los aspectos de la selección de la dosis y los intervalos entre las dosis en el documento de orientación nº 116 (6). Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control, salvo si se lleva a cabo un ensayo límite (véase el punto 27). Los niveles de dosis se basan generalmente en los resultados de los estudios de determinación del intervalo o realizados con dosis repetidas a corto plazo, y deben tener en cuenta los datos toxicológicos y toxicocinéticos de que se disponga en relación con la sustancia problema o con sustancias afines.
21. Salvo limitaciones impuestas por la naturaleza fisicoquímica o los efectos biológicos de la sustancia problema, el nivel de dosis más elevado se escogerá a fin de identificar los principales órganos diana y efectos tóxicos pero evitando una toxicidad intensa, el sufrimiento, la morbilidad o la muerte de los animales. Tomando en consideración los factores que se indican en el punto 22 que sigue, el nivel de dosis más elevado será tal que provoque signos de toxicidad, por ejemplo, manifestada por una merma de la ganancia de peso corporal (aproximadamente el 10 %).
22. Ahora bien, dependiendo de los objetivos del estudio (véase el punto 6), se puede establecer un techo de dosis inferior al nivel que provoque signos de toxicidad, por ejemplo si una dosis induce un efecto adverso de interés que, sin embargo, tiene escasa repercusión en el período de vida o el peso corporal. La dosis más elevada no debe exceder de 1 000 mg/kg peso corporal/día (dosis límite, véase el punto 27).
23. Los niveles de dosis y la frecuencia de administración serán tales que permitan establecer una relación dosis-respuesta y un valor de NOAEL o cualesquiera otras determinaciones previstas, como el valor de BMD o dosis de referencia más baja (véase el punto 25). Para establecer las dosis más bajas se tendrán en cuenta factores como la pendiente esperada de la curva dosis-respuesta, así como los niveles a los que cabe esperar cambios importantes en el metabolismo o en el mecanismo de la acción tóxica, cuando se prevea un umbral o que constituyan un punto de partida para extrapolar la dosis más baja.
24. La frecuencia de administración de las dosis dependerá de las características de la sustancia problema y no corresponde especificarla en este método de ensayo; los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 6-10) entre dosis. En general se evitará aplicar factores superiores a 10, que en todo caso deberán justificarse.
25. Tal como se recoge en el documento de orientación nº 116 (6), para la selección de las dosis se tendrán en cuenta los siguientes factores:
 - los intervalos supuestos o conocidos de no linealidad o puntos de inflexión en la relación dosis-respuesta,
 - la toxicocinética y los intervalos posológicos en los que pueda haber o no inducción metabólica, saturación o no linealidad entre la dosimetría externa e interna,
 - las lesiones precursoras, los marcadores de efecto o los indicadores de la intervención de los principales mecanismos biológicos subyacentes,
 - aspectos importantes (hipotéticos o comprobados) del modo de acción, como la dosis a partir de la cual se manifiesta toxicidad, los niveles hormonales que resultan afectados, los mecanismos homeostáticos que se alteran, etc.,
 - aquellas regiones de la curva dosis-respuesta en las que se precisa hacer una estimación especialmente robusta, como el intervalo de la dosis de referencia prevista o el umbral hipotético,
 - los niveles de exposición humana que cabe prever.
26. Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia problema, pero sí el vehículo de la misma en caso de que se utilice. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. En su caso, el lote de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia problema se administra con los alimentos y provoca una disminución importante de la ingesta debido a que empeoran las características organolépticas de la dieta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para conseguir una comparación más rigurosa.

27. Si sobre la base de los estudios preliminares es posible prever que, en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1 000 mg/kg peso corporal/día y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio, no se produce ningún efecto adverso observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. Se puede establecer un límite de 1 000 mg/kg peso corporal/día, salvo si la exposición humana previsible indica la necesidad de emplear un nivel de dosis más elevado.

Preparación de las dosis y administración de la sustancia problema

28. La sustancia problema se administra habitualmente por vía oral, mediante sonda o con el alimento o el agua de bebida. Se ofrece más información sobre las vías y los métodos de administración en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (6). La vía y el método de administración dependerán de la finalidad del estudio, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, su biodisponibilidad y la vía y el modo de exposición predominantes en los seres humanos. Se justificará debidamente la vía y el método de administración elegidos. Por razones de bienestar animal, la alimentación oral por sonda se elegirá solo cuando exista una posibilidad razonable de que la exposición humana a la sustancia química se vaya a producir por la misma vía y el mismo medio de administración (como es el caso de los productos farmacéuticos). Cuando se trata de sustancias alimentarias o ambientales, entre ellas los plaguicidas, la administración se efectúa habitualmente con los alimentos o el agua de bebida. Sin embargo, en otros escenarios de estudio, como la exposición ocupacional, puede ser más conveniente la administración por otras vías.
29. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema, efectos sobre las propiedades químicas de dicha sustancia que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Se recabará información acerca de la estabilidad de la sustancia problema y su homogeneidad de concentración en las disoluciones o en las dietas (en su caso) que se emplean para la administración.
30. Si la sustancia problema se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. En los estudios de toxicidad a largo plazo en los que la sustancia problema se administra con los alimentos, su concentración no debe superar generalmente el límite del 5 % de la ingesta total para evitar desequilibrios nutricionales. Cuando la sustancia problema se administra con los alimentos, se puede usar una concentración constante en la dieta (mg/kg de alimento o ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal (mg/kg peso corporal), calculada con periodicidad semanal. Deberá indicarse qué alternativa se ha seguido.
31. En el caso de la administración oral, las dosis de la sustancia problema se administran diariamente a los animales (siete días por semana), en general por un período de 12 meses (véase también el punto 33), si bien los requisitos normativos pueden imponer una duración mayor. Cualquier otra pauta posológica, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. En el caso de la administración cutánea, los animales se tratan con la sustancia problema como mínimo 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana, según se especifica en el capítulo B.9 del presente anexo (10), durante un período de 12 meses. La exposición por vía inhalatoria se efectúa durante 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana pero, si se justifica, es admisible una pauta de 5 días por semana. El período de exposición será habitualmente de 12 meses. Cuando se exponen con la técnica de solo la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificará debidamente cualquier período de exposición inferior a 6 horas diarias. Véase también el capítulo B.8 del presente anexo (8).
32. Si la sustancia problema se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada y todos los días a la misma hora. La dosis única se administra normalmente una vez al día; pero si la sustancia problema es un irritante local, cabe la posibilidad de mantener la dosis total diaria repartiendo la administración en dosis divididas (dos veces al día). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen se mantendrá en el mínimo posible, y en los roedores no debe exceder generalmente de 1 ml/100 g peso corporal (22). La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Constituyen una excepción las sustancias potencialmente corrosivas o irritantes, que deben diluirse para evitar efectos locales graves. Se evitará la administración de concentraciones que puedan ser corrosivas o irritantes del tubo digestivo gastrointestinal.

Duración del estudio

33. Si bien este método de ensayo ha sido diseñado principalmente como estudio de toxicidad crónica durante 12 meses, su diseño permite aplicarlo a ensayos de duración menor (6 o 9 meses) o mayor (18 o 24 meses), en función de los requisitos normativos particulares o de los mecanismos específicos que se pretenda investigar. Toda desviación de este período de exposición de 12 meses deberá justificarse, particularmente si es en el sentido de acortarlo. Concluida la exposición, los lotes satélite incluidos para comprobar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema deben mantenerse sin administración durante un período no inferior a 4 semanas ni superior a un tercio de la duración total del estudio. Se ofrecen más indicaciones, entre otras, sobre la supervivencia en el estudio en el documento de orientación nº 116 (6).

OBSERVACIONES

34. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración cuando esta se haga por sonda.
35. Se someterán todos los animales a observación clínica exhaustiva como mínimo antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto), al concluir la primera semana de estudio y, en lo sucesivo, con periodicidad mensual. El protocolo de tales observaciones se organizará con el fin de minimizar las variaciones entre los observadores individuales y entre los distintos lotes experimentales. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila y respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (24).
36. Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado a todos los animales antes de administrar la sustancia problema. Al concluir el estudio, el mismo examen se practicará preferiblemente a todos los animales y, obligatoriamente, a los lotes de control y de dosis más elevada. Si se observan en esos animales cambios oculares relacionados con el tratamiento, deben examinarse todos los demás. Si el análisis estructural o cualquier otra información indica toxicidad oftálmica, se aumentará la frecuencia de las exploraciones oftalmológicas.
37. Cuando se trate de sustancias para las que estudios previos de toxicidad por administración repetida durante 28 días o 90 días hayan demostrado efectos neurotóxicos, las pruebas de reactividad sensorial a estímulos de diferentes tipos (24) [por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos (25) (26) (27)], así como la evaluación de la fuerza prensil (28) y de la actividad motriz (29), podrán hacerse facultativamente antes de iniciar el estudio, a intervalos de 3 meses durante el mismo hasta un máximo de 12 meses inclusive, y a la conclusión del estudio (si dura más de 12 meses). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.
38. Cuando los estudios previos de toxicidad por administración continuada durante 28 días o 90 días indiquen que la sustancia tiene capacidad inmunotóxica, al concluir el estudio se podrán proseguir las investigaciones de este parámetro.

Peso corporal, consumo de alimentos y agua y eficiencia alimentaria

39. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán la ingesta de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará así mismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

Hematología y bioquímica clínica

40. En las investigaciones realizadas con roedores, se practicarán exámenes hematológicos como mínimo en 10 machos y 10 hembras de cada grupo, siempre los mismos, a los 3, 6 y 12 meses y al concluir el estudio (si dura más de 12 meses). En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales satélite para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias (véase el punto 18). Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras más pequeñas de animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros hematológicos en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardíaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia.
41. Se investigarán los siguientes parámetros (30): recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de eritrocitos y de plaquetas, concentración de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada. Pueden determinarse además otros parámetros hematológicos como los cuerpos de Heinz, la morfología de otros eritrocitos atípicos o los valores de metahemoglobina, en función de la toxicidad de la sustancia problema. El planteamiento general ha de ser flexible, y adaptado a los efectos observados o esperados de la sustancia problema. Si esta ejerce efectos sobre el sistema hematopoyético, pueden estar indicados recuentos de reticulocitos y una citología de la médula ósea, que no son valoraciones habituales.

42. En los intervalos de tiempo especificados para determinar las variables hematológicas, se realizarán análisis de bioquímica clínica para investigar los principales efectos tóxicos sobre los tejidos y, específicamente, sobre los riñones y el hígado como mínimo en 10 machos y 10 hembras de cada grupo, siempre los mismos. En el caso de los ratones, pueden hacer falta animales satélite para efectuar todas las valoraciones necesarias de bioquímica clínica. Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras de menos animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros de bioquímica clínica en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Se recomienda que los animales (a excepción de los ratones) guarden ayuno desde el día anterior a la extracción de las muestras de sangre. Se investigarán los siguientes parámetros (30): glucosa, urea (nitrógeno ureico), creatinina, proteínas totales, albúmina, calcio, sodio, potasio, colesterol total, al menos dos pruebas completas de la función hepatocelular (alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, glutamato-deshidrogenasa, ácidos biliares totales) (31) y al menos dos pruebas completas de la función hepatobiliar (fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltransferasa, 5'-nucleotidasa, bilirrubina total, ácidos biliares totales) (31). Cuando proceda y a tenor de la toxicidad de la sustancia problema, pueden hacerse otras valoraciones de bioquímica clínica como las de triglicéridos en ayunas, hormonas específicas y colinesterasa. Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de los efectos observados o esperados con una sustancia química determinada.
43. Se practicarán análisis de orina como mínimo en 10 machos y 10 hembras de cada grupo, sobre muestras recogidas respetando los mismos intervalos que en los análisis de hematología y bioquímica clínica. Las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los análisis de orina en un estudio previo efectuado durante 90 días con dosis afines. Las recomendaciones hechas por expertos acerca de los estudios de patología clínica incluyen los siguientes parámetros (30): aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas totales y glucosa. Otras valoraciones son cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina y sangre oculta. Si es necesario, pueden analizarse otros parámetros adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados.
44. De manera general, se acepta que es necesario disponer de valores basales de hematología y bioquímica clínica antes de someter a estudio a los perros, pero no en el caso de las especies roedoras (30). Ahora bien, si los datos basales históricos (véase el punto 50) son insuficientes, se considerará la oportunidad de generar estos datos.

Anatomía patológica

Autopsia macroscópica

45. Como norma debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. Sin embargo, se puede prever además la realización solo (en lotes satélite o animales sacrificados durante el ensayo) de valoraciones clave específicas, por ejemplo de neurotoxicidad o immunotoxicidad (véase el punto 19). Estos animales no tienen que someterse a autopsia ni a las consiguientes exploraciones que se describen a continuación. La autopsia de los animales centinela se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio.
46. Se registrará el peso de los órganos de todos los animales, salvo los que quedan excluidos en la última parte del punto 45. Las cápsulas suprarrenales, encéfalo, epidídimo, corazón, riñones, hígado, ovarios, bazo, testículos, tiroides (que se pesará después de la fijación, con las paratiroides) y útero de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y se determinará el peso húmedo lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. En los estudios con ratones, el pesaje de las cápsulas suprarrenales es opcional.
47. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (32) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

Todas las lesiones macroscópicas	Corazón	Páncreas	Estómago (rumen, estómago glandular)
Glándulas suprarrenales	Íleo	Glándulas paratiroides	[Dientes]
Aorta	Yeyuno	Nervios periféricos	Testículos
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia)	Riñón	Hipófisis	Timo
Intestino ciego	Glándulas lacrimales (extraorbitales)	Próstata	Tiroides
Cuello del útero	Hígado	Recto	[Lengua]

Glándulas coagulantes	Pulmón	Glándulas salivales	Tráquea
Colon	Ganglios linfáticos (superficiales y profundos)	Vesículas seminales	Vejiga urinaria
Duodeno	Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin ser visiblemente diseccionables, también las masculinas)	Músculo esquelético	Útero (y cuello)
Epidídimo	[Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales]	Piel	[Uréteres]
Ojos (y retina)	Esófago	Médula espinal (tres secciones: cervical, mediódorsal y lumbar)	[Uretra]
[Fémur y articulación tibiofemoral]	[Bulbo olfativo]	Bazo	Vagina
Vesícula biliar (en especies distintas de la rata)	Ovarios	[Esternón]	Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula
Glándula de Harder			

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se conservarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 (8) y B.29 (9) del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

Examen histopatológico

48. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (32). Como mínimo, el examen histopatológico debe hacerse sobre:

- todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,
- todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,
- todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas,
- los tejidos diana (o los tejidos que presentaban alteraciones relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis máxima) de todos los animales pertenecientes a los restantes grupos de dosis,
- en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

DATOS E INFORME

Datos

49. Se documentarán los datos de todos los parámetros evaluados en cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión. Los cuadros de datos agrupados reflejarán las medias y desviaciones típicas (en el caso de variables continuas) de los animales que presenten lesiones o efectos tóxicos, además de una escala de clasificación de las lesiones.

50. Los datos sobre controles históricos pueden resultar de ayuda en la interpretación de los resultados del estudio, por ejemplo cuando haya indicios de que los resultados arrojados por los controles simultáneos se desvían esencialmente de los datos recientes obtenidos en animales controles del mismo animalario o colonia. De ser evaluados, los datos sobre controles históricos deben proceder del mismo laboratorio, y corresponder a animales de edades y cepas afines, y haberse generado en los cinco años precedentes al estudio en cuestión.
51. Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio (punto 8). Para ello se tendrán en cuenta los ajustes de la supervivencia, en su caso.

Informe del ensayo

52. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

- Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.
- Datos de identificación.
- Procedencia de la sustancia.
- Número de lote.
- Certificado de análisis químico.

Vehículo (si procede):

- Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua).

Animales de ensayo:

- Especie y cepa utilizada y motivos para elegirla.
- Número, edad y sexo de los animales al inicio del ensayo.
- Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- Peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones del ensayo:

- Fundamento de la elección de la vía de administración y la dosis.
- Cuando proceda, métodos estadísticos aplicados al análisis de los datos.
- Pormenores de la formulación de la sustancia o de su preparación con la comida.
- Datos analíticos acerca de la concentración obtenida, la estabilidad y la homogeneidad de la preparación.
- Vía y método de administración de la sustancia problema.
- En los estudios de inhalación se indicará si es de solo por la nariz o de cuerpo entero.
- Dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (mg/kg o ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso.
- Datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Resultados (se presentarán cuadros de datos agrupados así como los datos de cada animal):

- Datos de supervivencia.
- Peso corporal y variaciones del mismo.
- Ingesta de alimento, cálculos de la eficiencia alimentaria, si se han hecho, e ingesta de agua cuando proceda.
- Datos de respuestas tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad.
- Naturaleza, incidencia (y, si se ha clasificado, gravedad) y duración de las observaciones clínicas (reversibles o no).
- Examen oftalmológico.
- Pruebas hematológicas.
- Análisis de bioquímica clínica.
- Análisis de orina.
- Resultados de cualesquiera investigaciones de neurotoxicidad o immunotoxicidad.
- Peso corporal en el momento de la muerte.
- Pesaje de los órganos (y pesos relativos, cuando proceda).
- Observaciones de la autopsia.
- Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento.
- Datos sobre la absorción, si los hay.

Tratamiento estadístico de los resultados, según proceda.

La discusión de los resultados comprende lo siguiente:

- La relación dosis-respuesta.
- Otras informaciones sobre el modo de acción.
- La discusión de cualquier hipótesis o modelo teórico.
- Valores de BMD, NOAEL o LOAEL.
- Datos sobre controles históricos.
- Relevancia para los seres humanos.

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

- (3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. *Food. Chem. Toxicol.* 40, 145-191.
- (4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 206: 437-445.
- (5) Capítulo B.27 del presente anexo. *Ensayo de toxicidad oral subcrónica. Toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores.*
- (6) OECD (2012). *Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453*-Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.
- (7) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Series on Testing and Assessment N° 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (8) Capítulo B.8 del presente anexo. *Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días.*
- (9) Capítulo B.29 del presente anexo. *Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días.*
- (10) Capítulo B.9 del presente anexo. *Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía cutánea.*
- (11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.
- (12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.
- (14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (15) OECD (2002). *Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14*, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (16) OECD (2000). *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Connelly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729-837.
- (18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). *Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays*. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (19) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010, p. 33).
- (20) National Research Council, 1985. *Guide for the care and use of laboratory animals*. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). *Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments*. ISBN 3-906255-04-2.

- (22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.
- (26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
- (27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
- (28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
- (29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
- (30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (31) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- (32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.»

- 6) Se sustituyen los capítulos B.32 y B.33 por el texto siguiente:

«B.32. ENSAYO DE CARCINOGÉNESIS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 451 de la OCDE (2009). Las TG 451 originales sobre los estudios de carcinogénesis se adoptaron en 1981. Se consideró necesario adaptar este método de ensayo B.32 para dar cuenta de los avances recientes en materia de bienestar animal que plantean nuevas necesidades normativas (2) (3) (4) (5) (6). La actualización de este método de ensayo B.32 se ha realizado en paralelo con las revisiones de los capítulos del presente anexo B.30. Ensayo de toxicidad crónica y B.33. Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis, con el fin de obtener más, información acerca de los animales utilizados en el estudio y recabar nuevos datos sobre la selección de las dosis. Este método de ensayo B.32 ha sido diseñado para el estudio de una amplia gama de sustancias, incluso plaguicidas y productos químicos industriales. Conviene señalar, no obstante, que algunos pormenores y requisitos pueden variar en el caso de los productos farmacéuticos (véase el documento de orientación S1B de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), para los ensayos de carcinogénesis de los productos farmacéuticos).
2. La mayoría de los ensayos de carcinogénesis se realizan con especies de roedores, por lo que este método de ensayo se ha diseñado básicamente para el estudio de dichas especies. Cuando fuere preciso realizar estos ensayos en especies no roedoras, serán así mismo de aplicación los principios y procedimientos descritos en este método de ensayo, además de los descritos en el capítulo B.27 del presente anexo, Ensayo de toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores (6), con las debidas modificaciones. Se ofrecen más indicaciones sobre el diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).
3. Las tres vías de administración principales que se estudian en los ensayos de carcinogénesis son la oral, la cutánea y la inhalatoria. La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía de exposición predominante en seres humanos. Se ofrece más información sobre la elección de la vía de exposición en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).
4. El presente método de ensayo centra el interés en la exposición por vía oral, la más frecuentemente usada en los estudios de carcinogénesis. Si bien los estudios de carcinogénesis que entrañan la exposición por vía cutánea o inhalatoria pueden ser igualmente necesarios en la evaluación del riesgo para la salud humana o en determinados marcos legislativos, estas dos vías de exposición plantean una complejidad técnica considerable. Tales estudios tendrán que diseñarse según cada caso; sin embargo, el método de ensayo que aquí se describe para la determinación y evaluación de la carcinogénesis por administración oral podría sentar las bases de un protocolo para los estudios de toxicidad por inhalación o absorción dérmica en lo que se refiere a recomendación de períodos de tratamiento, parámetros clínicos e histopatológicos, etc. La OCDE dispone de documentación orientativa sobre la administración de las sustancias problema por inhalación (7) (8) y por vía cutánea (7). Para el diseño de estudios a más largo plazo que contemplen la exposición por vía inhalatoria deben consultarse específicamente los capítulos B.8 (9) y B.29 (10) del presente anexo, además del documento de orientación de la OCDE sobre estudios de toxicidad aguda por inhalación (8). Cuando se trate de estudios que contemplen la vía cutánea se consultará el capítulo B.9 (11) del presente anexo.
5. Un estudio de carcinogénesis proporciona información sobre los factores de riesgo para la salud derivados de la exposición continuada durante un período que puede llegar a ocupar la vida entera de la especie animal investigada. El estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos de la sustancia problema, incluida la carcinogénesis potencial, y puede ayudar a determinar los órganos diana y la posibilidad de acumulación. Puede facilitar una estimación del máximo nivel de dosis sin efectos tóxicos observados (NOAEL) y, en el caso de carcinógenos no genotóxicos, de las respuestas tumorales, que servirá para establecer los criterios de seguridad de la exposición humana. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible.
6. Los objetivos de los estudios de carcinogénesis realizados según este método de ensayo son:
 - la identificación de las propiedades cancerígenas de una sustancia problema que puedan provocar una incidencia elevada de neoplasias, una mayor proporción de neoplasias malignas o una reducción del tiempo de aparición de las neoplasias, en comparación con los grupos de control,
 - la identificación del órgano o los órganos diana de la carcinogénesis,
 - la determinación del tiempo que tardan en aparecer las neoplasias,

- la caracterización de la relación dosis-respuesta tumoral,
- la identificación del nivel máximo sin efectos adversos observados (NOAEL), o punto de partida para determinar una dosis de referencia (Benchmark Dose, BMD),
- la extrapolación de los efectos cancerígenos a los niveles de dosificación inferiores de la exposición humana,
- la recopilación de datos para investigar las hipótesis referentes al mecanismo de acción (2) (7) (12) (13) (14) (15).

CONSIDERACIONES INICIALES

7. En la determinación y evaluación de la carcinogenicidad potencial de una sustancia problema, el laboratorio de ensayo deberá tener en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia estudiada antes de emprender el estudio, para así poder centrarse de manera más eficaz en la carcinogenicidad potencial y minimizar el uso de animales. La información previa y la consideración en torno al modo de acción de un supuesto cancerígeno (2) (7) (12) (13) (14) (15) reviste particular importancia, toda vez que el diseño óptimo del ensayo de una sustancia química variará según se trate o no de un cancerígeno genotóxico hipotético o conocido. Se ofrecen otras consideraciones sobre el modo de acción en el documento de orientación nº 116 (7).
8. En el diseño del estudio serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema; los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo*, incluidos los ensayos de genotoxicidad; el uso o usos previstos y la exposición humana potencial; los datos de (Q)SAR previos y los datos de mutagenicidad/genotoxicidad, carcinogenicidad y otros datos toxicológicos sobre sustancias estructuralmente afines; los datos toxicocinéticos disponibles (cinética de dosis única y, en su caso, de acumulación por dosis repetidas) y los datos derivados de otros estudios de exposición continuada. La evaluación de la carcinogénesis debe emprenderse una vez que se ha recabado la información inicial en los ensayos de toxicidad por administración continuada durante 28 días y/o 90 días. También pueden aportar una información valiosa los ensayos de inducción-estimulación de cáncer a corto plazo. Se hará un planteamiento secuencial de los estudios de carcinogénesis como parte de la evaluación global de los efectos adversos que puede tener para la salud una sustancia determinada (16) (17) (18) (19).
9. Antes de iniciar el estudio se establecerán los métodos estadísticos más adecuados para el análisis de los resultados, en función del diseño y de los objetivos experimentales. Aspectos importantes son el ajuste de la supervivencia en el análisis estadístico, el análisis de los riesgos tumorales acumulativos en relación con el tiempo de supervivencia, el análisis del tiempo que tarda en aparecer el tumor y el análisis en caso de terminación prematura de uno o más grupos. Se ofrecen orientaciones para realizar el análisis estadístico adecuado y se hace referencia a los métodos estadísticos internacionalmente aceptados en el documento de orientación (GD) nº 116 (7) y en el GD nº 35 sobre análisis y evaluación de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (20).
10. Cuando se efectúa un estudio de carcinogénesis, son de aplicación los principios y consideraciones recogidos en el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, la evaluación y la aplicación de signos clínicos como parámetros compasivos en los animales experimentales que se usan para evaluar la seguridad (21), en particular su punto 62. Dicho punto especifica que en los estudios de administración continuada, cuando un animal muestre signos clínicos progresivos que entrañen un deterioro creciente de su estado, habrá que decidir con conocimiento de causa si se sacrifica de forma compasiva. La decisión sopesará el valor de la información que puede obtenerse si se mantiene al animal en el estudio frente al desgaste de su estado general. Si se decide mantener al animal en el ensayo, se aumentará la frecuencia de las observaciones en la medida necesaria. Cabe también la posibilidad de, sin perjudicar a los fines de la investigación, suspender temporalmente la administración para aliviar el dolor o el sufrimiento, o reducir la dosis experimental.
11. Se ofrecen orientaciones y comentarios detallados sobre los principios que deben orientar la selección de la dosis en los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 (7) y en dos publicaciones del International Life Sciences Institute (22) (23). El núcleo de la estrategia de selección de la dosis depende del objetivo u objetivos principales del estudio (punto 6). Al elegir un intervalo posológico adecuado, debe buscarse un equilibrio entre el cribado de los factores de riesgo, por un lado, y la caracterización de las respuestas ante dosis bajas y de su importancia, por otro. Ello tiene especial trascendencia cuando se proyecta (punto 12) un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 del presente anexo).
12. Se considerará la posibilidad de efectuar un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) en lugar de realizar por separado un ensayo de toxicidad crónica (capítulo B.30 de este anexo) y un ensayo de carcinogénesis (presente método de ensayo B.32). El ensayo combinado permite mayor eficiencia que los estudios separados en términos de tiempo y costes, sin comprometer la calidad de los datos ni en la fase de toxicidad crónica ni en la fase de carcinogénesis. Sin embargo, cuando se emprenda un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) habrá que considerar detenidamente los principios de la selección de la dosis (puntos 11 y 22-25) y, por otro lado, se entiende que determinados marcos legislativos pueden imponer la realización de ensayos separados.

13. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento de orientación nº 116 (7).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

14. La sustancia problema se administra diariamente en dosis escalonadas, habitualmente por vía oral, a varios grupos de animales de experimentación durante la mayor parte de su existencia. También se aceptan las vías inhalatoria o cutánea. Se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad o lesiones neoplásicas. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

15. El presente método de ensayo está diseñado fundamentalmente para la determinación y evaluación de la carcinogénesis en roedores (punto 2). Se podrá considerar el uso de especies no roedoras cuando los datos previos indiquen que son más útiles para la predicción de los efectos sobre la salud humana. Se justificará la elección de la especie. La especie idónea es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Si bien el uso de ratones en los ensayos de carcinogénesis puede ser de utilidad limitada (24) (25) (26), algunas normativas en vigor siguen exigiendo que se realicen ensayos de carcinogénesis en ratones a no ser que se establezca que son científicamente innecesarios. Las ratas y los ratones se prefieren como modelos experimentales debido a su ciclo vital relativamente corto, su amplia utilización en los estudios farmacológicos y toxicológicos, su sensibilidad a la inducción tumoral y la disponibilidad de cepas de laboratorio suficientemente caracterizadas. Debido a todas estas características, se ha podido hacer un gran acopio de información acerca de su fisiología y anatomopatología. Se ofrece más información sobre la elección de la especie y la cepa de laboratorio en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

16. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos de una variedad de laboratorio de uso habitual. Los ensayos de carcinogénesis se efectuarán preferiblemente en animales de la misma procedencia y cepa que los empleados en los estudios preliminares de toxicidad de duración menor; ahora bien, si los animales de esa procedencia y variedad han demostrado incapacidad para cumplir los criterios de supervivencia normalmente aceptados para los estudios a largo plazo [véase el documento de orientación nº 116 (7)], se planteará la posibilidad de usar una cepa que presente una tasa de supervivencia aceptable en los ensayos a largo plazo. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas.

Alojamiento y alimentación de los animales

17. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo; el enjaulamiento individual se considerará solo si está científicamente justificado (27) (28) (29). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (\pm 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La dieta debe satisfacer todas las necesidades nutricionales de la especie estudiada, y se mantendrá en el mínimo posible su contenido en contaminantes alimentarios, entre otros los residuos de plaguicidas, contaminantes orgánicos persistentes, fitoestrógenos, metales pesados y micotoxinas que pudieran influir en los resultados experimentales. La información analítica sobre el contenido de nutrientes y contaminantes alimentarios se consignará de forma periódica, como mínimo al inicio del estudio y cada vez que se varíe el lote de producto empleado, y se documentará en el informe final. Así mismo se consignará la información analítica sobre el agua de bebida empleada en el estudio. Cuando la sustancia problema se administra con el alimento, la elección de la dieta se basa en la necesidad de conseguir una mezcla apropiada de dicha sustancia y de satisfacer al mismo tiempo las necesidades nutricionales de los animales.

Preparación de los animales

18. Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 7 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. En el caso de los roedores, la administración comenzará lo antes posible tras su destete y aclimatación, preferiblemente antes de que los animales cumplan 8 semanas de edad. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad de los, animales de experimentación. La diferencia de peso entre los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de \pm 20 % del peso medio de cada sexo. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Después de la asignación al azar, no debe haber diferencias significativas entre los grupos en las medias de peso corporal de cada sexo. De observarse diferencias estadísticamente significativas, el proceso de asignación aleatoria a los grupos deberá repetirse en la medida de lo posible. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto, que se le grabará de manera permanente mediante tatuaje, implante de microchip o cualquier otro medio pertinente.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

19. Se emplearán animales de ambos性. Se estudiará un número de animales suficiente para permitir una exhaustiva evaluación biológica y estadística. Por consiguiente, cada grupo de dosis y de control deberá contener como mínimo 50 animales de cada sexo. Dependiendo de la finalidad del estudio, cabe la posibilidad de aumentar la potencia estadística de las estimaciones esenciales haciendo una asignación diferencial de los animales a los distintos grupos de dosis, de modo que haya más de 50 individuos en los grupos de dosis inferior; esto permite estimar el potencial carcinógeno a dosis bajas. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que un aumento moderado del tamaño del grupo incrementará relativamente poco la potencia estadística del estudio. Se ofrece más información sobre el diseño estadístico y la selección de los niveles de dosis para maximizar la potencia estadística del estudio en el documento de orientación nº 116 (7).

Provisión de animales para el sacrificio durante el ensayo, los lotes satélite y los lotes centinela

20. Si está científicamente justificado, se puede hacer una provisión de animales para sacrificarlos durante el ensayo y así obtener datos sobre la progresión de las alteraciones neoplásicas y sobre los mecanismos de acción. Si tal información ha sido ya proporcionada por estudios previos de toxicidad por administración continuada realizados con la misma sustancia problema, el sacrificio de animales durante el ensayo puede no estar científicamente justificado. Si en el diseño experimental se incluyen animales para sacrificarlos durante el ensayo, lo habitual es que el lote sacrificado esté compuesto por 10 animales de cada sexo, y el número total de animales investigados se incrementará en esta misma medida. Se podrá incluir además un lote de animales centinela (habitualmente 5 individuos de cada sexo) para supervisar su estado en cuanto a enfermedades, en caso necesario, durante el estudio (30). Se ofrecen más indicaciones en el documento de orientación nº 116 (7).

Grupos de dosis y posología

21. En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan indicaciones sobre todos los aspectos de la selección de la dosis y los intervalos entre las dosis. Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. Los niveles de dosis se basan generalmente en los resultados de los estudios de determinación del intervalo o realizados con dosis repetidas a corto plazo, y deben tener en cuenta los datos toxicológicos y toxicocinéticos de que se disponga en relación con la sustancia problema o con sustancias afines.
22. Salvo limitaciones impuestas por la naturaleza fisicoquímica o los efectos biológicos de la sustancia problema, el nivel de dosis más elevado se escogerá a fin de identificar los principales órganos diana y efectos tóxicos pero evitando una toxicidad intensa, el sufrimiento, la morbilidad o la muerte de los animales. Tomando en consideración los factores que se indican en el punto 23 que sigue, normalmente el nivel de dosis más elevado será tal que provoque signos de toxicidad, por ejemplo, manifestada por una merma de la ganancia de peso corporal (aproximadamente el 10 %). Ahora bien, dependiendo de los objetivos del estudio (véase el punto 6), se puede establecer un techo de dosis inferior al nivel que provoque signos de toxicidad, por ejemplo si una dosis induce un efecto adverso de interés que, sin embargo, tiene escasa repercusión en el período de vida o el peso corporal.
23. Los niveles de dosis y la frecuencia de administración serán tales que permitan establecer una relación dosis-respuesta y, dependiendo del modo de acción de la sustancia problema, un valor de NOAEL o cualesquiera otras determinaciones previstas, como el valor de BMD o dosis de referencia más baja (véase el punto 25). Para establecer las dosis inferiores se tendrán en cuenta factores como la pendiente esperada de la curva dosis-respuesta, así como los niveles a los que cabe esperar cambios importantes en el metabolismo o en el mecanismo de la acción tóxica, cuando se prevea un umbral, o que constituyan un punto de partida para extrapolar la dosis más baja.
24. La frecuencia de administración de las dosis dependerá de las características de la sustancia y no corresponde especificarla en este método de ensayo; los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 6-10) entre dosis. En general se evitará aplicar factores superiores a 10, que en todo caso deberán justificarse.
25. Tal como se expone en el documento de orientación nº 116 (7), para la selección de las dosis se tendrán en cuenta los siguientes factores:
- los intervalos supuestos o conocidos de no linealidad o puntos de inflexión en la relación dosis-respuesta,
 - la toxicocinética y los intervalos posológicos en los que pueda haber o no inducción metabólica, saturación o no linealidad entre la dosimetría externa e interna,
 - las lesiones precursoras, los marcadores de efecto o los indicadores de la intervención de los principales mecanismos biológicos subyacentes,
 - aspectos importantes (hipotéticos o comprobados) del modo de acción, como la dosis a partir de la cual se manifiesta toxicidad, los niveles hormonales que resultan afectados, los mecanismos homeostáticos que se alteran, etc.,

- aquellas regiones de la curva dosis-respuesta en las que se precisa hacer una estimación especialmente robusta, como el intervalo de la dosis de referencia prevista o el umbral hipotético,
 - los niveles de exposición humana que cabe prever.
26. Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia problema, pero sí el vehículo de la misma en caso de que se utilice. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. En su caso, el lote de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia problema se administra con los alimentos y provoca una disminución importante de la ingesta debido a que empeoran las características organolépticas de la dieta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para conseguir una comparación más rigurosa.
- Preparación de las dosis y administración de la sustancia problema**
27. La sustancia problema se administra habitualmente por vía oral, mediante sonda o con el alimento o el agua de bebida. Se ofrece más información sobre las vías y los métodos de administración en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7). La vía y el método de administración dependerán de la finalidad del estudio, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, su biodisponibilidad y la vía y el modo de exposición predominantes en los seres humanos. Se justificará debidamente la vía y el método de administración elegidos. Por razones de bienestar animal, la alimentación oral por sonda se elegirá solo cuando exista una posibilidad razonable de que la exposición humana a la sustancia problema se vaya a producir por la misma vía y el mismo medio de administración (como es el caso de los productos farmacéuticos). Cuando se trata de sustancias alimentarias o ambientales, entre ellas los plaguicidas, la administración se efectúa habitualmente con los alimentos o el agua de bebida. Sin embargo, en otros escenarios de estudio como la exposición ocupacional, puede ser más conveniente la administración por otras vías.
28. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema, efectos sobre las propiedades químicas de dicha sustancia que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Se recabará información acerca de la estabilidad de la sustancia problema y su homogeneidad de concentración en las disoluciones o en las dietas (en su caso) que se emplean para la administración.
29. Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. En los estudios de toxicidad a largo plazo en los que la sustancia problema se administra con los alimentos, su concentración no debe superar generalmente el límite del 5 % de la ingesta total para evitar desequilibrios nutricionales. Cuando la sustancia problema se administra con los alimentos, se puede usar una concentración constante en la dieta (mg/kg de alimento o ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal (mg/kg peso corporal), calculada con periodicidad semanal. Deberá indicarse qué alternativa se ha seguido.
30. En los ensayos de administración oral, la sustancia problema se administra a los animales diariamente (siete días por semana), durante un período que suele ser de 24 meses en el caso de los roedores (véase también el punto 32). Cualquier otra pauta posológica, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. En el caso de la administración cutánea, los animales se tratan con la sustancia problema como mínimo 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana, según se especifica en el capítulo B.9 del presente anexo (11), durante un período de 24 meses. La exposición por vía inhalatoria se efectúa durante 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana pero, si se justifica, es admisible una pauta de 5 días por semana. El período de exposición será habitualmente de 24 meses. Cuando se exponen con la técnica de solo la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificará debidamente cualquier período de exposición inferior a 6 horas diarias. Véase también el capítulo B.8 del presente anexo (9).
31. Si la sustancia problema se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada y todos los días a la misma hora. La dosis única se administra normalmente una vez al día; pero si la sustancia es un irritante local, cabe la posibilidad de mantener la dosis total diaria repartiendo la administración en dosis divididas (dos veces al día). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen se mantendrá en el mínimo posible, y en los roedores no debe exceder generalmente de 1 ml/100 g peso corporal (31). La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Constituyen una excepción las sustancias potencialmente corrosivas o irritantes, que deben diluirse para evitar efectos locales graves. Se evitará la administración de concentraciones que puedan ser corrosivas o irritantes del tubo digestivo.

Duración del estudio

32. La duración del estudio suele ser de 24 meses en el caso de los roedores, lo que constituye la mayor parte del período de existencia de los animales investigados. Siempre que se justifique, se podrán aplicar períodos mayores o menores en función del ciclo de vida de la especie y la cepa investigadas. En el caso de determinadas cepas de ratones, como AKR/J, C3H/J o C57BL/6J, puede estar más justificada una duración de 18 meses. Seguidamente se facilitan algunas indicaciones acerca de la duración, la terminación del estudio y la supervivencia; otras consideraciones, entre ellas la aceptabilidad de un resultado de carcinogénesis negativa en función de la supervivencia observada en el estudio, se pueden consultar en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7) sobre el diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis.
- Se planteará la terminación del estudio cuando el número de supervivientes en los grupos de dosis más baja o de control sea menor del 25 por ciento.
 - Si las muertes prematuras por toxicidad se producen solo en el grupo de dosis más elevada, ello no debe motivar la terminación del estudio.
 - Se contabilizará por separado la supervivencia de cada sexo.
 - El estudio no debe prolongarse más allá del instante en que los datos derivados del mismo se muestren insuficientes para permitir una evaluación estadísticamente significativa.

OBSERVACIONES

33. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse además una observación diaria de los eventuales signos específicos de importancia toxicológica, teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración cuando esta se haga por sonda. Se prestará especial atención al desarrollo de tumores; se registrarán el momento de aparición y localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópica o palpablemente.

Peso corporal, consumo de alimentos y agua y eficiencia alimentaria

34. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará así mismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

Hematología, bioquímica clínica y otras valoraciones

35. Con el fin de maximizar la información derivada de la investigación, especialmente en lo que se refiere al modo de acción, a criterio del director del estudio se podrán tomar muestras de sangre para análisis hematológicos y de bioquímica clínica. También pueden estar indicados los análisis de orina. En el documento de orientación nº 116 (7) se comenta el interés de obtener este tipo de muestras en el marco de un ensayo de carcinogénesis. Si se considera oportuno, se podrán obtener muestras de sangre para hematología y bioquímica clínica y muestras de orina para análisis, como mínimo en 10 animales de cada sexo y lote, tanto antes del sacrificio durante el ensayo (punto 20) como en el momento de su conclusión. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia y, en su caso, se conservarán en las debidas condiciones. También se pueden preparar frotis de sangre, especialmente si se sospecha que la médula ósea es el órgano diana, aunque se ha cuestionado el valor de estas muestras para la evaluación del potencial cancerígeno u oncógeno (32).

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Autopsia macroscópica

36. Todos los animales del estudio excepto los centinela (véase el punto 20) y otros animales satélite se someterán a una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. La autopsia de los animales centinela y de otros animales satélite se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio. El pesaje de los órganos no suele formar parte de un estudio de carcinogénesis, dado que los cambios geriátricos y, en fases más avanzadas, el desarrollo de tumores introducen confusión en la interpretación de los datos sobre el peso de los órganos. No obstante, estos datos pueden ser cruciales para sopesar las pruebas y, especialmente, las consideraciones sobre el modo de acción. Si forman parte de un estudio satélite, se recogerán a lo más tardar un año después de iniciar el estudio.
37. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (33) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

Todas las lesiones macroscópicas	Corazón	Páncreas	Estómago (rumen, estómago glandular)
Cápsulas suprarrenales	Íleo	Glándulas paratiroides	[Dientes]
Aorta	Yeyuno	Nervios periféricos	Testículos
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia)	Riñón	Hipófisis	Timo
Intestino ciego	Glándulas lacrimales (extraorbitales)	Próstata	Tiroides
Cuello del útero	Hígado	Recto	[Lengua]
Glándulas coagulantes	Pulmón	Glándulas salivales	Tráquea
Colon	Ganglios linfáticos (superficiales y profundos)	Vesículas seminales	Vejiga urinaria
Duodeno	Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin ser visiblemente diseccionables, también las masculinas)	Músculo esquelético	Útero (y cuello)
Epidídimo	[Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales]	Piel	[Uréteres]
Ojos (y retina)	Esófago	Médula espinal (tres secciones: cervical, mediódorsal y lumbar)	[Uretra]
[Fémur y articulación ti-biofemoral]	[Bulbo olfativo]	Bazo	Vagina
Vesícula biliar (en especies distintas de la rata)	Ovarios	[Esternón]	Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula
Glándula de Harder			

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se conservarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 y B.29 del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

Examen histopatológico

38. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (33). Como mínimo se examinarán los siguientes tejidos:
- todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,
 - todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,
 - todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas, incluidos tumores,
 - cuando se observen alteraciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis más elevada, los mismos tejidos afectados se examinarán en todos los animales de los restantes grupos de dosis,
 - en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

DATOS E INFORME

Datos

39. Se documentarán los datos de todos los parámetros evaluados en cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión. Los cuadros de datos agrupados reflejarán las medias y desviaciones típicas (en el caso de variables continuas) de los animales que presenten lesiones o efectos tóxicos, además de una escala de clasificación de las lesiones.
40. Los datos sobre controles históricos pueden resultar de ayuda en la interpretación de los resultados del estudio, por ejemplo cuando haya indicios de que los resultados arrojados por los controles simultáneos se desvían esencialmente de los datos recientes obtenidos en animales de control del mismo animalario o colonia. De ser evaluados, los datos sobre controles históricos deben proceder del mismo laboratorio, y corresponder a animales de edades y cepas afines, y haberse generado en los cinco años precedentes al estudio en cuestión.
41. Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio (punto 9). Para ello se tendrán en cuenta los ajustes de la supervivencia, en su caso.

Informe del ensayo

42. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

- Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.
- Datos de identificación.
- Procedencia de la sustancia.
- Número de lote.
- Certificado de análisis químico.

Vehículo (si procede):

- Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua).

Animales de ensayo:

- Especie y cepa utilizada y motivos para elegirla.
- Número, edad y sexo de los animales al inicio del ensayo.
- Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- Peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones del ensayo:

- Fundamento de la elección de la vía de administración y la dosis.
- Cuando proceda, métodos estadísticos aplicados al análisis de los datos.
- Pormenores de la formulación de la sustancia o de su preparación con la comida.
- Datos analíticos acerca de la concentración obtenida, la estabilidad y la homogeneidad de la preparación.

- Vía y método de administración de la sustancia problema.
- En los estudios de inhalación se indicará si es de solo por la nariz o de cuerpo entero.
- Dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (mg/kg o ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso.
- Datos sobre la calidad de los alimentos y del agua.

Resultados (se presentarán cuadros de datos agrupados así como los datos de cada animal)

Generalidades

- Datos de supervivencia.
- Peso corporal y variaciones del mismo.
- Ingesta de alimento, cálculos de la eficiencia alimentaria, si se han hecho, e ingestas de agua cuando proceda.
- Datos toxicocinéticos (en su caso).
- Oftalmoscopia (en su caso).
- Hematología (en su caso).
- Bioquímica clínica (en su caso).

Observaciones clínicas:

- Signos de toxicidad.
- Incidencia (y, si se ha valorado, gravedad) de cualquier anomalía.
- Naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no).

Resultados de la autopsia:

- Peso corporal en el momento de la muerte.
- Pesaje de los órganos (y pesos relativos, cuando proceda).
- Observaciones de la autopsia; incidencia y gravedad de las anomalías.

Examen histopatológico:

- Observaciones histopatológicas de carácter no neoplásico.
- Observaciones histopatológicas neoplásicas.
- Correlación entre las observaciones macro y microscópicas.
- Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento, con una clasificación de su gravedad.

- Informes sobre las eventuales evaluaciones de las preparaciones efectuadas por otros científicos.

Tratamiento estadístico de los resultados, según proceda.

La discusión de los resultados comprende lo siguiente:

- Discusión de cualquier hipótesis o modelo teórico.
- Relación dosis-respuesta.
- Datos sobre controles históricos.
- Otras informaciones sobre el modo de acción.
- Valores de BMD, NOAEL o LOAEL.
- Relevancia para los seres humanos.

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.
- (6) Capítulo B.27 del presente anexo. Ensayo de toxicidad oral subcrónica. Toxicidad oral por administración continuada (90 días) en roedores.
- (7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453-Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Capítulo B.8 del presente anexo. Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días.
- (10) Capítulo B.29 del presente anexo. Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días.
- (11) Capítulo B.9 del presente anexo. Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía cutánea.
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793-801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci.* 89:51-56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol.* 33:591-653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1-7.
- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9-35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37-68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69-98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. pp. 279-284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agro-chemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196-1203.
- (27) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

-
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology* 21:15-23.
- (32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fund. Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
- (33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.
-

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

B.33. ENSAYO COMBINADO DE TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGENÉSIS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 453 de la OCDE (2009). Las TG 453 originales fueron adoptadas en 1981. Se consideró necesario adaptar este método de ensayo B.33 para dar cuenta de los avances recientes en materia de bienestar animal que plantean nuevas necesidades normativas (1) (2) (3) (4) (5). La actualización de este método de ensayo B.33 se ha realizado en paralelo con las revisiones de los capítulos del presente anexo B.32. Ensayo de carcinogénesis y B.30. Ensayo de toxicidad crónica, con el fin de obtener más información acerca de los animales utilizados en el estudio y recabar nuevos datos sobre la selección de las dosis. El presente método de ensayo ha sido diseñado para el estudio de una amplia gama de sustancias, incluso plaguicidas y productos químicos industriales. Conviene señalar, no obstante, que algunos pormenores y requisitos pueden variar en el caso de los productos farmacéuticos (véase el documento de orientación S1B de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), para los ensayos de carcinogénesis de los productos farmacéuticos).
2. La mayoría de los ensayos de toxicidad crónica y de carcinogénesis se realizan con especies de roedores, por lo que este método de ensayo se ha diseñado básicamente para el estudio de dichas especies. Cuando fuere preciso realizar estos ensayos en especies no roedoras, serán así mismo de aplicación los principios y procedimientos descritos en este método de ensayo, además de los descritos en el capítulo B.27 del presente anexo, Ensayo de toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores (6), con las debidas modificaciones, tal como se especifica en el documento de orientación nº 116 de la OCDE sobre Diseño y realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (7).
3. Las tres vías de administración principales que se estudian en los ensayos de toxicidad crónica y carcinogénesis son la oral, la cutánea y la inhalatoria. La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía de exposición predominante en seres humanos. Se ofrece más información sobre la elección de la vía de exposición en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).
4. El presente método de ensayo centra el interés en la exposición por vía oral, la más frecuentemente usada en los estudios de toxicidad crónica y de carcinogénesis. Si bien los estudios de toxicidad crónica a largo plazo que entrañan la exposición por vía cutánea o inhalatoria pueden ser igualmente necesarios en la evaluación del riesgo para la salud humana o en determinados marcos legislativos, estas dos vías de exposición plantean una complejidad técnica considerable. Tales estudios tendrán que diseñarse según cada caso; sin embargo, el método de ensayo que aquí se describe para la determinación y evaluación de la toxicidad crónica y de la carcinogénesis por administración oral podría sentar las bases de un protocolo para los estudios de toxicidad por inhalación o absorción dérmica en lo que se refiere a recomendación de períodos de tratamiento, variables clínicas e histopatológicas, etc. La OCDE dispone de documentación orientativa sobre la administración de las sustancias problema por inhalación (7) (8) y por vía cutánea (7). Para el diseño de estudios a más largo plazo que contemplen la exposición por vía inhalatoria deben consultarse específicamente los capítulos B.8 (9) y B.29 (10) del presente anexo, además del documento de orientación de la OCDE sobre estudios de toxicidad aguda por inhalación (8). Cuando se trate de estudios que contemplen la vía cutánea se consultará el capítulo B.9 (11) del presente anexo.
5. Un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis proporciona información sobre los factores de riesgo para la salud derivados de la exposición continuada durante un período que puede llegar a ocupar la vida entera de la especie animal investigada. El estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos de la sustancia problema, incluida la carcinogénesis potencial, y puede ayudar a determinar los órganos diana y la posibilidad de acumulación. Puede facilitar una estimación del máximo nivel de dosis sin efectos tóxicos observados (NOAEL) y, en el caso de cancerígenos no genotóxicos, de las respuestas tumorales, que servirán para establecer los criterios de seguridad de la exposición humana. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible.
6. Los objetivos de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis realizados según este método de ensayo son:
 - la identificación de las propiedades cancerígenas de una sustancia problema que puedan provocar una incidencia elevada de neoplasias, una mayor proporción de neoplasias malignas o una reducción del tiempo de aparición de las neoplasias, en comparación con los grupos de control,
 - la determinación del tiempo que tardan en aparecer las neoplasias,
 - la identificación de la toxicidad crónica de una sustancia problema,

- la identificación del órgano o los órganos diana de la toxicidad crónica y de la carcinogénesis,
- la caracterización de la relación dosis-respuesta,
- la identificación del nivel máximo sin efectos adversos observados (NOAEL), o punto de partida para determinar una dosis de referencia (Benchmark Dose, BMD),
- la extrapolación de los efectos cancerígenos a los niveles de dosificación inferiores de la exposición humana,
- la predicción de los efectos de toxicidad crónica que se producirán a los niveles de exposición humana,
- la recopilación de datos para investigar las hipótesis referentes al mecanismo de acción (2) (7) (12) (13) (14) (15).

CONSIDERACIONES INICIALES

7. En la determinación y evaluación del potencial de carcinogénesis y de toxicidad crónica de una sustancia, el laboratorio de ensayo deberá tener en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema antes de emprender el estudio, para así poder centrarse de manera más eficaz en sus propiedades toxicológicas y minimizar el uso de animales. La información previa y la consideración en torno al modo de acción de un supuesto cancerígeno (2) (7) (12) (13) (14) (15) reviste particular importancia, toda vez que el diseño óptimo del ensayo variará según se trate o no de un cancerígeno genotóxico hipotético o conocido. Se ofrecen otras consideraciones sobre el modo de acción en el documento de orientación nº 116 (7).
8. En el diseño del estudio serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, cualquier información referente al mecanismo de acción, los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad y de genotoxicidad *in vitro* o *in vivo*, el uso o usos previstos y la exposición humana potencial, los datos de (Q)SAR previos, los datos de mutagenicidad/genotoxicidad, carcinogénesis y otros datos toxicológicos sobre sustancias estructuralmente afines, los datos toxicocinéticos disponibles (cinética de dosis única y, en su caso, de acumulación por dosis repetidas) y los datos derivados de otros estudios de exposición continuada. La determinación de la toxicidad crónica y la carcinogénesis solo debe emprenderse una vez que se ha recabado la información toxicológica inicial en los ensayos de toxicidad por administración continuada durante 28 días y/o 90 días. También pueden aportar una información valiosa los ensayos de inducción-estimulación de cáncer a corto plazo. Se hará un planteamiento escalonado de los estudios de carcinogénesis como parte de la evaluación global de los potenciales efectos adversos que puede tener para la salud una sustancia determinada (16) (17) (18) (19).
9. Antes de iniciar el estudio se establecerán los métodos estadísticos más adecuados para el análisis de los resultados, en función del diseño y de los objetivos experimentales. Aspectos importantes son el ajuste de la supervivencia en el análisis estadístico, el análisis de los riesgos tumorales acumulativos en relación con el tiempo de supervivencia, el análisis del tiempo que tarda en aparecer el tumor y el análisis en caso de terminación prematura de uno o más grupos. Se ofrecen orientaciones para realizar el análisis estadístico adecuado y se hace referencia a los métodos estadísticos internacionalmente aceptados en el documento de orientación (GD) nº 116 (7) y en el GD nº 35 sobre análisis y evaluación de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (20).
10. Cuando se efectúa un estudio de carcinogénesis, son de aplicación los principios y consideraciones recogidos en el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, la evaluación y la aplicación de signos clínicos como parámetros compasivos en los animales experimentales que se usan para evaluar la seguridad (21), en particular su punto 62. Dicho punto especifica que en los estudios de administración continuada, cuando un animal muestre signos clínicos progresivos que entrañen un deterioro creciente de su estado, habrá que decidir con conocimiento de causa si se sacrifica de forma compasiva. La decisión sopesará el valor de la información que puede obtenerse si se mantiene al animal en el estudio frente al desgaste de su estado general. Si se decide mantener al animal en el ensayo, se aumentará la frecuencia de las observaciones en la medida necesaria. Cabe también la posibilidad de, sin perjudicar a los fines de la investigación, suspender temporalmente la administración para aliviar el dolor o sufrimiento, o reducir la dosis experimental.
11. Se ofrecen orientaciones y comentarios detallados sobre los principios que deben orientar la selección de la dosis en los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 (7) y en dos publicaciones del International Life Sciences Institute (22) (23). El núcleo de la estrategia de selección de la dosis depende del objetivo u objetivos principales del estudio (punto 6). Al elegir un intervalo posológico adecuado, debe buscarse un equilibrio entre el cribado de los factores de riesgo, por un lado, y la caracterización de las respuestas ante dosis bajas y de su relevancia, por otro. Ello reviste particular importancia en este estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis.

12. Se considerará la posibilidad de efectuar el presente estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis en lugar de realizar por separado un ensayo de toxicidad crónica (capítulo B.30 de este anexo) y un ensayo de carcinogénesis (capítulo B.32 de este anexo). El ensayo combinado permite una mayor eficiencia que los estudios separados en términos de tiempo y costes, y reduce en cierta medida el uso de animales, sin comprometer la calidad de los datos ni en la fase de toxicidad crónica ni en la fase de carcinogénesis. Sin embargo, cuando se emprenda un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis habrá que considerar detenidamente los principios de la selección de la dosis (puntos 11 y 22-26) y, por otro lado, se entiende que determinados marcos legislativos pueden imponer la realización de ensayos separados. En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan más indicaciones sobre el diseño de los estudios combinados de toxicidad crónica y carcinogénesis dentro de los principios de máxima eficiencia para reducir el número de animales empleados y de aprovechamiento racional de los distintos métodos experimentales.
13. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento de orientación nº 116 (7).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

14. El diseño del estudio consta de dos fases paralelas, una de toxicidad crónica y otra de carcinogénesis (consúltense sus duraciones respectivas en los puntos 34 y 35). La sustancia problema se administra generalmente por vía oral, aunque también se aceptan las vías inhalatoria y cutánea. En la fase de toxicidad crónica, la sustancia problema se administra diariamente en dosis escalonadas a varios lotes de animales experimentales, a razón de un nivel de dosis por lote, normalmente durante un período de 12 meses, si bien este puede reducirse o prolongarse en función de los requisitos normativos (véase el punto 34). La duración del estudio será suficiente para permitir que se manifiesten los posibles efectos de toxicidad acumulativa, pero sin que se confundan con las alteraciones geriátricas. El diseño del estudio puede contemplar el sacrificio de uno o más animales durante el ensayo, por ejemplo a los 3 y a los 6 meses, y a tal efecto se podrán prever lotes complementarios de animales (véase el punto 20). En la fase de carcinogénesis, la sustancia problema se administra diariamente a varios lotes de animales experimentales durante la mayor parte de su existencia. Se observa atentamente a los animales en ambas fases por si aparecen signos de toxicidad o lesiones neoplásicas. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

15. El presente método de ensayo está diseñado fundamentalmente para la determinación y evaluación de la toxicidad crónica y la carcinogénesis en roedores (punto 2). Se podrá considerar el uso de especies no roedoras cuando los datos previos indiquen que son más útiles para la predicción de los efectos sobre la salud humana. Se justificará la elección de la especie. La especie idónea es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Si bien el uso de ratones en los ensayos de carcinogénesis puede ser de utilidad limitada (24) (25) (26), algunas normativas en vigor siguen exigiendo que se realicen ensayos de carcinogénesis en ratones a no ser que se establezca que son científicamente innecesarios. Las ratas y los ratones se prefieren como modelos experimentales debido a su ciclo vital relativamente corto, su amplia utilización en los estudios farmacológicos y toxicológicos, su sensibilidad a la inducción tumoral y la disponibilidad de cepas de laboratorio suficientemente caracterizadas. Debido a todas estas características, se ha podido hacer un gran acopio de información acerca de su fisiología y anatomiopatología. El diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en especies no roedoras, cuando proceda, se basará en los principios que se recogen en el presente método de ensayo y en el capítulo B.27 de este anexo, Toxicidad oral por administración continuada (28 días) en no roedores (6). Se ofrece más información sobre la elección de la especie y la cepa de laboratorio en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).
16. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos de una variedad de laboratorio de uso habitual. Los estudios combinados de toxicidad crónica y carcinogénesis se efectuarán preferiblemente en animales de la misma procedencia y cepa que los empleados en los estudios preliminares de toxicidad de duración menor; ahora bien, si los animales de esa procedencia y variedad han demostrado incapacidad para cumplir los criterios de supervivencia normalmente aceptados para los estudios a largo plazo [véase el documento de orientación nº 116 (7)], se planteará la posibilidad de usar una cepa que presente una tasa de supervivencia aceptable en los ensayos a largo plazo. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas.

Alojamiento y alimentación

17. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo; el enjaulamiento individual se considerará solo si está científicamente justificado (27) (28) (29). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La dieta debe satisfacer todas las necesidades nutricionales de la especie estudiada, y se mantendrá en el mínimo posible su contenido en contaminantes alimentarios, entre otros los residuos de plaguicidas, contaminantes orgánicos persistentes, fitoestrógenos, metales pesados y micotoxinas que pudieran influir en los resultados experimentales. La información analítica sobre el contenido de nutrientes y contaminantes alimentarios se consignará de forma periódica, como mínimo al inicio del estudio y cada vez que se varíe el lote de producto empleado, y se documentará

en el informe final. Asimismo se consignará la información analítica sobre el agua de bebida empleada en el estudio. Cuando la sustancia se administra con el alimento, la elección de la dieta se basa en la necesidad de conseguir una mezcla apropiada de la sustancia problema y de satisfacer al mismo tiempo las necesidades nutricionales de los animales.

Preparación de los animales

18. Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 7 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. En el caso de los roedores, la administración comenzará lo antes posible tras su destete y aclimatación, preferiblemente antes de que los animales cumplan 8 semanas de edad. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad de los animales de experimentación. La diferencia de peso entre los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de $\pm 20\%$ del peso medio de cada sexo. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Después de la asignación al azar, no debe haber diferencias significativas entre los grupos en las medias de peso corporal de cada sexo. De observarse diferencias estadísticamente significativas, el proceso de asignación aleatoria a los grupos deberá repetirse en la medida de lo posible. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto, que se le grabará de manera permanente mediante tatuaje, implante de microchip o cualquier otro medio pertinente.

PROCEDIMIENTO

Número y sexo de los animales

19. Se emplearán animales de ambos性. Se empleará un número de animales suficiente para permitir una exhaustiva evaluación biológica y estadística. En el caso de los roedores, por tanto, cada grupo de dosis (como se describe en el punto 22) y de control simultáneo empleados en la fase de carcinogénesis del estudio deberá contener como mínimo 50 animales de cada sexo. Dependiendo de la finalidad del estudio, cabe la posibilidad de aumentar la potencia estadística de las estimaciones esenciales haciendo una asignación diferencial de los animales a los distintos grupos de dosis, de modo que haya más de 50 individuos en los grupos de dosis inferior; esto permite estimar el potencial carcinógeno a dosis bajas. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que un aumento moderado del tamaño del grupo incrementará relativamente poco la potencia estadística del estudio. En el caso de los roedores, cada grupo de dosis (como se describe en el punto 22) y de control simultáneo empleado en la fase de toxicidad crónica del estudio deberá contener como mínimo 10 animales de cada sexo. Conviene señalar que este número es menor que en el estudio de toxicidad crónica (capítulo B.30 del presente anexo). No obstante, la interpretación de los datos obtenidos con los lotes reducidos en la fase de toxicidad crónica de este estudio combinado estará respaldada por los datos de los lotes más numerosos empleados en la fase de carcinogénesis. En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales en cada grupo de dosificación de la fase de toxicidad crónica para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias. Se ofrece más información sobre el diseño estadístico y la selección de los niveles de dosis para maximizar la potencia estadística del estudio en el documento de orientación nº 116 (7).

Provisión de animales para el sacrificio durante el ensayo, los lotes satélite y los lotes centinela

20. Si está científicamente justificado, se puede hacer una provisión de animales para sacrificarlos durante el ensayo, por ejemplo a los 6 meses en la fase de toxicidad crónica, y así obtener datos sobre la progresión de las alteraciones no neoplásicas y sobre los mecanismos de acción. Si tal información ha sido ya proporcionada por estudios previos de toxicidad por administración continua realizados con la misma sustancia problema, el sacrificio de animales durante el ensayo puede no estar científicamente justificado. Los animales sacrificados en el transcurso de la fase de toxicidad crónica del estudio, normalmente de 12 meses de duración (punto 34), proporcionan datos útiles para la fase de carcinogénesis, lo que permite reducir el número global de animales estudiados. Cabe la posibilidad de incluir lotes satélite en la fase de toxicidad crónica del estudio para controlar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema. Generalmente, estos se limitan al lote del nivel de dosis más elevado del estudio y al lote de control. Se podrá incluir además un lote de animales centinela (habitualmente 5 individuos de cada sexo) para supervisar el estado en cuanto a enfermedades, en caso necesario, durante el estudio (30). En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan más indicaciones sobre el diseño del estudio y la provisión del mínimo número posible de animales para el sacrificio y para los lotes satélite y centinela.
21. Si en el diseño experimental se incluyen animales satélite y/o para sacrificarlos durante el ensayo, lo habitual es que los lotes destinados a estos fines estén compuestos por 10 animales de cada sexo, y el número total de animales investigados se incrementará en esta misma medida. Los animales satélite y los sacrificados durante el ensayo se someten generalmente a las mismas observaciones (peso corporal, consumo de agua y alimentos, valoraciones de hematología y bioquímica clínica e investigaciones anatomopatológicas) que los animales observados en la fase de toxicidad crónica del estudio principal, aunque se puede establecer que, en los lotes que se sacrifiquen durante el ensayo, se restrinja dicha evaluación a aspectos cruciales como la neurotoxicidad o la inmunotoxicidad.

Grupos de dosis y posología

22. En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan indicaciones sobre todos los aspectos de la selección de la dosis y los intervalos entre las dosis. Tanto en la fase de toxicidad crónica como en la de carcinogénesis, se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. Los niveles de dosis se basan generalmente en los resultados de los estudios de determinación del intervalo o realizados con dosis repetidas a corto plazo, y deben tener en cuenta los datos toxicológicos y toxicocinéticos de que se disponga en relación con la sustancia problema o con sustancias afines.

23. En la fase de toxicidad crónica puede no ser necesario hacer un estudio completo con tres niveles de dosis, si se considera que no cabe esperar efectos adversos con un nivel de dosis equivalente como mínimo a 1 000 mg/kg peso corporal/día. Esta decisión se basará en informaciones procedentes de estudios preliminares y en la consideración de que no cabe esperar toxicidad a tenor de los datos de sustancias estructuralmente afines. Se puede establecer un límite de 1 000 mg/kg peso corporal/día, salvo si la exposición humana previsible indica la necesidad de emplear un nivel de dosis más elevado.
24. Salvo limitaciones impuestas por la naturaleza fisicoquímica o los efectos biológicos de la sustancia problema, el nivel de dosis más elevado se escogerá a fin de identificar los principales órganos diana y efectos tóxicos pero evitando una toxicidad intensa, el sufrimiento, la morbilidad o la muerte de los animales. Normalmente, el nivel de dosis superior se seleccionará de modo que induzca signos de toxicidad, como una merma en la ganancia de peso corporal (de aproximadamente el 10 %). Ahora bien, dependiendo de los objetivos del estudio (véase el punto 6), se puede establecer un techo de dosis inferior al nivel que provoque signos de toxicidad, por ejemplo si una dosis induce un efecto adverso de interés que, sin embargo, tiene escasa repercusión en el período de vida o el peso corporal.
25. Los niveles de dosis y la frecuencia de administración serán tales que permitan establecer una relación dosis-respuesta y, dependiendo del modo de acción de la sustancia problema, un valor de NOAEL o cualesquiera otras determinaciones previstas, como el valor de BMD o dosis de referencia más baja (véase el punto 27). Para establecer las dosis inferiores se tendrán en cuenta factores como la pendiente esperada de la curva dosis-respuesta, así como los niveles a los que cabe esperar cambios importantes en el metabolismo o en el mecanismo de la acción tóxica, cuando se prevea un umbral, o que constituyan un punto de partida para extrapolar la dosis más baja. Cuando se lleva a cabo un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis, la finalidad principal es obtener información que permita evaluar el riesgo de carcinogénesis y, normalmente, la información sobre la toxicidad crónica es secundaria. Habrá que tener esto en cuenta al seleccionar los niveles de dosis y los intervalos de administración.
26. La frecuencia de administración de las dosis dependerá de los objetivos del estudio y de las características de la sustancia problema y no corresponde especificarla en este método de ensayo; los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 6-10) entre dosis. En general se evitará aplicar factores superiores a 10, que en todo caso deberán justificarse.
27. Tal como se recoge en el documento de orientación nº 116 (7), para la selección de las dosis se tendrán en cuenta los siguientes factores:
 - los intervalos supuestos o conocidos de no linealidad o puntos de inflexión en la ecuación dosis-respuesta,
 - la toxicocinética y los intervalos posológicos en los que pueda haber o no inducción metabólica, saturación o no linealidad entre las dosis externas e internas,
 - las lesiones precursoras, los marcadores de efecto o los indicadores de la intervención de los principales mecanismos biológicos subyacentes,
 - aspectos importantes (hipotéticos o comprobados) del modo de acción, como la dosis a partir de la cual se manifiesta toxicidad, los niveles hormonales que resultan afectados, los mecanismos homeostáticos que se alteran, etc.,
 - aquellas regiones de la curva dosis-respuesta en las que se precisa hacer una estimación especialmente robusta, como el intervalo de la dosis de referencia prevista o el umbral hipotético,
 - los niveles de exposición humana que cabe prever, especialmente cuando se seleccionan las dosis intermedias y bajas.
28. Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia problema, pero sí el vehículo de la misma en caso de que se utilice. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. En su caso, el lote de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia problema se administra con los alimentos y provoca una disminución importante de la ingesta debido a que empeoran las características organolépticas de la dieta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para conseguir una comparación más rigurosa.

Preparación de las dosis y administración de la sustancia problema

29. La sustancia problema se administra habitualmente por vía oral, mediante sonda o con el alimento o el agua de bebida. Se ofrece más información sobre las vías y los métodos de administración en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7). La vía y el método de administración dependerán de la finalidad del estudio, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, su biodisponibilidad y la vía y el modo de exposición predominantes en los seres humanos. Se justificará debidamente la vía y el método de administración elegidos. Por razones de bienestar animal, la alimentación oral por sonda se elegirá solo cuando exista una posibilidad razonable

de que la exposición humana a la sustancia se vaya a producir por la misma vía y el mismo medio de administración (como es el caso de los productos farmacéuticos). Cuando se trata de sustancias alimentarias o ambientales, entre ellas los plaguicidas, la administración se efectúa habitualmente con los alimentos o el agua de bebida. Sin embargo, en otros escenarios de estudio como la exposición ocupacional, puede ser más conveniente la administración por otras vías.

30. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema, efectos sobre las propiedades químicas de dicha sustancia que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Se recabará información acerca de la estabilidad de la sustancia problema y su homogeneidad de concentración en las disoluciones o en las dietas (en su caso) que se emplean para la administración.
31. Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. En los estudios de toxicidad a largo plazo en los que la sustancia problema se administra con los alimentos, su concentración no debe superar generalmente el límite del 5 % de la ingesta total para evitar desequilibrios nutricionales. Cuando la sustancia problema se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (mg/kg de alimento o ppm) o bien una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales (mg/kg peso corporal), calculada con periodicidad semanal. Deberá indicarse qué alternativa se ha seguido.
32. En el caso de la administración oral, las dosis de la sustancia problema se administran diariamente a los animales (7 días por semana) durante un período de 12 meses (fase de toxicidad crónica) o de 24 meses (fase de carcinogénesis); véanse también los puntos 33 y 34. Cualquier otra pauta posológica, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. En el caso de la administración cutánea, los animales se tratan con la sustancia problema como mínimo 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana, según se especifica en el capítulo B.9 del presente anexo (11), durante un período de 12 meses (fase de toxicidad crónica) o de 24 meses (fase de carcinogénesis). La exposición por vía inhalatoria se efectúa durante 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana pero, si se justifica, es admisible una pauta de 5 días por semana. El período de exposición es habitualmente de 12 meses (fase de toxicidad crónica) o de 24 meses (fase de carcinogénesis). Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificará debidamente cualquier período de exposición inferior a 6 horas diarias. Véase también el capítulo B.8 del presente anexo (9).
33. Si la sustancia problema se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada y todos los días a la misma hora. La dosis única se administra normalmente una vez al día; pero si la sustancia es un irritante local, cabe la posibilidad de mantener la dosis total diaria repartiendo la administración en dosis divididas (dos veces al día). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen se mantendrá en el mínimo posible, y en los roedores no debe exceder generalmente de 1 ml/100 g peso corporal (31). La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Constituyen una excepción las sustancias potencialmente corrosivas o irritantes, que deben diluirse para evitar efectos locales graves. Se evitará la administración de concentraciones que puedan ser corrosivas o irritantes del tubo digestivo.

Duración del estudio

34. Si bien el período de administración y la duración de la fase crónica de este estudio es normalmente de 12 meses, su diseño permite aplicarlo a ensayos de duración menor (6 o 9 meses) o mayor (18 o 24 meses), en función de los requisitos normativos particulares o de los mecanismos específicos que se pretenda investigar. Toda desviación de este período de exposición de 12 meses deberá justificarse, particularmente si es en el sentido de acortarlo. Los animales de todos los grupos de dosis asignados a esta fase serán sacrificados en el momento previsto para la evaluación de la toxicidad crónica y las alteraciones anatomo-patológicas no neoplásicas. Concluida la exposición, los lotes satélite incluidos para comprobar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema deben mantenerse sin administración durante un período no inferior a 4 semanas ni superior a un tercio de la duración total del estudio.
35. La duración de la fase de carcinogénesis de este estudio suele ser de 24 meses en el caso de los roedores, lo que constituye la mayor parte del período de existencia de los animales investigados. Siempre que se justifique, se podrán aplicar períodos mayores o menores en función del ciclo de vida de la especie y la cepa investigadas. En el caso de determinadas cepas de ratones, como AKR/J, C3H/J o C57BL/6J, puede estar más justificada una

duración de 18 meses. Seguidamente se facilitan algunas indicaciones acerca de la duración, la terminación del estudio y la supervivencia; otras consideraciones, entre ellas la aceptabilidad de un resultado de carcinogénesis negativa en función de la supervivencia observada en el estudio, se pueden consultar en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

- Se planteará la terminación del estudio cuando el número de supervivientes en los grupos de dosis más baja o de control sea menor del 25 por ciento.
- Si las muertes prematuras por toxicidad se producen solo en el grupo de dosis más elevada, ello no debe motivar la terminación del estudio.
- Se contabilizará por separado la supervivencia de cada sexo.
- El estudio no debe prolongarse más allá del instante en que los datos derivados del mismo se muestren insuficientes para permitir una evaluación estadísticamente significativa.

OBSERVACIONES (FASE DE TOXICIDAD CRÓNICA)

36. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración cuando esta se haga por sonda.
37. Se someterán todos los animales a observación clínica exhaustiva como mínimo antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto), al concluir la primera semana de estudio y, en lo sucesivo, con periodicidad mensual. El protocolo de tales observaciones se organizará con el fin de minimizar las variaciones entre los observadores individuales y entre los distintos lotes experimentales. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimo, piloerección, tamaño de la pupila y respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (32).
38. Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado a todos los animales antes de administrar la sustancia problema. Al concluir el estudio, el mismo examen se practicará preferiblemente a todos los animales y, obligatoriamente, a los lotes de control y de dosis más elevada. Si se observan en esos animales cambios oculares relacionados con el tratamiento, deben examinarse todos los demás. Si el análisis estructural o cualquier otra información indica toxicidad oftálmica, se aumentará la frecuencia de las exploraciones oftalmológicas.
39. Cuando se trate de sustancias para las que estudios previos de toxicidad por administración continuada durante 28 días o 90 días hayan demostrado efectos neurotóxicos, las pruebas de reactividad sensorial a estímulos de diferentes tipos (32) [por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos (33) (34) (35)], así como la evaluación de la fuerza prensil (36) y de la actividad motriz (37), podrán hacerse facultativamente antes de iniciar el estudio, a intervalos de 3 meses durante el mismo hasta un máximo de 12 meses inclusive, y a la conclusión del estudio (si dura más de 12 meses). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.
40. Cuando los estudios previos de toxicidad por administración continuada durante 28 días o 90 días indiquen que la sustancia tiene capacidad inmunotóxica, al concluir el estudio se podrán proseguir las investigaciones de este parámetro.

Peso corporal, consumo de alimentos y agua y eficiencia alimentaria

41. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará asimismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

Hematología y bioquímica clínica

42. En las investigaciones realizadas con roedores, se practicarán exámenes hematológicos en todos los animales de ensayo (10 machos y 10 hembras por cada grupo) a los 3, 6 y 12 meses y al concluir el estudio (si dura más de 12 meses). En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales satélite para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias (véase el punto 19). Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras más pequeñas de animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros hematológicos en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia.
43. Se investigarán los siguientes parámetros (38): recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de eritrocitos y de plaquetas, concentración de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada. Pueden determinarse además otros parámetros hematológicos como los cuerpos de Heinz, la morfología de otros eritrocitos atípicos o los valores de metahemoglobina, en función de la toxicidad de la sustancia problema. El planteamiento general ha de ser flexible, y adaptado a los efectos observados o esperados de la sustancia problema. Si esta ejerce efectos sobre el sistema hematopoyético, pueden estar indicados recuentos de reticulocitos y una citología de la médula ósea, que no son valoraciones habituales.
44. En los intervalos de tiempo especificados para determinar las variables hematológicas, se realizarán valoraciones de bioquímica clínica para investigar los principales efectos tóxicos sobre los tejidos y, específicamente, sobre los riñones y el hígado en las muestras de sangre obtenidas de todos los animales de ensayo (10 machos y 10 hembras por cada grupo). En el caso de los ratones, pueden hacer falta animales satélite para efectuar todas las valoraciones necesarias de bioquímica clínica. Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras de menos animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros de bioquímica clínica en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Se recomienda que los animales (a excepción de los ratones) estén en ayunas desde el día anterior a la toma de muestras⁽¹⁾. Se investigarán los siguientes parámetros (38): glucosa, urea (nitrógeno ureico), creatinina, proteínas totales, albúmina, calcio, sodio, potasio, colesterol total, al menos dos pruebas completas de la función hepatocelular (alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, glutamato-deshidrogenasa, ácidos biliares totales) (39) y al menos dos pruebas completas de la función hepatobiliar (fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltransferasa, 5'-nucleotidasa, bilirrubina total, ácidos biliares totales) (39). Cuando proceda y a tenor de la toxicidad de la sustancia problema, pueden hacerse otras valoraciones de bioquímica clínica como las de triglicéridos en ayunas, hormonas específicas y colinesterasa. Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.
45. Se practicarán análisis de orina en todos los animales de ensayo (10 machos y 10 hembras por cada grupo), sobre muestras recogidas respetando los mismos intervalos que en los análisis de hematología y bioquímica clínica. Las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los análisis de orina en un estudio previo efectuado durante 90 días con dosis afines. Las recomendaciones hechas por expertos acerca de los estudios de patología clínica incluyen los siguientes parámetros (38): aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas totales y glucosa. Otras valoraciones son cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina y sangre oculta. Si es necesario, pueden analizarse otros parámetros adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados.
46. De manera general, se acepta que es necesario disponer de valores basales de hematología y bioquímica clínica antes de someter a estudio a los perros, pero no en el caso de las especies roedoras (38). Ahora bien, si los datos basales históricos (véase el punto 58) son insuficientes, se considerará la oportunidad de generar estos datos.

ANATOMÍA PATOLÓGICA*Autopsia macroscópica*

47. Como norma debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. Sin embargo, se puede prever además la realización solo (en lotes satélite o animales sacrificados durante el ensayo) de valoraciones clave específicas, por ejemplo de neurotoxicidad o inmunotoxicidad (véase el punto 21). Estos animales no tienen que someterse a autopsia ni a las consiguientes exploraciones que se describen a continuación. La autopsia de los animales centinela se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio.

⁽¹⁾ El ayuno desde la víspera es preferible para realizar ciertos análisis en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, el ayuno desde la víspera puede influir en el metabolismo general de los animales y, especialmente en los estudios en que la sustancia problema se administra con los alimentos, puede alterar la exposición diaria a dicha sustancia. Todos los animales se deben examinar en las mismas condiciones fisiológicas, por lo que se aconseja programar las evaluaciones neurológicas y detalladas en un día distinto del destinado a la toma de muestras para bioquímica clínica.

48. Se registrará el peso de los órganos de todos los animales, salvo los que quedan excluidos en la última parte del punto 47. Las cápsulas suprarrenales, encéfalo, epidídimos, corazón, riñones, hígado, ovarios, bazo, testículos, tiroides (que se pesará después de la fijación, con las paratiroides) y útero de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y se determinará el peso húmedo lo antes posible tras la disección para evitar su desecación.

49. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (40) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

Todas las lesiones macroscópicas	Corazón	Páncreas	Estómago (rumen, estómago glandular)
Glándulas suprarrenales	Íleo	Glándulas paratiroides	[Dientes]
Aorta	Yeyuno	Nervios periféricos	Testículos
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo y protuberancia)	Riñón	hipófisis	Timo
Intestino ciego	Glándulas lacrimales (extraorbitarias)	Próstata	Tiroides
Cuello del útero	Hígado	Recto	[Lengua]
Glándulas coagulantes	Pulmón	Glándulas salivales	Tráquea
Colon	Ganglios linfáticos (superficiales y profundos)	Vesículas seminales	Vejiga urinaria
Duodeno	Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin ser visiblemente diseccionables, también las masculinas)	Músculo esquelético	Útero (y cuello)
Epidídimos	[Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales]	Piel	[Uréteres]
Ojos (y retina)	Esófago	Médula espinal (tres secciones: cervical, medio dorsal y lumbar)	[Uretra]
[Fémur y articulación ti-biofemoral]	[Bulbo olfatorio]	Bazo	Vagina
Vesícula biliar (en especies distintas de la rata)	Ovarios	[Esternón]	Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula
Glándula de Harder			

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se examinarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 (9) y B.29 (10) del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

Examen histopatológico

50. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (40). Como mínimo, el examen histopatológico debe hacerse sobre:

— todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,

- todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,
- todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas,
- los tejidos diana (o los tejidos que presenten alteraciones relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis máxima) de todos los animales pertenecientes a los restantes grupos de dosis,
- en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

OBSERVACIONES (FASE DE CARCINOGENESIS)

51. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse además una observación diaria de los eventuales signos específicos de importancia toxicológica. En los ensayos en que se emplee sonda, los animales se examinarán en el período inmediatamente posterior a la administración. Se prestará especial atención al desarrollo de tumores; se registrarán el momento de aparición y localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópica o palpablemente.
52. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará así mismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

Hematología, bioquímica clínica y otras valoraciones

53. Con el fin de maximizar la información derivada de la investigación, especialmente en lo que se refiere al modo de acción, a criterio del director del estudio se podrán tomar muestras de sangre para análisis hematológicos y de bioquímica clínica. También pueden estar indicados los análisis de orina. Los datos de los animales empleados en la fase de toxicidad crónica del estudio, normalmente de 12 meses de duración (punto 34), proporcionarán información sobre dichos parámetros. En el documento de orientación nº 116 (7) se comenta el interés de obtener este tipo de muestras en el marco de un ensayo de carcinogénesis. Si se toman muestras de sangre será al final del período de ensayo, justo antes del sacrificio de los animales o como parte del método de sacrificio. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia. También se pueden preparar frotis de sangre, especialmente si se sospecha que la médula ósea es el órgano diana, aunque se ha cuestionado el valor de obtener estas muestras en la fase de carcinogénesis para la evaluación del potencial cancerígeno u oncógeno (38).

ANATOMÍA PATOLÓGICA

Autopsia macroscópica

54. Todos los animales del estudio excepto los centinela y otros animales satélite (véase el punto 20) se someterán a una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. La autopsia de los animales centinela y de otros animales satélite se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio. El pesaje de los órganos no suele formar parte de un estudio de carcinogénesis, dado que los cambios geriátricos y, en fases más avanzadas, el desarrollo de tumores introducen confusión en la interpretación de los datos sobre el peso de los órganos. No obstante, estos datos pueden ser cruciales para sopesar las pruebas y, especialmente, las consideraciones sobre el modo de acción. Si forman parte de un estudio satélite, se recogerán a lo más tardar un año después de iniciar el estudio.
55. Los tejidos que se mencionan a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (40) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

Todas las lesiones macroscópicas	Corazón	Páncreas	Estómago (rumen, estómago glandular)
Cápsulas suprarrenales	Íleo	Glándulas paratiroides	[Dientes]
Aorta	Yeyuno	Nervios periféricos	Testículos
Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia)	Riñón	Hipófisis	Timo
Intestino ciego	Glándulas lacrimales (extraorbitales)	Próstata	Tiroides

Cuello del útero	Hígado	Recto	[Lengua]
Glándulas coagulantes	Pulmón	Glándulas salivales	Tráquea
Colon	Ganglios linfáticos (superficiales y profundos)	Vesículas seminales	Vejiga urinaria
Duodeno	Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin ser visiblemente diseccionables, también las masculinas)	Músculo esquelético	Útero (y cuello)
Epidídimo	[Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales]	Piel	[Uréteres]
Ojos (y retina)	Esófago	Médula espinal (tres secciones: cervical, mediadorsal y lumbar)	[Uretra]
[Fémur y articulación ti-biofemoral]	[Bulbo olfativo]	Bazo	Vagina
Vesícula biliar (en especies distintas de la rata)	Ovarios	[Esternón]	Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula
Glándula de Harder			

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservarán también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se examinarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 (8) y B.29 (9) del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

Examen histopatológico

56. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (40). Como mínimo se examinarán los siguientes tejidos:

- todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,
- todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,
- todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas, incluidos tumores,
- cuando se observen alteraciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis más elevada, los mismos tejidos afectados se examinarán en todos los animales de los restantes grupos de dosis,
- en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

DATOS E INFORME (TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGENÉSIS)

Datos

57. Se documentarán los datos de todos los parámetros evaluados en cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión. Los cuadros de datos agrupados reflejarán las medias y desviaciones típicas (en el caso de variables continuas) de los animales que presenten lesiones o efectos tóxicos, además de una escala de clasificación de las lesiones.

58. Los datos sobre controles históricos pueden resultar de ayuda en la interpretación de los resultados del estudio, por ejemplo cuando haya indicios de que los resultados arrojados por los controles simultáneos se desvían esencialmente de los datos recientes obtenidos en animales de control del mismo animalario o colonia. De ser evaluados, los datos sobre controles históricos deben proceder del mismo laboratorio, y corresponder a animales de edades y cepas afines que hayan sido analizados en los cinco años precedentes al estudio en cuestión.
59. Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio (punto 9). Para ello se tendrán en cuenta los ajustes de la supervivencia, en su caso.
60. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

- Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.
- Datos de identificación.
- Procedencia de la sustancia.
- Número de lote.
- Certificado de análisis químico.

Vehículo (si procede):

- Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua).

Animales de ensayo:

- Especie y cepa utilizada y motivos para elegirla.
- Número, edad y sexo de los animales al inicio del ensayo.
- Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.
- Peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones del ensayo:

- Fundamento de la elección de la vía de administración y la dosis.
- Cuando proceda, métodos estadísticos aplicados al análisis de los datos.
- Pormenores de la formulación de la sustancia o de su preparación con la comida.
- Datos analíticos acerca de la concentración obtenida, la estabilidad y la homogeneidad de la preparación.
- Vía y método de administración de la sustancia problema.
- En los estudios de inhalación se indicará si es de solo por la nariz o de cuerpo entero.
- Dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (mg/kg o ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso.
- Datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Resultados (se presentarán cuadros de datos agrupados así como los datos de cada animal).

Generalidades:

- Datos de supervivencia.
- Peso corporal y variaciones del mismo.
- Ingesta de alimento, cálculos de la eficiencia alimentaria, si se han hecho, e ingestión de agua cuando proceda.
- Datos toxicocinéticos, si los hay.
- Oftalmoscopia (en su caso).
- Hematología (en su caso).
- Bioquímica clínica (en su caso).

Observaciones clínicas:

- Signos de toxicidad.
- Incidencia (y, si se ha valorado, gravedad) de cualquier anomalía.
- Naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no).

Resultados de la autopsia:

- Peso corporal en el momento de la muerte.
- Pesaje de los órganos (y pesos relativos, cuando proceda).
- Observaciones de la autopsia; incidencia y gravedad de las anomalías.

Examen histopatológico:

- Observaciones histopatológicas de carácter no neoplásico.
- Observaciones histopatológicas neoplásicas.
- Correlación entre las observaciones macro y microscópicas.
- Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento, con una escala de clasificación de su gravedad.
- Informes sobre las eventuales evaluaciones de las preparaciones efectuadas por otros científicos.

Tratamiento estadístico de los resultados, según proceda.

Discusión de los resultados:

- Discusión de cualquier hipótesis o modelo teórico.
- Relación dosis-respuesta.
- Datos sobre controles históricos.

- Otras informaciones sobre el modo de acción.
- Valores de BMD, NOAEL o LOAEL.
- Relevancia para los seres humanos.

Conclusiones

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- (2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- (3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208
- (4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191
- (5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445
- (6) Capítulo B.27 del presente anexo. Ensayo de toxicidad oral subcrónica. Toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores.
- (7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453-Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (9) Capítulo B.8 del presente anexo. Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días.
- (10) Capítulo B.29 del presente anexo. Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días.
- (11) Capítulo B.9 del presente anexo. Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía cutánea.
- (12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793-801.
- (13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.
- (14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.
- (15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.
- (16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

- (17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 9-35.
- (18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 37-68.
- (19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 36: 69-98.
- (20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- (21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- (22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Connelly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729 – 837.
- (23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- (24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- (25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). *Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation*. Queen's University Press, Belfast. pp. 279-284.
- (26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196-1203.
- (27) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010, p. 33).
- (28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.
- (29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.
- (30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.
- (31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*, 21:15-23.
- (32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.
- (33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999-1003.

-
- (34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691-704.
 - (35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267-283.
 - (36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233-236.
 - (37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599-609.
 - (38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198-201.
 - (39) EMEA (draft) document 'Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity' (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
 - (40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126-131.
-

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.»

7) Se sustituye el capítulo B.36 por el texto siguiente:

«B.36. TOXICOCINÉTICA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 417 de la OCDE (2010). Se realizan estudios para investigar la toxicocinética de una sustancia problema a fin de obtener la debida información sobre su absorción, distribución, biotransformación (metabolismo) y excreción, relacionar la concentración o la dosis con la toxicidad observada y llegar a comprender los mecanismos toxicológicos. La toxicocinética puede ayudar a entender mejor los estudios toxicológicos demostrando que los animales de experimentación están expuestos de manera sistémica a la sustancia problema y revelando cuáles son las fracciones circulantes (la sustancia original o sus metabolitos). Los parámetros toxicocinéticos básicos que se determinan en estos estudios indican además la capacidad de acumulación de la sustancia problema en los tejidos y órganos, así como el potencial de inducción metabólica tras la exposición a dicha sustancia.
2. Los datos toxicocinéticos pueden ayudar a determinar la idoneidad y relevancia de extrapolar los datos de toxicidad animal a la evaluación del riesgo y/o del peligro para la especie humana. Por otro lado, los estudios toxicocinéticos pueden aportar información muy útil para determinar los niveles posológicos en los estudios de toxicidad (cinética lineal y no lineal), los efectos de la vía de administración, la biodisponibilidad y otras cuestiones relacionadas con el diseño experimental. Algunos de estos datos pueden servir de ayuda en el desarrollo de un modelo toxicocinético basado en la fisiología (PBTK).
3. Los datos toxicocinéticos y de los metabolitos tienen aplicaciones importantes en la medida en que indican posibles toxicidades y modos de acción, así como su relación con el nivel de dosis y la vía de exposición. Además, los datos sobre el metabolismo resultan útiles para evaluar la importancia toxicológica de la exposición a metabolitos de la sustancia problema que son de origen exógeno.
4. Una información toxicocinética adecuada será de ayuda para respaldar la mayor aceptabilidad y aplicabilidad de los modelos de relación estructura-actividad cuantitativa o de extrapolación o agrupación estructural cuando se pretende evaluar la seguridad de las sustancias. Finalmente, los datos cinéticos pueden servir para evaluar la importancia toxicológica de otras investigaciones (*in vivo/in vitro*).
5. Mientras no se mencione otra vía de administración (véanse en particular los puntos 74 a 78), el presente método de ensayo es aplicable a la administración oral de la sustancia problema.

CONSIDERACIONES INICIALES

6. Los sistemas normativos imponen diferentes requisitos y necesidades en torno a los criterios de valoración y parámetros que se usan para evaluar la toxicocinética de las diferentes clases de productos químicos (plaguicidas, biocidas, productos químicos industriales, etc.). Contra lo que es habitual, este método de ensayo describe el estudio de la toxicocinética, que abarca múltiples determinaciones y criterios de valoración. En el futuro se podrán desarrollar distintos métodos de ensayo y/o documentos de orientación para describir cada criterio de valoración detenidamente y por separado. En la aplicación del presente método de ensayo, los análisis y evaluaciones que se lleven a cabo quedarán especificados por los requisitos y las necesidades de cada sistema normativo en particular.
7. Son numerosos los estudios que se podrían realizar para evaluar el comportamiento toxicocinético de una sustancia problema dentro de un marco regulador. Dependiendo de las situaciones o necesidades normativas concretas, sin embargo, no tiene por qué ser obligatorio efectuar todos los estudios posibles para la evaluación de una sustancia. En el diseño de los estudios toxicocinéticos es importante la flexibilidad para tomar en consideración las características de la sustancia química que se pretende estudiar. En algunos casos solo habrá que investigar algunos aspectos determinados para hacer una valoración del riesgo y del peligro asociados a la sustancia problema. En algunas situaciones, se pueden recopilar los datos toxicocinéticos como parte de la evaluación de otros estudios toxicológicos. En otros casos serán necesarios estudios toxicocinéticos complementarios y más exhaustivos, en función de las necesidades normativas o de que surjan nuevos interrogantes al evaluar la sustancia problema.
8. Antes de comenzar el estudio y con el fin de mejorar su calidad y minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de ensayo tendrá en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema y de sus principales metabolitos y análogos, en la que pueden incluirse datos de otros métodos de ensayo pertinentes (estudios *in vivo* e *in vitro*, o evaluaciones *in silico*). En la planificación del estudio y la interpretación de sus

resultados pueden ser de ayuda las propiedades fisicoquímicas, como el coeficiente de partición octanol-agua (expresado como $\log P_{\text{OW}}$), el pK_a , la hidrosolubilidad, la presión de vapor, y el peso molecular de la sustancia química. Estas propiedades se pueden determinar con los procedimientos adecuados que se describen en los correspondientes métodos de ensayo.

LIMITACIONES

9. El presente método de ensayo no ha sido diseñado para contemplar circunstancias especiales, como es el caso de las hembras grávidas o lactantes y de su progenie, ni para evaluar los residuos potenciales en los animales productores de alimentos que han estado expuestos. Sin embargo, los datos obtenidos de un estudio B.36 pueden aportar una valiosa información de base para el diseño de investigaciones específicas en este sentido. El presente método de ensayo no está destinado a la investigación de nanomateriales. El informe de una revisión preliminar de las directrices de ensayo (TG) de la OCDE para determinar su aplicabilidad a los nanomateriales indica que la TG 417 (equivalente a este método de ensayo B.36) no siempre es aplicable a los nanomateriales (1).

DEFINICIONES

10. Las definiciones de términos relacionados con este método de ensayo se pueden consultar en el apéndice.

CONSIDERACIONES SOBRE EL BIENESTAR ANIMAL

11. Se ofrecen indicaciones sobre el trato compasivo de los animales en el documento de orientación (GD) nº 19 de la OCDE (2). Se recomienda consultar dicho GD en relación con todos los estudios *in vivo* e *in vitro* descritos en este método de ensayo.

DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Estudios piloto

12. Se recomienda y se insta a realizar estudios piloto para la selección de los parámetros experimentales de los estudios toxicocinéticos (metabolismo, balance de masas, procedimientos analíticos, determinación del intervalo de dosis, exhalación de CO_2 , etc.). La caracterización de algunos de estos parámetros puede no necesitar el uso de sustancias marcadas radiactivamente.

Selección de los animales

Especie

13. La especie animal (y cepa) empleada en la investigación toxicocinética será, preferiblemente, la misma que en otros estudios toxicológicos efectuados con la sustancia química de interés. Normalmente se prefiere la rata, por cuanto se utiliza ampliamente en los estudios toxicológicos. El uso complementario de otras especies puede estar justificado si los estudios críticos de toxicología aportan pruebas de toxicidad importante en estas especies, o si la toxicidad/toxicocinética en estas resulta más relevante para la especie humana. Se justificará la elección de la especie animal y de la cepa.
14. Mientras no se indique lo contrario, el presente método de ensayo se refiere a la rata como especie experimental. Si se usan otras especies experimentales es posible que deban modificarse determinados aspectos metodológicos.

Edad y cepa

15. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos (normalmente de 6-12 semanas en el momento de la administración; véanse también los puntos 13 y 14). Se justificará el uso de animales que no sean adultos jóvenes. Todos los animales deben tener edades parecidas al principio del estudio. El peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior a $\pm 20\%$ del valor medio del grupo experimental. Idealmente, la cepa empleada debe ser la misma que se haya usado para obtener la base de datos toxicológicos de la sustancia problema.

Número y sexo de los animales

16. Por cada nivel de dosis investigado se emplearán como mínimo cuatro animales de un sexo. Se justificará la elección del sexo de los animales empleados. Se planteará usar animales de ambos性 (4 machos y 4 hembras) si hay indicios para sospechar variaciones importantes de la toxicidad en función del sexo.

Alojamiento y alimentación

17. Como norma, los animales deben ser enjaulados de manera individual durante el período de estudio. El enjaulamiento en grupo puede estar justificado en circunstancias especiales. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de $22\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^\circ\text{C}$) y a una humedad relativa del 30-70 %. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

Sustancia problema

18. Se utilizará una sustancia química marcada radiactivamente con ^{14}C para investigar todos los aspectos del estudio relacionados con el balance de masas y la identificación de los metabolitos; ahora bien, si se puede demostrar que:

- es posible evaluar adecuadamente el balance de masas y la identificación de los metabolitos empleando la sustancia problema sin marcar,
- la especificidad y sensibilidad analíticas del método usado con la sustancia problema no radiactiva son iguales o superiores a las que se obtendrían con la sustancia química radiomarcada,

entonces no será necesario marcar radiactivamente la sustancia problema. Por lo demás, se pueden usar otros isótopos radiactivos y estables, particularmente si son responsables o forman parte de la fracción tóxica de la sustancia problema. Cuando sea posible, el marcador radiactivo se ubicará en una fracción nuclear de la molécula metabólicamente estable (no intercambiable, no eliminada metabólicamente en forma de CO_2 y que no pase a formar parte de la reserva de moléculas de un solo átomo de carbono del organismo). Puede ser necesario el radiomarcado de distintos sitios o regiones específicas de la molécula para seguir el destino metabólico de la sustancia problema.

19. Las sustancias problema, radiomarcadas o no, se analizarán con los métodos adecuados para establecer su pureza y su identidad. La pureza radiactiva de la sustancia problema radiomarcada debe ser la máxima posible para esa sustancia en particular (lo ideal es que supere el 95 %) y se procurará por todos los medios identificar los niveles de impurezas del 2 % o superiores. Se documentarán la pureza, la identidad y los porcentajes de impurezas que se hayan detectado. Cada marco regulador podrá proporcionar más indicaciones que orienten en la definición y las especificaciones de las sustancias que son mezclas, así como en la elección de métodos para la determinación de la pureza.

Selección de la dosis

Estudio piloto

20. Generalmente es suficiente una dosis oral única para realizar el estudio piloto. La dosis debe ser atóxica, pero lo bastante elevada para permitir la identificación de los metabolitos en las excretas (y, si procede, en el plasma) y el cumplimiento de la finalidad enunciada del estudio piloto, según se expone en el punto 12 del presente método de ensayo.

Estudios principales

21. En los estudios principales se prefiere usar como mínimo dos dosis, por cuanto la información derivada de al menos dos grupos posológicos permite establecer los niveles de dosis en otros estudios de toxicidad y contribuye a evaluar la relación dosis-respuesta observada en los estudios de toxicidad previos.

22. Cuando se administran dos dosis, ambas deben ser lo bastante elevadas para permitir la identificación de los metabolitos en las excretas (y, si procede, en el plasma). En la selección de las dosis se tendrá en cuenta la información de los estudios de toxicidad previos. Cuando no se disponga de tal información (de estudios de toxicidad oral aguda que hayan documentado los signos clínicos de toxicidad, o de estudios de administración continuada), se podrá considerar para la dosis más elevada un valor por debajo de la DL_{50} (por las vías oral y cutánea) o la CL_{50} (por inhalación) estimadas, o bien por debajo del límite inferior del intervalo de toxicidad aguda estimado. La dosis más baja será una fracción de la más elevada.

23. Cuando solo se investiga una dosis, lo ideal es que sea lo bastante elevada para permitir la identificación de los metabolitos en las excretas (y, si procede, en el plasma) sin provocar toxicidad aparente. Se justificarán los motivos de no incluir un segundo nivel posológico.

24. Cuando sea necesario establecer el efecto de la posología sobre los procesos cinéticos, puede ser que no basten dos dosis, y al menos una de ellas será lo bastante elevada para saturar dichos procesos. Si el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC) no es lineal entre dos niveles de dosis empleados en el estudio principal, ello indica con bastante certeza que se está produciendo la saturación de uno o más procesos cinéticos en algún punto entre los dos niveles de dosificación.

25. Cuando la sustancia problema posea escasa toxicidad, se empleará una dosis máxima de 1 000 mg/kg peso corporal por las vías oral y cutánea (si la vía es inhalatoria, consultese el capítulo B.2 del presente anexo; típicamente, esta dosis no debe superar los 2 mg/l). En función de las necesidades normativas y de las características específicas de la sustancia, puede hacer falta una dosis más elevada. Se justificará siempre la selección de la dosis.

26. La toxicocinética de dosis única y los datos de distribución en los tejidos pueden ser suficientes para determinar el potencial de acumulación y de persistencia. Sin embargo, en algunas circunstancias se requiere la administración de dosis repetidas: 1) para investigar mejor el potencial de acumulación y de persistencia o los cambios de toxicocinética (caso de la inducción o inhibición enzimáticas), o 2) cuando así lo exige el marco regulador de aplicación. En los estudios de administración continuada, si bien suele bastar con la administración continuada de dosis bajas, determinadas circunstancias imponen además la administración continuada de dosis elevadas (véase también el punto 57).

Administración de la sustancia problema

27. La sustancia problema se debe disolver o suspender de manera homogénea en el mismo vehículo que se haya empleado en los estudios de toxicidad oral con administración por sonda gástrica, si se dispone de esa información. Se justificará la elección del vehículo. En el diseño del estudio se tendrán en cuenta la elección del vehículo y el volumen de administración. El método habitual de administración es por sonda gástrica; no obstante, en determinadas situaciones puede resultar ventajosa la administración del producto en una cápsula de gelatina o mezclado con el alimento (se justificará en ambos casos). Se documentará la verificación de la dosis real que se administra a cada animal.
28. El volumen máximo de líquido que se puede administrar de una vez por sonda gástrica depende del tamaño de los animales experimentales, del tipo de vehículo y de si se priva a los animales de alimento antes de administrarles la sustancia problema. Se justificarán los motivos de alimentar a los animales o de restringir la comida antes de administrar la dosis. Normalmente, el volumen será lo más bajo posible, se trate de vehículos acuosos o no. En el caso de los roedores, el volumen de administración no debe exceder generalmente de 10 ml/kg peso corporal. Cuando se trata de sustancias químicas más lipófilas, el volumen de vehículo puede ser en principio de 4 ml/kg peso corporal. Si la administración es continuada, de modo que esté contraindicado el ayuno diario, se contemplará un volumen menor de administración (2-4 ml/kg peso corporal). Siempre que sea posible se procurará utilizar un volumen de dosis coherente con el administrado en otros estudios realizados con la misma sustancia introducida por sonda gástrica.
29. Con el fin de establecer la biodisponibilidad o la absorción oral relativa, se puede recurrir a la administración intravenosa (i.v.) de la sustancia problema y a la determinación de sus concentraciones en la sangre o las excretas. En el estudio i.v. se administra, en un vehículo adecuado, una dosis única (que suele ser equivalente pero no superior a la dosis oral más baja; véase la selección de la dosis) de la sustancia problema. El producto se administrará en un volumen adecuado (por ejemplo, 1 ml/kg peso corporal), en el lugar de aplicación establecido, como mínimo a 4 animales del sexo seleccionado para la investigación (pueden ser ambos sexos, siempre que se justifique; véase el punto 16). Para la administración i.v. de la sustancia problema se requiere la suspensión o disolución completa de la dosis preparada. El vehículo de la administración i.v. no debe afectar a la circulación ni a la integridad de la sangre. Si la sustancia problema se administra en infusión, se documentará la velocidad de la misma y se normalizará en todos los animales siempre y cuando se emplee una bomba. Se empleará anestesia cuando se vaya a canular (ya sea para la administración de la sustancia química o para tomar muestras de sangre) la vena yugular o la arteria femoral. Se considerará detenidamente el tipo de anestesia usado, ya que puede influir en la toxicocinética. Se permitirá a los animales recuperarse debidamente antes de administrarles la sustancia problema y el vehículo.
30. Con determinadas sustancias se pueden emplear otras vías de administración, como la cutánea o la inhalatoria (véanse los puntos 74-78), dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas y del uso o del grado de exposición humana previsibles.

Mediciones

Balance de masas

31. El balance de masas viene determinado por la suma del porcentaje de la dosis (radiactiva) administrada que se excreta en la orina, las heces y el aire espirado y el porcentaje que está presente en los tejidos, el resto del cuerpo y los líquidos de lavado de la jaula (véase el punto 46). En general se considera aceptable una recuperación total de la dosis (radiactiva) administrada > 90 %.

Absorción

32. Es posible hacer una estimación inicial de la absorción excluyendo del balance de masas el porcentaje de la dosis presente en el aparato digestivo y/o en las heces. En el punto 33 se puede consultar el cálculo del porcentaje de absorción. En los puntos 44-49 se describe la investigación de las excretas. Cuando el estudio del balance de masas no permita establecer la magnitud exacta de la absorción que sigue a la administración oral (por ejemplo, cuando se detecte en las heces más del 20 % de la dosis administrada), pueden ser necesarias otras investigaciones. Estas pueden ser de dos tipos: 1) administración oral de la sustancia problema y medición de su contenido en la bilis, o 2) administración oral o i.v. de la sustancia problema y medición, por cada una de las dos vías, de su contenido neto en orina + aire espirado + cuerpo. En los dos tipos de diseño, la medida de la radiactividad se efectúa como un método subsidiario del análisis químico específico de la sustancia problema y sus metabolitos.
33. En los estudios de excreción biliar la vía de administración tradicional es la oral. En este tipo de estudios, se canulan los conductos biliares de al menos 4 animales del sexo seleccionado (o de ambos sexos, siempre que se justifique) y se les administra una dosis única de la sustancia problema. Después de la administración se supervisa la excreción de la radiactividad/sustancia problema en la bilis durante el tiempo necesario para calcular el porcentaje de la dosis administrada que se excreta por esta vía, el cual se aplica directamente al cálculo de la absorción oral según la fórmula siguiente:

Porcentaje de absorción = (cantidad presente en bilis + orina + aire espirado + cuerpo salvo el contenido del aparato digestivo)/cantidad administrada × 100

34. Con determinadas sustancias se produce la secreción directa por la mucosa intestinal de la dosis absorbida. En tales casos, la medición del porcentaje de dosis en heces después de la administración oral en ratas sometidas a canulación del conducto biliar no se considera representativa de la dosis no absorbida. Se recomienda que, cuando sea previsible la secreción intestinal, el cálculo del porcentaje de dosis absorbida se base en una comparación de la dosis excretada después de las administraciones oral e i.v. (ratas con el conducto biliar intacto o canulado; véase el punto 35). Se recomienda también que, cuando se juzgue necesario cuantificar la secreción intestinal, se mida la excreción que sigue a la administración de una dosis i.v. en ratas con el conducto biliar canulado.

Biodisponibilidad

35. La biodisponibilidad se puede determinar por la cinética plasmática/sanguínea medida en los grupos de administración oral e i.v., según se describe en los puntos 50-52, mediante análisis químico específico de la sustancia problema y de sus metabolitos principales, de modo que no se requiere el marcado radiactivo. El cálculo de la biodisponibilidad (F) de la sustancia problema o de sus metabolitos principales se puede hacer según la fórmula siguiente:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dosis_{IV}/Dosis_{exp})$$

donde AUC es el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo, y exp es la vía de administración experimental (oral, cutánea o inhalatoria).

36. En la evaluación del riesgo de efectos sistémicos, en general se prefiere calcular la biodisponibilidad del componente tóxico antes que el porcentaje de absorción cuando se comparan las concentraciones sistémicas observadas en animales experimentales con los datos análogos de biovigilancia obtenidos en estudios de exposición ocupacional. La situación puede hacerse más compleja si las dosis se sitúan en el intervalo de no linealidad, por lo que conviene que el cribado toxicocinético determine las dosis del intervalo lineal.

Distribución en los tejidos

37. El conocimiento de la distribución en los tejidos de una sustancia y de sus metabolitos es importante para la identificación de los tejidos diana, la comprensión de los mecanismos que subyacen a la toxicidad, y la calibración del potencial de acumulación y persistencia que tienen la sustancia y sus metabolitos. El porcentaje de la dosis (radiactiva) total presente en los tejidos y en el resto del cuerpo se medirá como mínimo al concluir el ensayo de excreción (habitualmente, hasta 7 días después de administrar la dosis, o menos dependiendo del comportamiento de la sustancia concreta). Cuando no se detecte la sustancia problema en los tejidos al concluir el estudio (por ejemplo, porque tenga una semivida corta y se haya eliminado antes), conviene ser precavido para no malinterpretar los datos. En estas situaciones, se investigará la distribución en los tejidos en un momento que coincida con el pico de concentración plasmática/sanguínea ($T_{máx}$) de la sustancia (y/o de sus metabolitos) o con la tasa máxima de excreción urinaria, según convenga (véase el punto 38). Puede ser necesario, además, tomar muestras de tejido en otros momentos para determinar la distribución de la sustancia problema y/o sus metabolitos, para evaluar (cuando proceda) la dependencia del tiempo, para ayudar a establecer el balance de masas o porque así lo estipule la autoridad competente. Se tomarán muestras de los tejidos siguientes: adiposo, hígado, aparato digestivo, riñón, bazo, sangre completa, resto del cuerpo, órganos diana y otros tejidos (tiroídes, eritrocitos, órganos reproductores, piel y ojos, especialmente en animales pigmentados) que puedan revestir importancia para la evaluación toxicológica de la sustancia problema. Se contemplará el análisis de otros tejidos en los mismos tiempos de medición con el fin de maximizar el uso de los animales, pero también en el caso de que se observe toxicidad en un órgano diana en los estudios de toxicidad crónica o subcrónica. Se documentará además la concentración (radiactiva) residual y la relación de concentraciones en tejidos/plasma (sangre).

38. Puede ser también necesario, o requerido por la autoridad competente, el estudio de la distribución en los tejidos en un momento que coincide con el pico de concentración plasmática/sanguínea ($T_{máx}$) o con la tasa máxima de excreción urinaria, determinada en los correspondientes ensayos de cinética plasmática/sanguínea o de excreción. Tal información puede ser útil para esclarecer la toxicidad y el potencial de acumulación y persistencia de la sustancia problema y sus metabolitos. Se justificará la selección de las muestras de tejido; en general, las muestras para análisis deben ser idénticas a las ya mencionadas (véase el punto 37).

39. En los estudios de distribución en los tejidos, la cuantificación de la radiactividad se puede hacer mediante disección de órganos, homogeneización, combustión y/o solubilización, seguidas de recuento de centelleo líquido (LSC) de los residuos retenidos. Algunas técnicas que se encuentran en distintas fases de desarrollo, como la autorradiografía cuantitativa del cuerpo entero y la autorradiografía microscópica de receptores, pueden ser útiles para medir la distribución de una sustancia problema en los órganos y los tejidos (3) (4).

40. Cuando la vía de exposición es distinta de la oral, se deben tomar y analizar muestras de tejidos específicos, como son los pulmones en los estudios de inhalación y la piel en los estudios dermatológicos. Véanse los puntos 74 a 78.

Metabolismo

41. Se tomarán muestras de excretas (y de plasma, según proceda) para la identificación y la cuantificación de la sustancia problema intacta y de sus metabolitos, tal como se describe en los puntos 44-49. Se acepta la agrupación de las excretas para facilitar la identificación metabólica en un grupo posológico dado. Se recomienda hacer un perfil de los metabolitos a intervalos de tiempo determinados. Si la carencia de muestras o de radiactividad lo impide, se admite la agrupación de la orina y las heces recogidas en distintos momentos, pero nunca es aceptable la agrupación entre distintos sexos o grupos de dosis. Se emplearán los oportunos métodos cualitativos y cuantitativos para valorar la radiactividad en orina, en heces y espirada, y si procede en la bilis de los animales tratados.
42. Se procurará por todos los medios identificar todos los metabolitos con un contenido igual o superior al 5 % de la dosis administrada y proporcionar un esquema metabólico de la sustancia problema. Deberán identificarse las sustancias problema que se hayan detectado en las excretas con un contenido igual o superior al 5 % de la dosis administrada. Por identificación se entiende la determinación estructural exacta de sus componentes. Habitualmente, la identificación se acomete mediante co-cromatografía del metabolito y de sustancias patrón conocidas aplicando dos sistemas no afines, o mediante técnicas que permiten una identificación estructural positiva como son la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear (RMN), etc. En el caso de la co-cromatografía, las técnicas cromatográficas que emplean la misma fase estacionaria con dos sistemas de solvente distintos no se consideran un método adecuado de doble verificación de la identidad del metabolito, puesto que no son independientes. La identificación mediante co-cromatografía debe hacerse con dos sistemas no afines, analíticamente independientes, como son la cromatografía en capa fina (TLC) de fase normal e inversa y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La confirmación por medios espectroscópicos no será necesaria, siempre que la separación cromatográfica sea de calidad aceptable. Se puede llegar también a una identificación inequívoca con métodos que proporcionan información estructural, tales como: cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC-MS) o cromatografía de líquidos con espectrometría de masas en tandem (LC-MS/MS), cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) y espectroscopía de RMN.
43. Cuando no sea posible la identificación de los metabolitos con un contenido igual o superior al 5 % de la dosis administrada, se agregará una justificación o explicación en el informe final. Para llegar a una comprensión mejor de la vía metabólica que permite evaluar el riesgo o factor de riesgo que supone la sustancia problema, puede ser conveniente identificar los metabolitos con un contenido inferior al 5 % de la dosis administrada. Siempre que sea posible se aportará la confirmación estructural. Puede incluirse el perfil en plasma, sangre u otros tejidos.

Excreción

44. La tasa y la velocidad de excreción de la dosis administrada se determinará midiendo el porcentaje recuperado de la dosis (radiactiva) en orina, heces y aire espirado. Estos datos ayudarán, entre otras cosas, a establecer el balance de masas. A intervalos adecuados se determinarán las cantidades de sustancia problema (radiactividad) eliminada en orina, heces y aire espirado (véanse los puntos 47-49). Los ensayos de administración continuada deben diseñarse correctamente con el fin de recopilar datos de excreción que cumplan los objetivos descritos en el punto 26. Así será posible la comparación con los ensayos de dosis única.
45. Si un estudio piloto ha demostrado (de conformidad con el punto 49) que no se excreta en el aire espirado una cantidad importante de la sustancia problema (radiactividad), no será necesario tomar muestras de aire espirado en el estudio definitivo.
46. Cada animal se ubicará en una unidad metabólica aparte para la recogida de las excretas (orina, heces y aire espirado). Al concluir cada período de recogida (véanse los puntos 47-49), las unidades metabólicas se lavan con el disolvente adecuado (lo que se llama "lavado de la jaula") para garantizar la máxima recuperación de la sustancia problema (radiactividad). La recogida de las excretas concluirá al cabo de 7 días o cuando se haya recuperado al menos el 90 % de la dosis administrada, lo que ocurra antes.
47. La cantidad total de sustancia problema (radiactividad) en la orina se determinará como mínimo en dos momentos del día 1 de recogida, uno de ellos a las 24 horas de la administración, y en lo sucesivo diariamente hasta la conclusión del estudio. Se recomienda establecer más de dos momentos de muestreo en el día 1 (por ejemplo, a las 6, 12 y 24 horas). Se analizarán los resultados de los estudios piloto para obtener información sobre otros momentos, complementarios o alternativos, de recogida. Se justificarán debidamente los programas de recogida de muestras.
48. La cantidad total de sustancia problema (radiactividad) en las heces se determinará diariamente, comenzando a las 24 horas de la administración y hasta la conclusión del estudio, salvo que los estudios piloto indiquen otros momentos, complementarios o alternativos, de recogida. Se justificará debidamente cualquier otro programa de recogida de muestras.
49. En un experimento concreto se podrá interrumpir la recogida del CO₂ y de otras sustancias volátiles en el aire espirado cuando en el mismo se detecte menos del 1 % de la dosis administrada durante un período de recogida de 24 horas.

Estudios cinéticos

Cinética plasmática/sanguínea

50. La finalidad de estos estudios es hacer estimaciones de los principales parámetros toxicocinéticos [$C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$, semivida ($t_{1/2}$), AUC] de la sustancia problema. Estos estudios se pueden realizar con una sola dosis o, más frecuentemente, con dos o más dosis. La posología dependerá de la naturaleza y del objeto de la investigación. Los datos cinéticos son a veces necesarios para resolver cuestiones como la biodisponibilidad de la sustancia problema o evaluar el efecto de la dosis sobre el aclaramiento (por ejemplo, evaluar si el aclaramiento se satura de manera dependiente de la dosis).
51. En este tipo de estudios deben emplearse como mínimo 4 animales de un mismo sexo por cada grupo de dosis. Se justificará la elección del sexo de los animales empleados. Se planteará usar animales de ambos性 (4 machos y 4 hembras) si hay indicios para sospechar variaciones importantes de la toxicidad en función del sexo.
52. Tras la administración de la sustancia problema (radiomarcada), se tomarán muestras de sangre de cada animal en los momentos indicados y con una metodología de muestreo apropiada. El volumen y el número de las muestras de sangre que se pueden tomar de cada animal pueden estar limitados por los posibles efectos del muestreo reiterado sobre la salud y fisiología de los animales o sobre la sensibilidad del método analítico. Se analizarán las muestras de cada animal por separado. En algunas circunstancias (por ejemplo, caracterización de los metabolitos), puede estar indicado agrupar las muestras de varios animales. Las muestras agrupadas se identificarán claramente y se justificará el motivo de agruparlas. Cuando se usan sustancias químicas radiomarcadas, puede estar indicado el análisis de la radiactividad total presente. En tal caso se analizará la radiactividad total en la sangre completa y en el plasma, o bien en el plasma y los eritrocitos, para poder calcular el cociente de distribución sangre/plasma. En otras situaciones se precisan estudios más específicos, que exigen la identificación del compuesto parental y/o de sus metabolitos o del grado de afinidad por las proteínas.

Cinética en otros tejidos

53. La finalidad de estos estudios es conocer cómo evolucionan con el tiempo las concentraciones de la sustancia problema en los diversos tejidos, para dar respuesta a interrogantes como el mecanismo de la acción tóxica, la bioacumulación y la biopersistencia. La selección de los tejidos y de la frecuencia de medición dependerá del aspecto concreto que se pretenda investigar y de la base de datos toxicológicos de la sustancia estudiada. Para el diseño de estos estudios cinéticos complementarios se tendrá en cuenta la información acumulada, tal como se describe en los puntos 37-40. En estos estudios la administración puede ser única o continuada. Se justificará detalladamente el método elegido.

54. Los motivos para efectuar estudios cinéticos en otros tejidos pueden ser los siguientes:

- que haya indicios de una semivida prolongada en sangre, con posible acumulación de la sustancia problema en varios tejidos, o
- que interese comprobar si se ha alcanzado un estado estacionario en tejidos concretos (por ejemplo, en los estudios de administración continuada, aunque se haya alcanzado un estado estacionario aparente en sangre, puede ser interesante determinar si se ha alcanzado ese mismo estado estacionario en los tejidos diana).

55. En este tipo de investigación cinética, se administra una dosis oral apropiada de la sustancia problema como mínimo a 4 animales por cada dosis y tiempo de medición, y se supervisa la distribución en los tejidos seleccionados a lo largo del tiempo. Se puede usar un solo sexo de animales, salvo que haya indicios de toxicidad asociada al sexo. Se analizará la radiactividad total o bien el compuesto parental y/o sus metabolitos, dependiendo del aspecto que se pretenda investigar. La distribución en los tejidos se evaluará con las técnicas apropiadas.

Inducción e inhibición enzimáticas

56. El estudio de los posibles efectos de inducción o inhibición enzimáticas o de la biotransformación de la sustancia problema puede ser necesario en alguna de las siguientes situaciones:
- 1) hay indicios de una relación entre la biotransformación de la sustancia problema y el aumento de la toxicidad;
 - 2) los datos de toxicidad disponibles indican una relación no lineal entre la dosis y el metabolismo;
 - 3) los resultados de los estudios de identificación de metabolitos apuntan a la formación de un metabolito potencialmente tóxico por una vía metabólica inducida por la sustancia problema;
 - 4) para hallar explicación a efectos hipotéticamente vinculados a fenómenos de inducción enzimática;

- 5) si se observan alteraciones toxicológicamente significativas en el perfil metabólico de la sustancia problema, ya sea en ensayos *in vitro* o *in vivo* realizados con diferentes especies o condiciones experimentales, puede estar indicada la caracterización de las enzimas que intervienen (por ejemplo, enzimas de fase I como las isoenzimas del sistema de la monooxigenasa dependiente del citocromo P450, enzimas de fase II como el sistema enzimático de la sulfotransferasa o de la uridina-difosfato-glucuronosiltransferasa, u otras). Tal información podría ser de ayuda para evaluar la pertinencia de las extrapolaciones entre especies.
57. Deben emplearse protocolos experimentales adecuados para evaluar las alteraciones toxicocinéticas relacionadas con la sustancia problema, debidamente validados y justificados. Ejemplos de tales protocolos serían la administración continuada de una sustancia problema sin marcar, seguida de una dosis radiomarcada el día 14, o la administración continuada de una sustancia radiomarcada con muestreos los días 1, 7 y 14 para determinar los perfiles metabólicos. La administración continuada de una sustancia radiomarcada también puede aportar datos sobre su bioacumulación (véase el punto 26).

OTROS PLANTEAMIENTOS

58. Otros planteamientos complementarios de los estudios *in vivo* que se describen en el presente método de ensayo pueden proporcionar informaciones útiles sobre la absorción, distribución, metabolismo o eliminación de una sustancia problema en ciertas especies.

Uso de la información *in vitro*

59. Algunos aspectos del metabolismo de la sustancia problema se pueden investigar en ensayos *in vitro* con la metodología adecuada. Para el estudio de los posibles metabolitos se pueden emplear aislados o cultivos recientes de hepatocitos y fracciones subcelulares (por ejemplo, microsomas y citosol o fracción S9) de hígado. El metabolismo local del órgano diana, como el pulmón, puede ser de interés para la evaluación del riesgo. A este efecto resultan útiles las fracciones microsómicas de los tejidos diana. Las investigaciones con microsomas pueden ayudar a entender las posibles diferencias en función del sexo y de la edad y a caracterizar los parámetros enzimáticos (K_m y $V_{máx}$) de interés para evaluar la dependencia del metabolismo en función de la dosis o los niveles de exposición. Además, las investigaciones con microsomas pueden ayudar a identificar las enzimas microsómicas específicas que intervienen en el metabolismo de la sustancia problema, lo que tendría relevancia de cara a la extrapolación entre especies (véase también el punto 56). La capacidad de inducir biotransformación se puede investigar también en fracciones subcelulares de hígado (por ejemplo, microsomas y citosol) de animales previamente tratados con la sustancia de interés, *in vitro* en estudios de inducción de hepatocitos o a partir de líneas celulares específicas que expresen las enzimas relevantes. En circunstancias especiales y en las condiciones adecuadas, se podría contemplar el uso de fracciones subcelulares de tejidos humanos para investigar las posibles diferencias de biotransformación entre distintas especies. Los resultados de las investigaciones *in vitro* pueden ser útiles para el desarrollo de modelos toxicocinéticos basados en la fisiología (PBTK) (5).
60. Los estudios de absorción dérmica *in vitro* pueden proporcionar una información suplementaria para caracterizar la absorción (6).
61. Es posible usar cultivos celulares primarios de hepatocitos y extensiones de tejido fresco para hacer investigaciones similares a las realizadas con microsomas hepáticos. En ciertos casos es posible resolver cuestiones concretas empleando líneas celulares con una expresión definida de la enzima relevante o producidas mediante ingeniería genética. En otros casos resultará útil el estudio *in vitro* de la inhibición y la inducción de las isoenzimas del citocromo P450 (CYP1A1, 2E1, 1A2, y otras) y/o de las enzimas de fase II provocada por el compuesto parental. La información obtenida puede ser aplicable a otros compuestos estructuralmente afines.

Uso de los datos toxicocinéticos de los estudios de toxicidad como información complementaria

62. El análisis de las muestras de sangre, tejidos o excretas obtenidas en el transcurso de cualesquiera otros estudios de toxicidad pueden proporcionar datos sobre la biodisponibilidad, la variación de las concentraciones plasmáticas con el tiempo (AUC, $C_{máx}$), la capacidad de bioacumulación, la velocidad de eliminación y los cambios metabólicos y cinéticos dependientes de la edad y del sexo.
63. Se puede enfocar el diseño del estudio para intentar dar respuesta a cuestiones relacionadas con los niveles de dosis más elevadas, como son: la saturación de las vías de absorción, biotransformación o excreción; la intervención de nuevas vías metabólicas, y la limitación de los metabolitos tóxicos.
64. La evaluación de los factores de riesgo puede hacerse extensiva a cuestiones como:
- el cambio de la sensibilidad con la edad, debido a variaciones en el estado de la barrera hematoencefálica, la función renal o la capacidad destoxicificadora del hígado,
 - el cambio de la sensibilidad con las subpoblaciones, debido a diferencias en la capacidad de biotransformación o a otras variaciones toxicocinéticas,
 - el grado de exposición del feto, por el paso de las sustancias a través de la placenta, o del recién nacido por transmisión con la leche materna.

Aplicación de los modelos toxicocinéticos

65. Los modelos toxicocinéticos son aplicables a diversos aspectos de la evaluación del riesgo y de los factores de riesgo, como cuando se trata de prever la exposición sistémica y la concentración alcanzada en los tejidos internos. Permiten valorar también aspectos concretos del modo de acción y constituyen una base para la extrapolación entre especies y el esclarecimiento de las vías de exposición, las pautas de administración y la evaluación del riesgo humano. En el desarrollo de modelos PBTK para una sustancia problema y una especie determinadas son de ayuda los siguientes datos: 1) coeficientes de reparto; 2) constantes bioquímicas y parámetros fisiológicos; 3) parámetros específicos de la vía de absorción, y 4) datos cinéticos *in vivo* para la evaluación del modelo [por ejemplo, valores de aclaramiento en las vías de excreción principales ($> 10\%$), K_m y V_{max} para valorar el metabolismo]. Los datos experimentales que se tomen para el desarrollo del modelo han de basarse en métodos científicamente reconocidos, y los resultados del modelo deben ser validados. A menudo se determinan los parámetros específicos de la sustancia problema y de la especie, como la velocidad de absorción, el coeficiente de reparto entre sangre y tejidos y las constantes metabólicas, para facilitar el desarrollo de modelos no compartimentales o basados en la fisiología (7).

DATOS E INFORME

66. Es recomendable que el informe del estudio vaya acompañado de un índice.

Cuerpo principal del informe

67. El cuerpo principal del informe debe contener la información que se recoge en este método de ensayo, organizada en secciones y puntos de la manera siguiente:

Resumen

68. Esta sección del informe debe contener un resumen del diseño del estudio y una descripción de los métodos empleados. Debe destacar así mismo los principales resultados referentes al balance de masas, la naturaleza y magnitud de los metabolitos, los residuos en tejidos, la velocidad de eliminación, la capacidad de bioacumulación, las diferencias en función del sexo, etc. El resumen se presentará con el detalle suficiente para permitir la evaluación de los resultados.

Introducción

69. Esta sección del informe debe contener los objetivos del estudio, su justificación y diseño, así como cualquier información histórica o de referencia pertinente.

Material y métodos

70. En esta sección se hará una descripción pormenorizada de toda la información pertinente.

a) Sustancia problema

Esta subsección debe facilitar la identificación de la sustancia problema: denominación química, estructura molecular, determinación cualitativa y cuantitativa de la composición química, pureza y, siempre que sea posible, tipo de impurezas y sus cantidades. Debe contener además información sobre propiedades fisico-químicas tales como el estado físico, color, solubilidad macroscópica o coeficiente de partición, estabilidad y, en su caso, corrosividad. Cuando proceda, se facilitará información acerca de los isómeros. Si se trata de una sustancia radiomarcada, esta subsección debe contener además los siguientes datos: tipo de radionúcleido, posición del marcador, actividad específica y pureza radioquímica.

Se indicará el tipo o la descripción de cualesquiera vehículo, diluyentes, agentes de suspensión, emulsionantes y demás productos empleados para la administración de la sustancia problema.

b) Animales de ensayo

Esta subsección debe contener la información referente a los animales de ensayo, como la selección y justificación de la especie, cepa y edad al principio del estudio, el sexo y el peso corporal, el estado de salud y la zootecnia.

c) Métodos

Esta subsección debe contener los pormenores del diseño del estudio y la metodología empleada. Debe incluir una descripción de:

- 1) la justificación de cualquier cambio de la vía o de las condiciones de exposición, cuando proceda;

- 2) la justificación para seleccionar los niveles o concentraciones de las dosis;
- 3) una descripción de los estudios piloto utilizados en el diseño experimental de los estudios de seguimiento, cuando proceda; se presentarán los datos que respalden el estudio piloto;
- 4) se describirá la forma de preparar la disolución de la dosis y, en su caso, el tipo de disolvente o vehículo;
- 5) el número de lotes o grupos de tratamiento y el número de animales por grupo;
- 6) las concentraciones y el volumen de las dosis (y la actividad específica de la dosis cuando sea radiactiva);
- 7) la(s) vía(s) y los métodos de administración;
- 8) la frecuencia de administración;
- 9) el período de ayuno (en su caso);
- 10) la radiactividad total por animal;
- 11) la manipulación de los animales;
- 12) la recogida y el tratamiento de las muestras;
- 13) los métodos analíticos aplicados a la separación, cuantificación e identificación de los metabolitos;
- 14) el límite de detección de los métodos empleados;
- 15) otros procedimientos y medidas experimentales empleados (entre ellos, la validación de los métodos de análisis de los metabolitos).

d) Análisis estadístico

Si se hace un análisis estadístico de los resultados, el informe debe recoger información suficiente sobre el método y el programa informático empleados, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda reevaluar y reconstruir el análisis.

En el caso de estudios de modelización de sistemas como el PBTK, la presentación de los modelos debe comprender una descripción de los mismos que permita su reconstrucción y validación independientes (véanse el punto 65 y la definiciones del apéndice):

Resultados

71. En esta sección se deben presentar todos los datos de manera descriptiva en el texto, así como resumidos y tabulados con la pertinente evaluación estadística. Los datos de recuento radiactivo deben resumirse y expresarse de forma adecuada a la naturaleza del estudio, habitualmente en microgramos o miligramos equivalentes por masa de muestra, aunque pueden usarse otras unidades. Esta sección debe contener ilustraciones gráficas de los resultados, una reproducción de los datos cromatográficos y espectrométricos representativos, la identificación y cuantificación de los metabolitos y las rutas metabólicas propuestas, acompañadas de la estructura molecular de los metabolitos. Debe contener además, cuando proceda, la siguiente información:

- 1) Recuperación absoluta y relativa de la radiactividad en orina, heces, aire espirado y líquidos de lavado (de orina y heces) de la jaula.
 - En los estudios dermatológicos, se incluirán también los datos de recuperación de la sustancia problema en la piel tratada y los lavados epidérmicos; y radiactividad residual en el dispositivo de cobertura de la piel y en la unidad metabólica, así como en los líquidos analizados del lavado epidérmico. Se ofrecen más observaciones en los puntos 74 a 77.
 - En los estudios de inhalación se incluirán también los datos de recuperación de la sustancia problema en los pulmones y tejidos nasales (8). Se ofrecen más observaciones en el punto 78.

- 2) Distribución en los tejidos, expresada en porcentaje de la dosis administrada y en concentración (microgramos equivalentes por gramo de tejido), y coeficiente de reparto tejidos-sangre o tejidos-plasma.
- 3) Se calculará el balance de masas en todos los estudios en que se valoren los tejidos corporales y las excretas.
- 4) Concentraciones plasmáticas y parámetros toxicocinéticos (biodisponibilidad, AUC, $C_{\text{máx}}$, $T_{\text{máx}}$, eliminación, semivida) medidos después de la administración por la vía o vías de exposición principales.
- 5) Velocidad y porcentaje de absorción de la sustancia problema después de su administración por la vía o vías de exposición principales.
- 6) Cantidad de la sustancia problema y de sus metabolitos (expresadas en porcentaje de la dosis administrada) que se recuperan en las excretas.
- 7) Referencias a los datos del apéndice que reflejan los resultados individuales de cada animal en todos los parámetros (dosis administrada, porcentaje de recuperación, concentraciones, parámetros toxicocinéticos, etc.).
- 8) representación gráfica de las rutas metabólicas propuestas y las estructuras moleculares de los metabolitos.

Discusión y conclusiones

72. En esta sección el autor o autores deben:

- 1) proponer una ruta metabólica hipotética basada en los resultados de metabolismo y eliminación de la sustancia problema;
- 2) comentar cualquier posible diferencia de eliminación y/o biotransformación de la sustancia problema en función de la especie y del sexo;
- 3) tabular y comentar la identificación y la cuantificación de los metabolitos, velocidades de eliminación, capacidad de bioacumulación y nivel residual en los tejidos del compuesto parental o de sus metabolitos y, en su caso, las posibles variaciones toxicocinéticas dependientes de la dosis;
- 4) incorporar a esta sección cualesquiera datos toxicocinéticos de interés que se hayan obtenido en el transcurso de los estudios de toxicidad;
- 5) presentar una conclusión concisa que esté respaldada por los resultados del estudio;
- 6) añadir las secciones que se juzguen necesarias o pertinentes.

73. Se pueden añadir secciones para adjuntar referencias bibliográficas, tablas, figuras, apéndices, etc.

VÍAS DE EXPOSICIÓN ALTERNATIVAS

Cutánea

Tratamiento cutáneo

74. En esta sección se recoge información específicamente relacionada con la investigación toxicocinética de la sustancia problema por vía cutánea. La absorción cutánea se describe en el capítulo B.44 de este anexo [Absorción cutánea: método *in vivo* (9)]. Para otros parámetros como los relacionados con la distribución y el metabolismo puede aplicarse este método de ensayo B.36. En el tratamiento cutáneo se aplican una o más concentraciones de la sustancia problema. La sustancia problema (material puro, diluido o formulado que contiene la sustancia problema y que se aplica a la piel) debe ser la misma (o un análogo realista) que aquella a la que pudiera verse expuesto el hombre u otra posible especie diana. Las dosis deben seleccionarse de conformidad con los puntos 20-26 de este método de ensayo. En la selección de la dosis cutánea se tendrán en cuenta factores como la exposición humana previsible y las concentraciones a las que se haya observado toxicidad en otros estudios de toxicidad cutánea. La dosis cutánea se disolverá, si es preciso, en un vehículo adecuado y se aplicará en el volumen necesario para liberar la dosis prevista. Antes de proceder a la aplicación, se recorta el pelo de la región dorsal del tronco de los animales. Se puede recurrir al rasurado, pero, en este caso, debe efectuarse unas 24 horas antes del ensayo. En ambos casos hay que cuidar de no lesionar la piel, lo que

podría alterar su permeabilidad. Deberá dejarse despejada, para la aplicación de la sustancia problema, una superficie equivalente aproximadamente al 10 % de la corporal. Cuando se trata de sustancias muy tóxicas, la superficie despejada puede ser inferior al 10 %, pero deberá cubrirse en todo lo posible con una capa delgada y uniforme del producto. En todos los grupos de tratamiento cutáneo se tratará una superficie de piel de la misma extensión. Las zonas tratadas se protegerán con un apósito bien sujetado. Los animales se enjaularán por separado.

75. Debe hacerse un estudio de lavado epidérmico para evaluar la fracción de la dosis de sustancia química aplicada que se puede eliminar de la piel lavando la zona tratada con agua y un jabón suave. Este estudio puede servir también para establecer el balance de masas cuando la sustancia problema se administra por vía cutánea. En el estudio de lavado epidérmico se aplica una dosis única de la sustancia problema a dos animales. La selección de la dosis se hará de conformidad con el punto 23 de este método de ensayo (véase también el tiempo de contacto epidérmico en el punto 76). Se determinan las cantidades de la sustancia problema que se recuperan en los líquidos de lavado, a fin de evaluar la eficacia con que dicho lavado elimina la sustancia de la piel.
76. Salvo que sea corrosiva, la sustancia problema se aplica y mantiene sobre la piel durante un tiempo mínimo de 6 horas. En el momento de retirar el apósito, la zona tratada se lava siguiendo el procedimiento descrito en el estudio de lavado epidérmico (véase el punto 75). Se analizará el contenido de sustancia residual en el apósito y en los líquidos de lavado. Al concluir la investigación, se sacrificará cada animal de manera compasiva, de conformidad con (2), y se le retirará la piel tratada. Se prepara debidamente un corte de piel tratada para analizarlo y valorar la sustancia (radiactividad) residual.
77. En la evaluación toxicocinética de los productos farmacéuticos puede ser necesario aplicar diversos procedimientos, de conformidad con el marco regulador apropiado.

Inhalación

78. Se emplea una concentración única (o más, si es necesario) de la sustancia problema. Las concentraciones deben seleccionarse de conformidad con los puntos 20-26 de este método de ensayo. Los tratamientos de inhalación deben hacerse con un equipo inhalador de "cono nasal" o de "solo la cabeza" para evitar la absorción por otras vías (8). Si las condiciones de exposición son otras, habrá que justificar y documentar los cambios. Se definirá el tiempo de inhalación; es habitual una exposición de 4-6 horas.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.
- (2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane End-points for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N° 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.
- (3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, *J Pharm and Tox Methods* 46: 73-81.
- (4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J. Pharmacological and Toxicological Methods* 51: 25-40.
- (5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50: 400 – 411.
- (6) Capítulo B.45 del presente anexo. Absorción cutánea: método *in vitro*.
- (7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

- (9) Capítulo B.44 del presente anexo. Absorción cutánea: método *in vivo*.
- (10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.
- (11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.
-

Apéndice

DEFINICIONES

Absorción: conjunto de procesos por los que una sustancia pasa a los tejidos orgánicos. El término se refiere a la absorción del compuesto parental y de todos sus metabolitos. No debe confundirse con la "biodisponibilidad".

Absorción oral: porcentaje de la dosis de sustancia que es absorbido en el lugar de administración (es decir, el aparato digestivo). Este importante parámetro sirve para conocer la fracción de la sustancia química administrada que llega a la vena porta y, posteriormente, al hígado.

Acumulación: (bioacumulación) aumento del contenido de una sustancia en los tejidos a lo largo del tiempo (generalmente en el tejido adiposo y por administración continuada); si la velocidad a la que penetra una sustancia en el organismo es superior a la velocidad con que se elimina, la sustancia se acumula en el organismo y puede alcanzar concentraciones tóxicas.

ADME: siglas de "Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción".

AUC: (área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo): área bajo la curva que resulta de representar la concentración plasmática de una sustancia problema en función del tiempo. Representa la cantidad total de la sustancia problema que ha absorbido el organismo en un período establecido. En condiciones de linealidad, el AUC (desde el tiempo cero al infinito) es proporcional a la cantidad total de la sustancia problema que absorbe el organismo, independientemente de cuál sea la velocidad de absorción.

Autorradiografía: (autorradiografía de cuerpo entero): empleada para determinar cualitativa o cuantitativamente la localización de una sustancia química radiactiva en los tejidos, esta técnica se vale de las imágenes de rayos X o, más recientemente, de la fluoroscopia digital para visualizar moléculas (o fragmentos de moléculas) marcadas radiactivamente registrando la radiación emitida en la víscera o tejido que se desea estudiar. Comparada con la disección de órganos, la autorradiografía cuantitativa de cuerpo entero puede aportar ciertas ventajas para valorar la distribución de la sustancia problema, la recuperación total y la resolución del material radiactivo en los tejidos. Otra ventaja importante es que se puede aplicar a un modelo animal pigmentado para valorar la posible asociación de la sustancia problema con la melanina, capaz de unirse a ciertas moléculas. No obstante, y aunque puede facilitar una interesante visión global de los sitios de unión de alta capacidad y baja afinidad, esta técnica tendría limitaciones para reconocer regiones diana específicas, como los sitios de unión a receptores, para cuya detección se precisa una resolución relativamente alta y una elevada sensibilidad. Cuando se usa la autorradiografía deben realizarse, en un grupo aparte o en un estudio separado del ensayo de distribución en los tejidos, investigaciones para determinar el balance de masas del compuesto administrado, en las que todas las excretas (con la posible inclusión del aire espirado) y los restos del cuerpo de los animales sean homogeneizados y analizados con contador de centelleo líquido.

Autorradiografía microscópica de receptores: (o microautorradiografía): técnica que puede servir para comprobar la interacción de una sustancia xenobiótica con poblaciones celulares o sitios específicos de los tejidos, como en el caso de las investigaciones de la unión a los receptores o de los mecanismos de acción específicos, donde se precisan una resolución y una sensibilidad elevadas que no se consiguen con otras técnicas como la autorradiografía de cuerpo entero.

Balance de masas: expresa la cantidad de sustancia que entra y sale del sistema.

Balance de materia: véase "balance de masas".

Bioacumulación: véase "Acumulación".

Biodisponibilidad: fracción de la dosis administrada que pasa a la circulación sistémica o está disponible en los tejidos para ejercer su actividad fisiológica. Frecuentemente, la biodisponibilidad de una sustancia se refiere al compuesto parental, pero también puede referirse a su metabolito. Tiene en cuenta solamente una forma química. *Nota bene:* no confundir biodisponibilidad con absorción. Así, la diferencia entre la absorción oral (contenido de la sustancia en la mucosa intestinal y en la circulación portal) y la biodisponibilidad (contenido en la sangre circulante y en los tejidos) puede deberse, entre otros factores, a: 1) la degradación química efectuada por digestión en la mucosa intestinal, 2) la circulación enterohepática que devuelve parte de la sustancia a la luz intestinal, o 3) el metabolismo hepático de primer paso (10). La biodisponibilidad del componente tóxico (compuesto parental o metabolito) es un parámetro esencial en la evaluación del riesgo humano (extrapolación entre dosis altas y bajas, o entre distintas vías), ya que permite obtener un valor interno partiendo de los valores de NOAEL o BMD (dosis administrada), que son externos. Para evaluar los efectos hepáticos que siguen a una administración oral, basta con conocer la absorción oral. En cambio, cuando se estudian los efectos en lugares distintos de la vía de entrada, la biodisponibilidad es en general un parámetro más fiable que la absorción para evaluar el riesgo.

Biopersistencia: véase "persistencia".

Biotransformación: conversión química (generalmente enzimática) de la sustancia de interés en un producto diferente, que tiene lugar en el organismo. Es sinónimo de "metabolismo".

C_{máx}: concentración máxima (pico) en sangre (plasma o suero), o bien excreción máxima (pico) en orina y heces, que se produce después de la administración.

Coeficiente de reparto: también llamado coeficiente de distribución, es una medida de la solubilidad diferencial de una sustancia en dos solventes.

Compartimento: parte (o unidad) estructural o bioquímica de un organismo, tejido o célula que puede diferenciarse del resto.

Concentración máxima (pico) en sangre (plasma o suero): máxima concentración (o pico) que se alcanza en la sangre (plasma o suero) después de administrar una sustancia (véase también " $C_{\text{máx}}$ ").

Concentraciones sanguíneas (plasmáticas) en estado estacionario: estado de no equilibrio de un sistema abierto, en el que todas las fuerzas que actúan sobre él están exactamente contrarrestadas por fuerzas opuestas de manera tal que todos sus componentes se hallan en concentración estacionaria pese a que fluye materia a través del sistema.

Correlación o "read across": método por el cual se toman los datos conocidos de una variable en respuesta a una o varias sustancias para predecir el comportamiento de esa variable en respuesta a la sustancia problema.

Distribución: dispersión de una sustancia problema y de sus metabolitos por todo el organismo.

Distribución en los tejidos: movimiento reversible de una sustancia problema por los distintos tejidos orgánicos. La distribución en los tejidos se puede estudiar mediante disección de órganos, homogeneización, combustión y recuento de centelleo líquido, o mediante autoradiografía cualitativa y cuantitativa del cuerpo entero. El primer método resulta válido para obtener la concentración y el porcentaje de recuperación en los tejidos y en el resto del cuerpo de un mismo animal, pero puede no alcanzar resolución adecuada en todos los tejidos y puede arrojar una recuperación total inferior a de lo deseable (< 90 %). Consultense más arriba las definiciones del segundo método.

Enzimas/isoenzimas: proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas. Las isoenzimas son enzimas que catalizan reacciones bioquímicas semejantes, pero que presentan secuencias de aminoácidos diferentes.

Excreción biliar: excreción que tiene lugar a través de los conductos biliares.

Excreción: conjunto de procesos por los que una sustancia administrada y/o sus metabolitos son eliminados del organismo.

Exógeno: generado o introducido desde fuera del organismo o sistema orgánico.

Extrapolación: método por el que se infiere uno o más valores desconocidos a partir de otros conocidos u observados.

Inducción enzimática: síntesis enzimática que se produce como respuesta a un estímulo ambiental o una molécula inductora.

Linealidad/cinética lineal: un proceso tiene una cinética lineal cuando todos los intercambios entre compartimentos se producen a una velocidad proporcional a la concentración o cantidad presente; es una cinética de primer orden. En consecuencia, los volúmenes de eliminación y distribución son constantes, al igual que la semivida. Las concentraciones alcanzadas son proporcionales al nivel de dosis (exposición) y la acumulación es más fácil de predecir. La existencia o no de linealidad se puede determinar comparando los parámetros oportunos, como el AUC, después de administrar dosis diferentes o después de exposiciones únicas y repetidas. La falta de dependencia de la dosis puede indicar saturación de las enzimas que intervienen en el metabolismo del compuesto; un aumento del AUC después de la exposición continuada en comparación con la exposición única puede indicar inhibición del metabolismo; y una disminución del AUC puede indicar, a su vez, inducción del metabolismo [véase también (11)].

Mecanismo (modo) de toxicidad/mecanismo (modo) de acción: por mecanismo de acción se entienden las interacciones bioquímicas específicas por las que una sustancia química produce su efecto. Por modo de acción se entienden las principales rutas o vías más generales por las que una sustancia llega a producir su efecto (o toxicidad).

Metabolismo: es sinónimo de "biotransformación".

Metabolitos: productos del metabolismo o de los procesos metabólicos.

Modelización de sistemas (toxicocinética basado en la fisiología, basada en la farmacocinética, farmacocinética basada en la fisiología, basada en la biología, etc.): modelo abstracto que aplica el lenguaje matemático para describir el comportamiento de un sistema.

Parámetros enzimáticos: K_m (constante de Michaelis) y $V_{\text{máx}}$ (velocidad máxima).

Persistencia (biopersistencia): presencia prolongada de una sustancia en un sistema biológico debido a que resiste la degradación/eliminación.

Saturación: estado en virtud del cual uno o varios procesos cinéticos (absorción, metabolismo o eliminación) se encuentran en su límite máximo, es decir, saturados.

Semivida ($t_{1/2}$): tiempo necesario para que la concentración de una sustancia se reduzca a la mitad en un compartimento dado. Normalmente se refiere a la concentración plasmática o a la cantidad de sustancia en todo el organismo.

Sensibilidad: capacidad de un método o instrumento para reflejar pequeñas diferencias en el grado de respuesta de una variable de interés.

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

Tejido diana: tejido en el que se manifiesta el efecto adverso principal de un agente tóxico.

$T_{\text{máx}}$: tiempo que se tarda en alcanzar la $C_{\text{máx}}$.

Toxicocinética (farmacocinética): estudio de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de las sustancias a lo largo del tiempo.

Validación de los modelos: proceso por el cual se evalúa la adecuación de un modelo para describir de manera coherente los datos toxicocinéticos disponibles. Los modelos se pueden evaluar mediante comparación visual y estadística de las predicciones del modelo con los valores experimentales obtenidos para una variable independiente común (por ejemplo, el tiempo). Se ha de justificar la magnitud de la evaluación en relación con el uso que se pretende dar al modelo.

Velocidad (o tasa) de aclaramiento: es una medida cuantitativa de la cantidad de una sustancia problema que se elimina de la sangre, el plasma o un determinado tejido por unidad de tiempo.

Vía de administración (oral, i.v., cutánea, inhalatoria, etc.): medio por el cual se administran las sustancias químicas al organismo (por ejemplo, por vía oral con los alimentos o mediante sonda gástrica, por inyección intravenosa, por vía cutánea a través de la piel, por inhalación con el aire aspirado, etc.).

Vías de destoxicificación: conjunto de procesos que llevan a la eliminación de las sustancias tóxicas del organismo, ya sea por degradación metabólica o por excreción.»

8) Se añade el capítulo B.52:

«B.52. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 436 de la OCDE (2009). Las primeras TG 403 de toxicidad aguda por inhalación se adoptaron en 1981 y desde entonces han sido revisadas [véase el capítulo B.2 de este anexo (1)]. Se consideró apropiado desarrollar un método de clases de toxicidad aguda por inhalación [Acute Toxic Class o ATC, (2) (3) (4)] después de adoptar el método de las clases de toxicidad aguda por vía oral (capítulo B.1 ter de este anexo) (5). Una evaluación retrospectiva de los resultados del método de las clases de toxicidad aguda por inhalación reveló que es adecuado para los fines de clasificación y etiquetado (6). El método de las clases de toxicidad aguda por inhalación permite aplicar una progresión serial de concentraciones previamente definidas para obtener una escala de toxicidad de la sustancia problema. El criterio de valoración principal es la letalidad, pero los animales moribundos o que presenten signos de dolor, angustia o sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva para minimizar su sufrimiento. Se recomienda consultar el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (7).
2. Se ofrece una guía para la realización e interpretación de estudios según este método de ensayo en el documento de orientación nº 39 sobre los ensayos de toxicidad por inhalación aguda (GD 39) (8).
3. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan en el apéndice 1 y en el documento GD 39 (8).
4. El método de ensayo proporciona información acerca de los factores de riesgo y facilita la ordenación y clasificación de la sustancia problema de conformidad con el Reglamento (CE) nº 1272/2008 en relación con la clasificación de las sustancias químicas que provocan toxicidad aguda (9). Cuando sea preciso calcular valores puntuales de CL50 o analizar la relación concentración-respuesta, el método de ensayo recomendable es el que se describe en el capítulo B.2 del presente anexo (1). Se ofrecen más orientaciones sobre la selección del método de ensayo en el documento de orientación (GD) nº 39 (8). El presente método de ensayo no ha sido concebido específicamente para el análisis de productos especializados, como materiales fibrosos o isométricos escasamente solubles o nanoproductos manufacturados.

CONSIDERACIONES INICIALES

5. Antes de considerar la aplicación de este método de ensayo y con el fin de minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de análisis deberá tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia problema, sin olvidar los estudios existentes cuyos datos pudieran desaconsejar la realización de nuevas investigaciones. En la selección de la especie, cepa, sexo y modo de exposición más apropiados resulta útil toda información referente a: identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema; resultados de anteriores ensayos de toxicidad *in vivo* o *in vitro*; uso(s) previsto(s) y posible exposición humana; datos de (Q)SAR previos y datos toxicológicos acerca de sustancias estructuralmente afines. No deberán investigarse con este método de ensayo concentraciones que previsiblemente provoquen un dolor o sufrimiento intensos debido a efectos corrosivos⁽¹⁾ o irritantes graves [véase el documento GD 39 (8)].

PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. El ensayo se basa en un procedimiento secuencial, en el que se obtiene suficiente información sobre la toxicidad aguda por inhalación de la sustancia problema durante un período de exposición de 4 horas, para permitir su clasificación. Pueden aplicarse otros tiempos de exposición con fines normativos específicos. Cada una de las fases de concentración definidas se investiga en 3 animales de cada sexo. Dependiendo del número de animales que se encuentren muertos o moribundos, pueden bastar 2 fases de concentración para evaluar la toxicidad aguda de la sustancia problema. Si hay indicios de que uno de los sexos es más sensible que el otro, la investigación debe proseguir únicamente con el sexo más sensible. El resultado de la fase preliminar determina cuál será la fase siguiente, de manera que:
 - a) no se requieran más ensayos,
 - b) se investiguen tres animales de cada sexo, o
 - c) se investiguen solo 6 animales del sexo más sensible; es decir, el cálculo del límite inferior de la clase tóxica debe basarse en 6 animales por grupo de concentración experimental, independientemente del sexo.
7. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o muestren signos de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva y en la interpretación de los resultados serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (7) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Selección de la especie animal

8. Hay que usar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie recomendada es la rata y, en caso de usar otra especie, se justificará debidamente.

Preparación de los animales

9. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la exposición, los animales serán adultos jóvenes de 8 a 12 meses de edad y su peso corporal no se desviará en más del ± 20 % del peso medio de su sexo calculado en animales previamente expuestos de la misma edad. Los animales se seleccionan al azar y se marcan para permitir su identificación individual. Se mantiene a los animales en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio. Deberán también aclimatarse al equipo del ensayo durante un breve período preliminar, para así reducir el estrés provocado por la introducción en un entorno nuevo.

Zootecnia

10. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por grupos de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario aclimatizar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales tensiones físicas, térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre por el pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la

(1) La evaluación de la corrosividad puede basarse en la opinión de expertos con información sobre: experiencia en animales y humanos, datos (*in vitro*) disponibles [capítulos B.40 (10) y B.40 bis (11) de este anexo y TG 435 de la OCDE (12)], valores de pH, información acerca de sustancias afines o cualesquiera otros datos pertinentes.

exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Cámaras de inhalación

11. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo por la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzar mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el documento GD 39 (8) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y de solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Administración de las concentraciones

12. Se recomienda un período de exposición prefijado de cuatro horas, sin contar el tiempo de equilibrado. El período puede variar dependiendo de las necesidades concretas, pero se justificarán los motivos en el informe del estudio [véase el documento GD 39 (8)]. Los animales expuestos en cámaras de cuerpo entero se enjaularán de manera individual para evitar la ingestión de la sustancia problema debido a las conductas de limpieza de los compañeros de jaula. Se suprimirá la alimentación durante el período de exposición. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.
13. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. Las condiciones físicas de la investigación dependerán de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de la concentración seleccionada y/o de la forma física más probable que adoptará dicha sustancia durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas.

Distribución granulométrica

14. Se controlará el tamaño de partícula en todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 4 µm, con una desviación típica geométrica (og) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (8) (13) (14). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Por ejemplo, los humos metálicos pueden tener un diámetro de partícula menor, mientras que las partículas con carga, las fibras y las sustancias higroscópicas (que aumentan de tamaño en el medio húmedo de las vías respiratorias) pueden sobrepasar este límite de referencia.

Preparación de la sustancia problema en un vehículo

15. Se puede recurrir a un vehículo para crear una concentración y un tamaño de partícula adecuados de la sustancia problema en la atmósfera. Por regla general se dará preferencia al agua. El material particulado se puede someter a tratamientos mecánicos para obtener la distribución granulométrica deseada, pero procurando no descomponer ni alterar la sustancia problema. Cuando se considere que los procesos mecánicos pueden haber alterado la composición de la sustancia problema (por ejemplo, las temperaturas extremas de una fricción excesiva), esta se verificará analíticamente. Se pondrá especial atención para no contaminar la sustancia problema. No es necesario analizar compuestos granulados no friables que han sido intencionadamente formulados como no inhalables. Se recurrirá a una prueba de desgaste para demostrar que no se generan partículas respirables durante la manipulación del material granulado. Si en la prueba de desgaste se generan partículas respirables, habrá que efectuar un ensayo de toxicidad por inhalación.

Animales de control

16. No es necesario emplear un grupo de control negativo (con aire) en paralelo. Si se usa un vehículo distinto del agua para generar la atmósfera experimental, solo será necesario recurrir a un grupo de control del vehículo cuando no se disponga de datos anteriores de toxicidad por inhalación. Si un ensayo de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada; por lo tanto, no se precisa un control del vehículo.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

Caudal de aire de la cámara

17. El caudal de aire de la cámara se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continua y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión de la concentración (o estabilidad) atmosférica del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto

de controlar todos los parámetros dinámicos de interés en la generación de un escenario atmosférico. Se pondrá especial atención para evitar la reinspiración en las cámaras de solo por la nariz en aquellos casos en los que el caudal de aire a través del sistema de exposición sea insuficiente para crear un flujo continuo del medio atmosférico de ensayo. Se han descrito metodologías capaces de demostrar que no tiene lugar la reinspiración en las condiciones operativas establecidas (8) (15). La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no están consiguiendo estos valores de referencia, habrá que determinar las concentraciones de ambos gases.

Temperatura y humedad relativa de la cámara

18. La temperatura de la cámara se mantendrá en 22 ± 3 °C. La humedad relativa en la zona de respiración de los animales, cuando se trata de exposiciones de solo por la nariz y de cuerpo entero, se supervisará y registrará al menos tres veces en operaciones de hasta 4 horas, y cada hora en operaciones más cortas. La humedad relativa debe mantenerse idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia con el método de ensayo).

Sustancia problema: concentración nominal

19. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en la generación de la atmósfera.

Sustancia problema: concentración real

20. La concentración real es la concentración de sustancia problema presente en la zona de respiración de los animales en una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior valoración analítica) o bien con métodos inespecíficos como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia de ensayo. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material aerotransportado es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, en estado aerotransportado) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trate de productos en forma de aerosol capaces de evaporar o sublimar, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases. En el informe del estudio se harán constar las concentraciones diana, nominales y reales, pero en los análisis estadísticos destinados a calcular los valores de concentración letal se emplean solo las concentraciones reales.
21. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema, que se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia problema consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa del pico, peso molecular determinado mediante espectroscopía de masas o cromatografía de gases y otras determinaciones. Si bien la identidad de la muestra de ensayo no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).
22. La atmósfera de exposición se mantendrá constante en la medida de lo posible y bajo supervisión continua y/o intermitente, dependiendo del método analítico. Si la técnica de muestreo es intermitente, habrá que tomar muestras atmosféricas de la cámara por lo menos dos veces en un ensayo de cuatro horas. De no ser esto posible por darse concentraciones bajas o un caudal de aire limitado, se podrá tomar una muestra en todo el período de exposición. Si se producen fluctuaciones importantes de una muestra a otra, para analizar las siguientes concentraciones se tomarán cuatro muestras por exposición. Las concentraciones individuales medidas en la cámara no deben desviarse de la concentración media en ± 10 % cuando se trata de gases y vapores, y en ± 20 % en el caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y registrará el tiempo de equilibrado de la cámara (t_{95}). La duración de cualquier exposición abarca el tiempo que tarda en generarse la sustancia problema, lo que incluye el tiempo necesario para alcanzar t_{95} . Se ofrecen indicaciones para el cálculo de t_{95} en el documento de orientación nº 39 (8).
23. Cuando se manejan mezclas muy complejas de gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos fabricados con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación, de modo que se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente la sustancia activa principal de la mezcla, para cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla total y no solo de la sustancia indicadora o del componente activo (analito). Se ofrece más información sobre las concentraciones reales en el documento de orientación nº 39 (8).

Sustancia problema: distribución granulométrica

24. La distribución granulométrica en los aerosoles se determinará al menos dos veces por cada período de exposición de 4 horas, empleando un impactador de cascada o un aparato alternativo como un medidor del tamaño aerodinámico de partícula. Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de purga, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis granulométrico tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración en masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase el documento GD 39 (8)]. Si es posible demostrar su equivalencia en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir la exposición. Se controlará el tamaño de partícula en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases (véase el punto 14).

PROCEDIMIENTO**Ensayo principal**

25. En cada fase se estudian tres animales de cada sexo, o bien seis animales del sexo más sensible. Cuando se exponen con la técnica de solo la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. La concentración que se usará en la fase inicial se selecciona de entre una a cuatro concentraciones predefinidas, y debe ser aquella que provoque más probablemente toxicidad en algunos de los animales tratados. Los esquemas de ensayo de gases, vapores y aerosoles (apéndices 2 a 4) se articulan en torno a los valores de corte de las categorías 1-4 del Reglamento CLP (9) para gases (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 horas; apéndice 2), para vapores (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 horas; apéndice 3) y para aerosoles (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 horas; apéndice 4). La categoría 5, que no se contempla en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9), corresponde a concentraciones por encima de las respectivas concentraciones límite. A cada concentración inicial se le aplica el correspondiente esquema de ensayo. En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas hasta establecer una categoría.
26. El intervalo de tiempo entre los grupos de exposición se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. La exposición de los animales al siguiente nivel de concentración se retrasará hasta tener una seguridad razonable de la supervivencia de los animales previamente estudiados. Se recomienda un período de tres o cuatro días entre la administración de cada nivel de dosis para poder observar la toxicidad retardada. Este intervalo puede ajustarse según convenga, por ejemplo en caso de respuestas no concluyentes.

Ensayo límite

27. El ensayo límite se practica cuando se sabe o supone que la sustancia problema es prácticamente atóxica, es decir, que induce una respuesta tóxica solo cuando supera la concentración límite normativa. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre sustancias o mezclas afines, teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se disponga de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en las que se prevea que esta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal [se ofrecen más indicaciones en el documento de orientación (GD) nº 39 (8)].
28. Según el procedimiento habitual se exponen tres animales de cada sexo, o seis animales del sexo más sensible, a concentraciones de 20 000 ppm de gases, 20 mg/l de vapores o 5 mg/l de polvos/nieblas, respectivamente y siempre que se puedan alcanzar, lo que constituye el ensayo límite de este método. Cuando se analicen aerosoles, el objetivo principal será obtener un tamaño de partícula respirable (es decir, un MMAD de 1-4 µm). El estudio de aerosoles a concentraciones mayores de 2 mg/l solo se emprenderá si se puede obtener un tamaño de partícula respirable [véase el documento GD 39 (8)]. De conformidad con el SGA (16), por razones de bienestar animal se desaconseja investigar más allá de las concentraciones límite. La realización de pruebas en la categoría 5 (16) del SGA, que no está recogida en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9), solo se contemplará cuando haya muchas probabilidades de que sus resultados vayan a incidir directamente en la protección de la salud humana, lo cual deberá justificarse en el informe del estudio. Cuando se trate de sustancias problema potencialmente explosivas, se procurará evitar las condiciones favorables a una explosión. A fin de evitar el uso innecesario de animales, se hará una operación de prueba sin animales antes del ensayo límite, para confirmar que se crean en la cámara las condiciones adecuadas para dicho ensayo límite.

CONTEXTO

29. Los animales se someterán a observación clínica frecuente durante el período de exposición. Las observaciones clínicas se repetirán al menos dos veces el día de la exposición, o más frecuentemente si lo indica la respuesta de los animales al tratamiento, y en lo sucesivo al menos una vez al día durante un período total de 14 días. La duración del período de observación no es fija, antes bien deberá determinarse en función de la naturaleza y el tiempo de aparición de los signos clínicos y de la longitud del período de recuperación. Es importante conocer el momento en el que aparecen y desaparecen los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Por razones de bienestar animal, los animales moribundos o que den muestras de dolor o signos de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva. En el momento

de explorar los signos clínicos de toxicidad, se procurará que el mal aspecto inicial y los trastornos respiratorios transitorios, derivados del procedimiento de exposición, no se confundan con efectos relacionados con el tratamiento. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el documento de orientación sobre criterios de tratamiento compasivo [Humane Endpoints Guidance Document (7)]. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

30. Las observaciones en de la jaula deberían incluir los cambios en la piel, pelo, ojos y membranas mucosas, y también los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Cuando sea posible se diferenciarán los efectos locales de los sistémicos. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipo/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento.

Peso corporal

31. Los pesos corporales individuales se registrarán una vez durante el período de aclimatación, en el día previo a la exposición (día 0), y al menos en los días 1, 3 y 7 (y, en lo sucesivo, semanalmente) y en el momento de la muerte o la eutanasia si se produce después del día 1. Se acepta que el peso corporal es un indicador crítico de la toxicidad, por lo que deberán vigilarse estrechamente los animales que muestren una reducción progresiva de peso $\geq 20\%$ en comparación con los valores preliminares. Los animales supervivientes se pesan y se sacrifican de forma compasiva al final del período de post-exposición.

Anatomía patológica

32. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminan del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a autopsia macroscópica. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de comprobar la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a temperaturas suficientemente bajas para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatomiopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención en las alteraciones de las vías respiratorias.
33. Se podrán contemplar otras exploraciones incluidas de antemano en el diseño para ampliar el valor interpretativo del estudio, como la medida del peso pulmonar de las ratas que sobrevivan o el examen microscópico de las vías respiratorias para aportar pruebas de irritación. La exploración de órganos puede extenderse a aquellos que muestran signos de anatomiopatología macroscópica en los animales que sobreviven 24 o más horas y a los órganos que se saben o suponen afectados. El examen microscópico de la totalidad de las vías respiratorias puede proporcionar información útil en el caso de sustancias problema que son reactivas con el agua, como las de naturaleza ácida o higroscópica.

DATOS E INFORME

Datos

34. Se documentarán por separado los datos de peso corporal y los resultados de la autopsia de cada animal. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y sin reversibilidad, y los resultados de la autopsia.

Informes de los ensayos

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

Animales de experimentación y zootecnia

- Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.
- Especie o variedad empleada y justificación del uso de una especie distinta de la rata.
- Número, edad y sexo de los animales.
- Método de asignación al azar.
- Pormenores de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo/origen de la alimentación y el origen del agua).
- Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

Sustancia problema:

- Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).
- Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

Vehículo:

- Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).
- Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

Cámara de inhalación:

- Descripción de la cámara de inhalación, incluidos las dimensiones y el volumen.
- Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.
- Equipo empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.
- Fuente de aire, tratamiento del aire suministrado/extruido y sistema de acondicionamiento.
- Métodos de calibración del equipo para garantizar una atmósfera experimental homogénea.
- Diferencia de presión (positiva o negativa).
- Puertos de exposición por cámara (de solo por la nariz); ubicación de los animales en el sistema (de cuerpo entero).
- Homogeneidad/estabilidad temporal de la atmósfera experimental.
- Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.
- Caudales de aire, caudal del aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).
- Descripción del equipo empleado para medir el oxígeno y el dióxido de carbono, si procede.
- Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (t_{95}) en la cámara de inhalación.
- Número de variaciones de volumen por hora.
- Dispositivos de dosificación (si procede).

Datos relativos a la exposición:

- Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.
- Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).
- Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que dan lugar a formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada una de ellas por separado.
- Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (mg/l, mg/m³, etc.); se podrán indicar además las unidades de volumen (ppm, ppmm) entre paréntesis.
- Distribución del tamaño de partícula, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica (og), incluidos los correspondientes métodos de cálculo; se documentarán los análisis granulométricos individuales.

Condiciones del ensayo:

- Descripción pormenorizada de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de las materias sólidas o preparar soluciones de la sustancia problema; cuando exista la posibilidad de que los procesos mecánicos hayan alterado la composición de la sustancia problema, se incluirán los resultados de los análisis realizados para verificar dicha composición.
- Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.
- Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficiencia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).
- Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

Resultados:

- Tabulación de los valores de temperatura de la cámara, humedad y caudal de aire.
- Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.
- Tabulación de los datos de tamaño de partícula, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, distribución granulométrica y cálculos de MMAD y σ_g .
- Tabulación de las respuestas y niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad y duración de los efectos),
- Pesos corporales de cada animal registrados en el estudio; fecha y hora de la muerte si se produce antes de la eutanasia programada; cronología de la aparición de los signos de toxicidad e indicación de si estos son reversibles en cada animal.
- Resultados de la autopsia y observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.
- Categoría de la clasificación CLP y valor de corte de la CL₅₀.

Evaluación e interpretación de los resultados:

- Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para cumplir los criterios del presente método de ensayo, esto es, la concentración límite o el tamaño de partícula.
- Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplen los criterios relativos al tamaño de partícula.
- En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.
- Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.
- Se facilitará una explicación de por qué ha sido preciso sacrificar de forma compasiva los animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane End-points) (7).

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Capítulo B.2 del presente anexo. Toxicidad aguda por inhalación.
- (2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243-254.
- (3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537-549.

- (4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. ALTEX 1: 129-134.
- (5) Capítulo B.1 *ter* del presente anexo. Toxicidad oral aguda. Método de las clases de toxicidad aguda.
- (6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/ENV/testguidelines>]
- (7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available at: [<http://www.oecd.org/ENV/testguidelines>]
- (8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/ENV/testguidelines>]
- (9) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, y se modifica el reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).
- (10) Capítulo B.40 del presente anexo. Corrosión cutánea *in vitro*: ensayo de resistencia eléctrica transcutánea (RET).
- (11) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo. Corrosión cutánea *in vitro*: ensayo con modelo de piel humana.
- (12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/ENV/testguidelines>]
- (13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
- (14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.
- (15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167
- (16) Naciones Unidas (2007), Sistema globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), ST/SG/AC.10/30, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra. Disponible en la dirección: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/rev02/02files_s.html]

Apéndice 1

DEFINICIÓN

Sustancia problema: cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

*Apéndice 2***Procedimiento de ensayo según la concentración inicial en caso de gases (ppm/4 horas)**Observaciones generales ⁽¹⁾

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

Apéndice 2a: concentración inicial de 100 ppm

Apéndice 2b: concentración inicial de 500 ppm

Apéndice 2c: concentración inicial de 2 500 ppm

Apéndice 2d: concentración inicial de 20 000 ppm

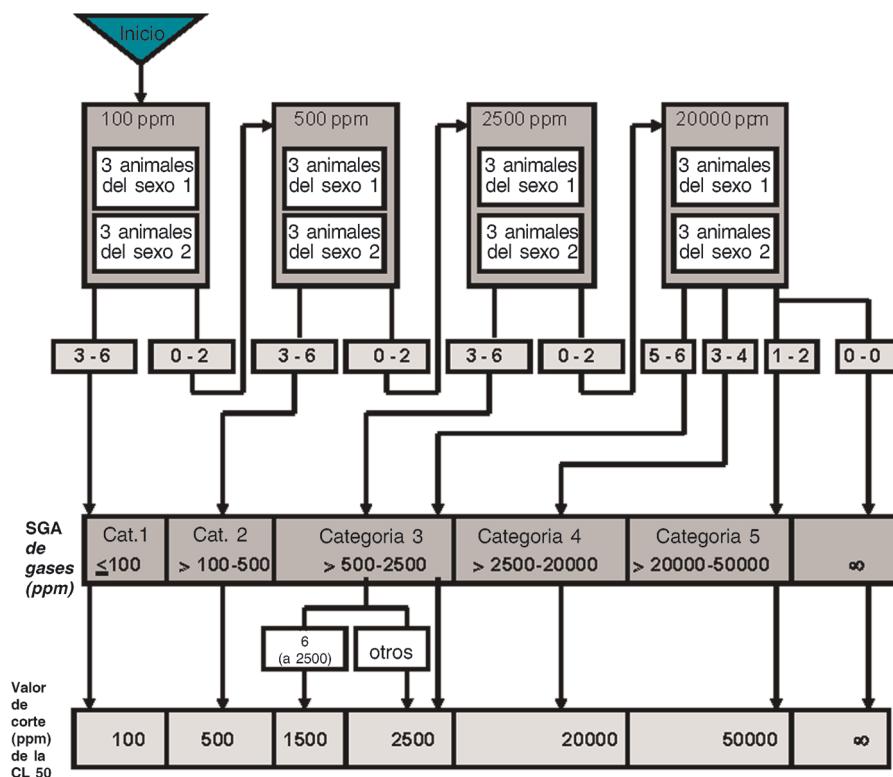
En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

⁽¹⁾ En los cuadros siguientes se hace referencia al SGA (sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos). El equivalente de la UE es el Reglamento (CE) n° 1272/2008. En el caso de la toxicidad aguda por inhalación, el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (9) no contempla la categoría 5.

Apéndice 2a

Toxicidad aguda por inhalación:

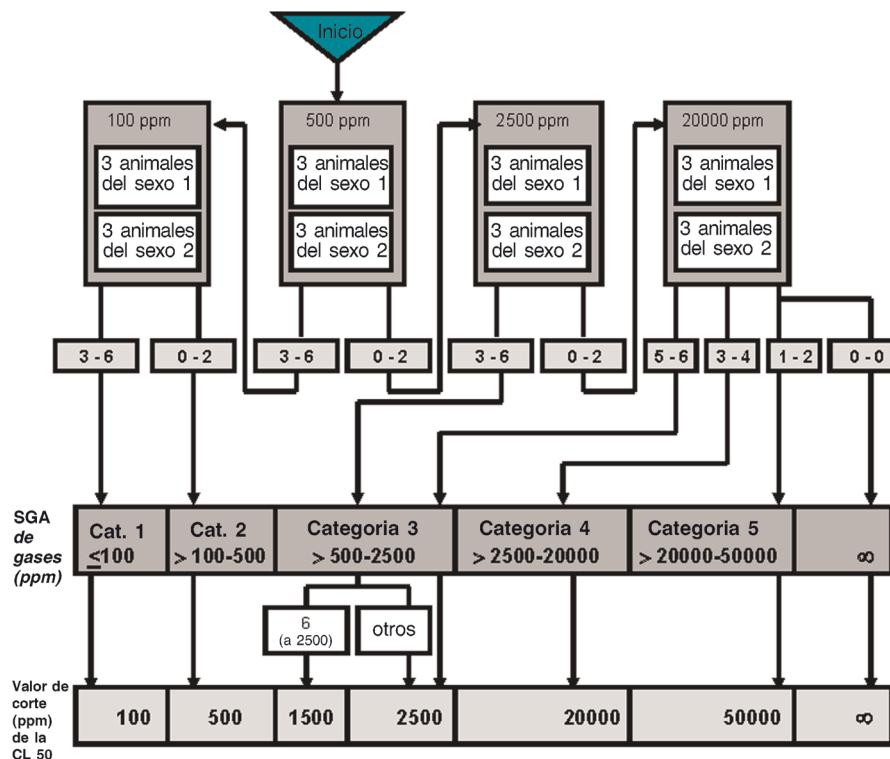
Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicial de 100 ppm/4 horas



- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞ : Sin clasificar
- Estudios con = 20 000 ppm/4 horas: véase el documento de orientación nº 39(8)

Apéndice 2b

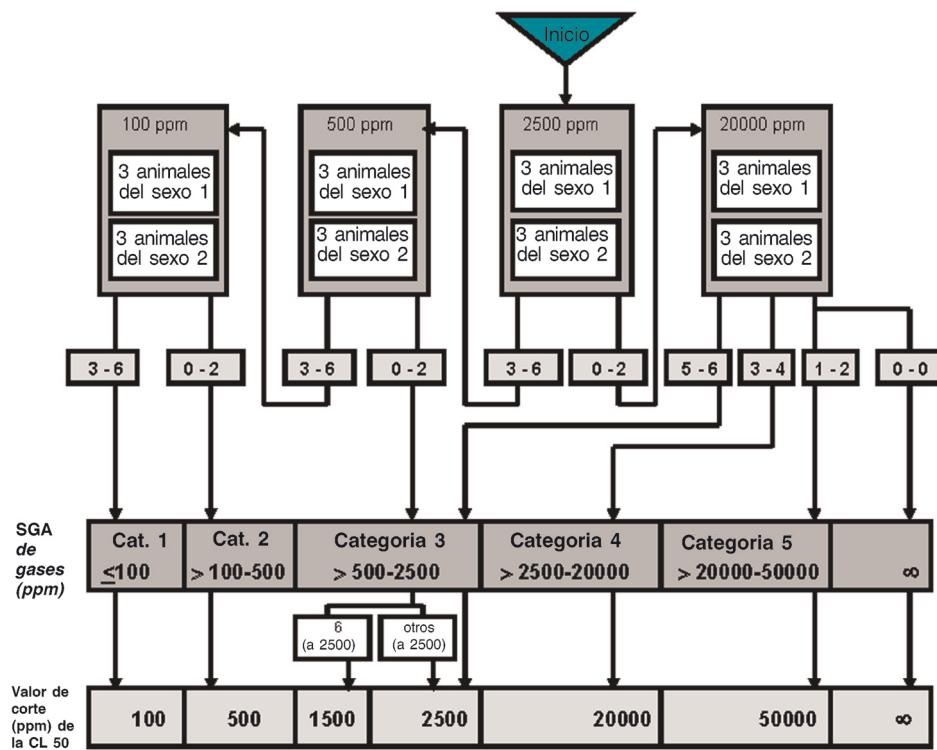
Toxicidad aguda por inhalación:
Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicial de 500 ppm/4 horas



- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞: Sin clasificar
- Estudios con ≥ 20 000 ppm/4 horas: véase el documento de orientación nº 39(8)

Apéndice 2c

Toxicidad aguda por inhalación:
Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicial de 2 500 ppm/4 horas

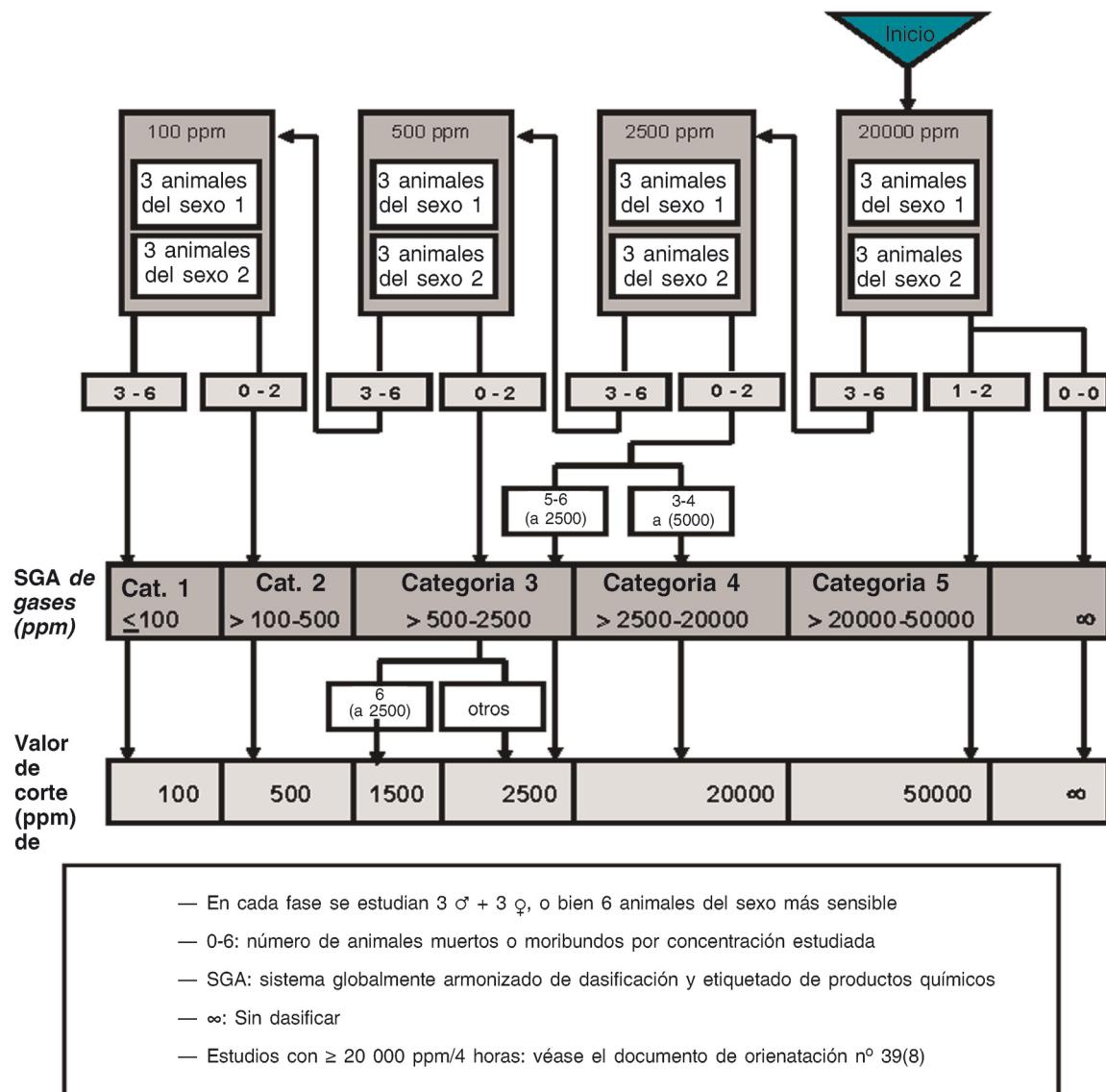


- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞ : Sin clasificar
- Estudios con = 20 000 ppm/4 horas: véase el documento de orientación nº 39(8)

Apéndice 2d

Toxicidad aguda por inhalación:

Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicial de 20 000 ppm/4 horas



Apéndice 3

Procedimiento de ensayo según la concentración inicial en caso de vapores (mg/l/4 horas)

Observaciones generales ⁽¹⁾

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

Apéndice 3a: concentración inicial de 0,5 mg/l

Apéndice 3b: concentración inicial de 2,0 mg/l

Apéndice 3c: concentración inicial de 10 mg/l

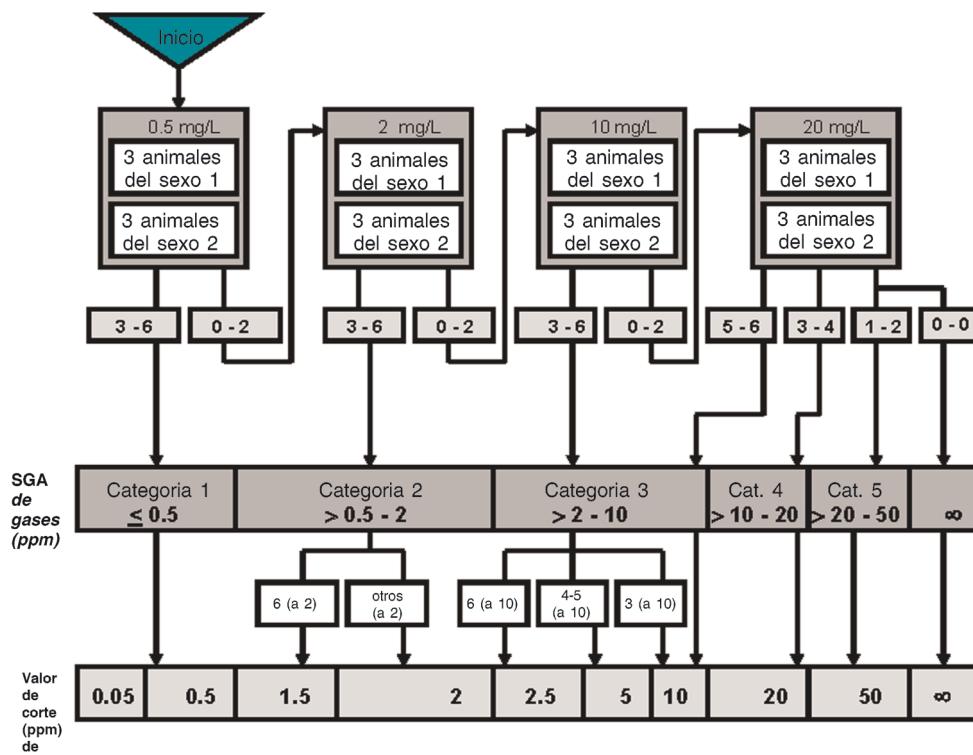
Apéndice 3d: concentración inicial de 20 mg/l

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

⁽¹⁾ En los cuadros siguientes se hace referencia al SGA (sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos). El equivalente de la UE es el Reglamento (CE) n° 1272/2008. En el caso de la toxicidad aguda por inhalación, el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (9) no contempla la categoría 5.

Apéndice 3a

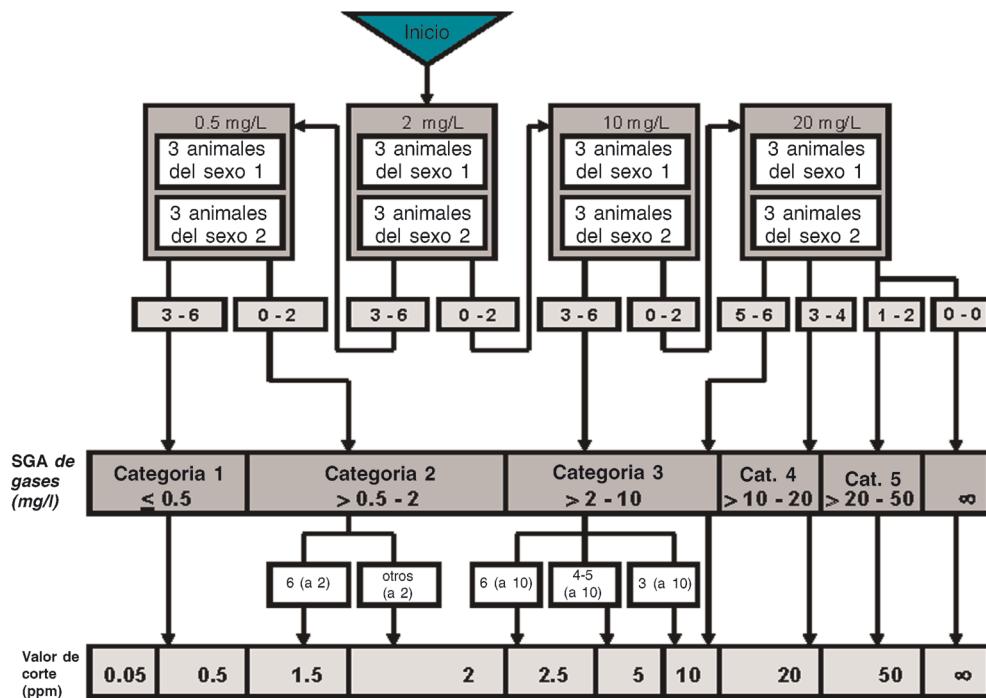
Toxicidad aguda por inhalación:
Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 0,5 mg/l/4 horas



- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞: Sin clasificar
- Estudios con 50 mg/l/4 horas: véase el documento de orientación nº 39(8)

Apéndice 3b

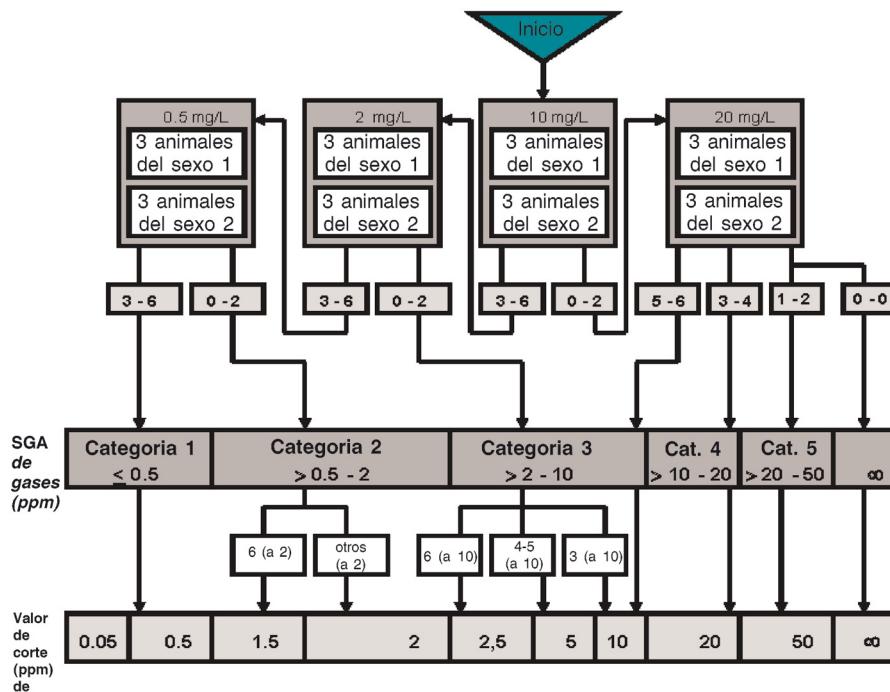
Toxicidad aguda por inhalación:
Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicial de 2 mg/l/4 horas



- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞ : Sin clasificar
- Estudios con 50 mg/l/4 horas: véase el documento de orientación nº 39(8)

Apéndice 3c

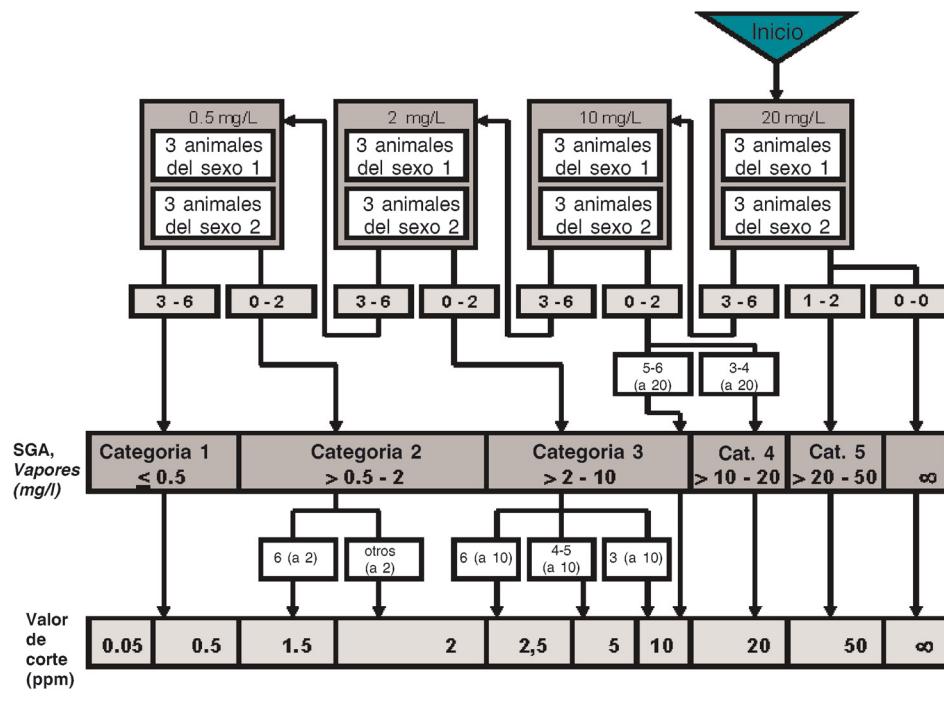
Toxicidad aguda por inhalación:
Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 10 mg/l/4 horas



- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞: Sin clasificar
- Estudios con 50 mg/l/4 horas: véase el documento de orientación nº 39(8)

Apéndice 3d

Toxicidad aguda por inhalación:
Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 20 mg/l/4 horas



- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞: sin clasificar
- Estudios con 50 mg/l/4 horas: véase el documento de orientación nº 39(8)

*Apéndice 4***Procedimiento de ensayo según la concentración inicial en caso de aerosoles (mg/l/4 horas)**Observaciones generales ⁽¹⁾

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

Apéndice 4a: concentración inicial de 0,05 mg/l

Apéndice 4b: concentración inicial de 0,5 mg/l

Apéndice 4c: concentración inicial de 1 mg/l

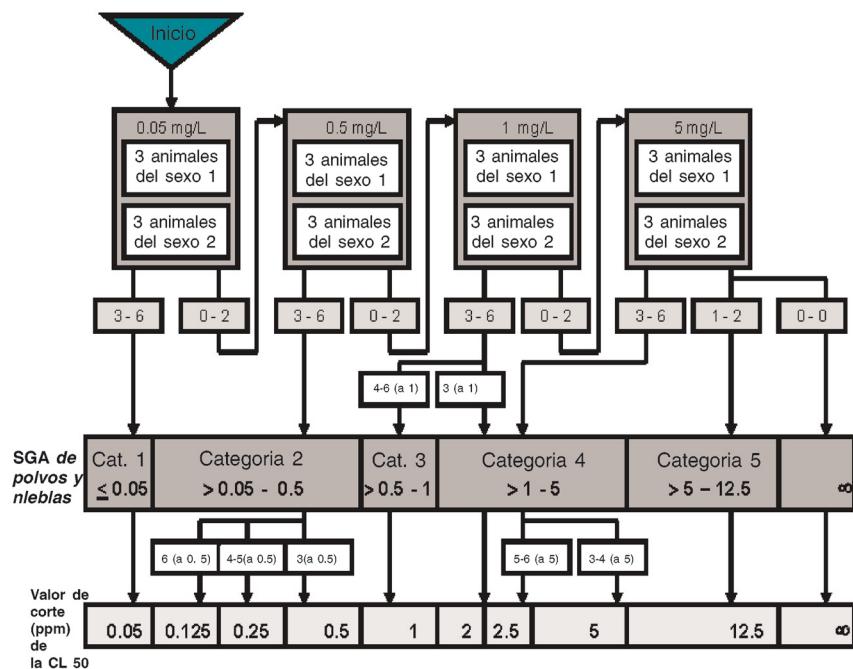
Apéndice 4d: concentración inicial de 5 mg/l

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

⁽¹⁾ En los cuadros siguientes se hace referencia al SGA (sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos). El equivalente de la UE es el Reglamento (CE) n° 1272/2008. En el caso de la toxicidad aguda por inhalación, el Reglamento (CE) n° 1272/2008 (9) no contempla la categoría 5.

Apéndice 4a

Toxicidad aguda por inhalación:
Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 0,05 mg/l/4 horas

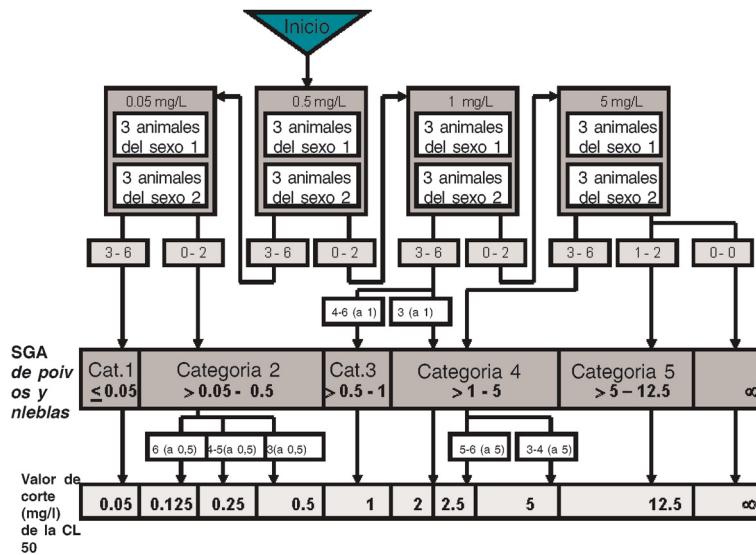


- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞: Sin clasificar
- Estudios con 12,5 mg/l/4 horas: véase el documento de orientación nº 39(8)

Apéndice 4b

Toxicidad aguda por inhalación:

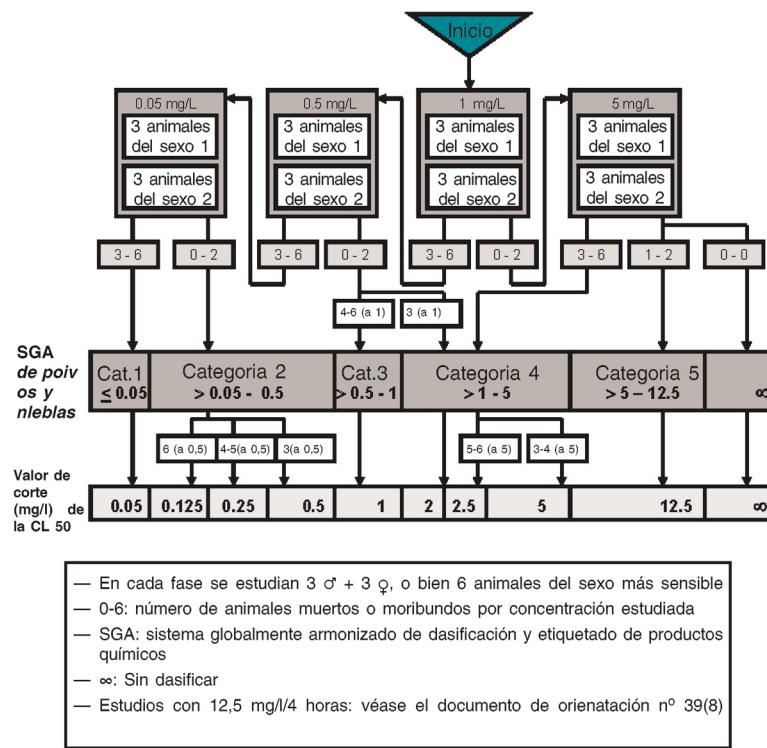
Procedimiento de ensayo de aerosoles con una concentración inicial de 0,5 mg/l/4 horas



- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞: Sin clasificar
- Estudios con 12,5 mg/l/4 horas: véase el documento de orientación nº 39(8)

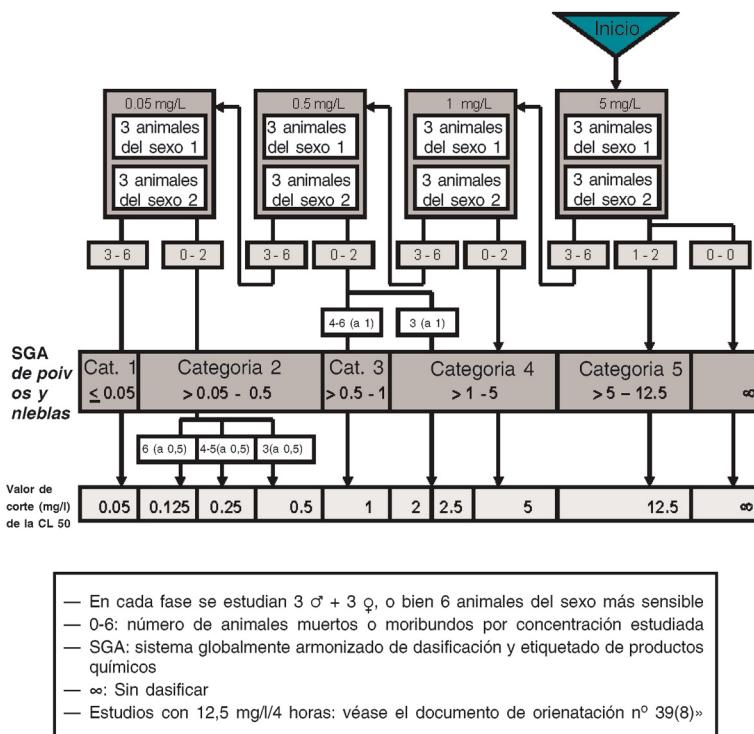
Apéndice 4c

Toxicidad aguda por inhalación:
Procedimiento de ensayo de aerosoles con una concentración inicial de 1 mg/l/4 horas



Apéndice 4d

Toxicidad aguda por inhalación:
Procedimiento de ensayo de aerosoles con una concentración inicial de 5 mg/l/4 horas



9) El capítulo C.10 se sustituye por el texto siguiente:

C.10. PRUEBA DE SIMULACIÓN DE TRATAMIENTO AERÓBICO DE AGUAS RESIDUALES: C.10-A: UNIDADES DE LODO ACTIVADO — C.10-B: BIOPELÍCULAS

C.10-A: Unidades de lodo activado

INTRODUCCIÓN

- El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 303 (2001). En la década de 1950 se observó que los agentes tensioactivos de reciente introducción provocaban la formación excesiva de espuma en las depuradoras de aguas residuales y en los ríos. El tratamiento aeróbico no era suficiente para eliminarlos totalmente y en algunos casos limitaban la eliminación de otros tipos de materia orgánica. Esta situación dio pie a que se pusieran en marcha muchas investigaciones sobre cómo eliminar los agentes tensioactivos de las aguas residuales y sobre si las nuevas sustancias producidas por la industria podían someterse al tratamiento de las aguas residuales. Con este objetivo, se utilizaron unidades modelo que representaban a los dos tipos principales de tratamiento biológico aeróbico de las aguas residuales (lodo activado y filtración por percolación o por goteo). Habría sido poco práctico y muy caro distribuir cada sustancia nueva y controlar las grandes depuradoras, incluso de forma local.

CONSIDERACIONES INICIALES

Unidades de lodo activado

- Se han descrito unidades modelo de lodo activado en una gama de 300 a unos 2 000 ml. Algunas simulaban muy bien las condiciones de las instalaciones de escala real, y disponían de tanques de sedimentación de lodo en los que el lodo sedimentado se bombeaba de nuevo al tanque de aireación, mientras que otras no tenían dispositivos de sedimentación como, por ejemplo, Swisher (1). El tamaño del aparato representa un compromiso: por una parte, debe ser suficientemente grande para un funcionamiento mecánico adecuado y para permitir la toma de un volumen suficiente de muestras sin que el funcionamiento se vea afectado, pero, por otra parte, no debe ser tan grande que sus necesidades de espacio y de materiales sean excesivas.

3. Dos formas de aparatos que se han utilizado ampliamente y dando satisfacción son las unidades Husmann (2) y las unidades de depósito poroso (3) (4), que son las utilizadas en primer lugar en el estudio de tensioactivos; estas se describen en el presente método de ensayo. Hay otros tipos que también se han utilizado con éxito, como el de Eckenfelder (5). Debido a que son relativamente elevados el coste y el esfuerzo necesarios para aplicar esta prueba de simulación, se han investigado en paralelo otros ensayos exploratorios más simples y baratos, recogidos ahora en el capítulo C.4-A a F del presente anexo (6). La experiencia con muchos tensioactivos y otras sustancias ha puesto de manifiesto que los que pasaban los ensayos exploratorios (fácilmente biodegradables) también se degradaban en el ensayo de simulación. Algunos de los que no pasaban los ensayos exploratorios sí conseguían pasar los ensayos de biodegradabilidad intrínseca [capítulos C.12 (7) y C.19 (8) del presente anexo], pero solo algunos de este último grupo eran degradados en el ensayo de simulación, mientras que las sustancias que no pasaban los ensayos de biodegradabilidad intrínseca tampoco se degradaban en los ensayos de simulación (9) (10) (11).
4. Para algunos fines son suficientes los ensayos de simulación efectuados con un solo conjunto de condiciones de funcionamiento; los resultados se expresan en porcentaje de la eliminación de la sustancia problema o del carbono orgánico disuelto (COD). En el presente método de ensayo se describe un método de este tipo. Sin embargo, a diferencia de la versión anterior del presente capítulo, que describía un solo tipo de aparato para depurar agua residual sintética en el método de unidades acopladas utilizando un método relativamente sencillo de retirada de lodo, el presente texto ofrece una serie de variaciones. Se describen alternativas del tipo de aparato, del modo de funcionamiento y de eliminación de las aguas residuales y de retirada del lodo. El texto sigue de cerca el de la norma ISO 11733 (12), que fue objeto de mucha atención durante su preparación, aunque el método no se ha sometido a estudio interlaboratorios.
5. Para otros fines, es necesario determinar con mayor precisión la concentración de la sustancia problema en el efluente, para lo cual hace falta un método de mayor envergadura. Por ejemplo, la proporción de lodo retirado debe regularse de forma más precisa a lo largo de cada día y de cada fase del ensayo, y las unidades deben funcionar a diversas proporciones de retirada. Para que el método sea totalmente exhaustivo, es necesario hacer ensayos a dos o tres temperaturas diferentes. Un método de este tipo es descrito por Birch (13) (14) y se resume en el apéndice 6. Sin embargo, los conocimientos actuales son insuficientes para decidir cuál de los modelos cinéticos es aplicable a la biodegradación de las sustancias en la depuración de aguas residuales y en el medio acuático en general. La aplicación de una cinética de Monod, señalada en el apéndice 6 como ejemplo, se limita a las sustancias presentes a una concentración de 1 mg/l o más pero, en opinión de algunos autores, incluso este extremo está aún por confirmar. En el apéndice 7 se indican ensayos a concentraciones que reflejan con mayor fidelidad las que se encuentran en las aguas residuales, pero estos ensayos, así como los del apéndice 6, se incluyen como apéndices en lugar de publicarse como métodos de ensayo aparte.

Filtros

6. Se ha prestado mucha menos atención a los modelos de filtros percoladores, quizá debido a que son más engorrosos y menos compactos que los modelos de instalaciones de lodo activado. Gerike *et al.* desarrollaron unas unidades de filtros por goteo y las utilizaron con el método de unidades acopladas (15). Estos filtros son relativamente grandes (2 m de altura y 60 l de volumen) y cada uno requiere hasta 2 l/h de aguas residuales. Baumann *et al.* (16) simularon filtros de goteo insertando tiras de "lana" de poliéster en tubos de 1 m (14 mm de diámetro interior) después de haberlas sumergido en lodo activado concentrado durante 30 min. Se introdujo desde arriba en el tubo vertical la sustancia problema como única fuente de C en una solución de sales minerales, y se evaluó la biodegradación midiendo el COD en el efluente y el CO₂ en el gas emitido.
7. Se han simulado biofiltros de otra manera (15): se ponían en contacto las superficies internas de tubos giratorios, inclinados levemente respecto a la horizontal, con aguas residuales (con un flujo de unos 250 ml/h), tanto con la sustancia problema como sin ella, y en los efluentes recogidos se examinaba la concentración de COD o la de la sustancia problema.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

8. El presente método está concebido para determinar la eliminación y la biodegradación primaria o la final de sustancias orgánicas hidrosolubles por microorganismos aerobios en un sistema de ensayo de funcionamiento continuo que simula el proceso del lodo activado. Las fuentes de carbono y energía para los microorganismos son un medio orgánico fácilmente biodegradable y la sustancia problema orgánica.
9. Se disponen dos unidades de prueba en funcionamiento continuo (instalaciones de lodo activado o depósitos porosos), en paralelo y en las mismas condiciones, elegidas como idóneas para el objetivo del ensayo. Normalmente, el tiempo medio de retención hidráulica es de 6 h y la edad media del lodo (tiempo de retención del lodo) está entre 6 y 10 días. El lodo se retira por uno de los dos métodos, la sustancia problema se añade normalmente al afluente (medio orgánico) de una sola de las unidades, a una concentración de entre 10 y 20 mg/l de carbono orgánico disuelto (COD). La segunda unidad sirve de control para determinar la biodegradación del medio orgánico.
10. Se toman muestras frecuentes de los efluentes y en ellas se determina preferentemente el COD, o bien la demanda química de oxígeno (DQO), junto con la concentración de la sustancia problema (en caso necesario) mediante análisis específico, en el efluente de la unidad a la que se añade dicha sustancia. Se acepta que la diferencia entre las concentraciones de COD o de DQO en los efluentes de las unidades de ensayo y de control se debe a la sustancia problema o a sus metabolitos orgánicos. Esta diferencia se compara con la concentración en los afluentes de COD o de DQO debida a la sustancia problema, a fin de determinar la eliminación de dicha sustancia.

11. Normalmente es posible distinguir la biodegradación de la bioadsorción mediante un examen atento de la curva de eliminación respecto al tiempo, y se puede confirmar mediante un ensayo de biodegradación fácil utilizando un inóculo aclimatado procedente de la unidad que recibe la sustancia problema.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

12. Es necesario conocer las características de pureza, hidrosolubilidad, volatilidad y adsorción de la sustancia problema para poder interpretar correctamente los resultados. Normalmente no es posible hacer el ensayo con sustancias volátiles e insolubles, salvo que se adopten precauciones especiales (véase el apéndice 5). También debe conocerse la estructura química, o al menos la fórmula empírica, para poder calcular los valores teóricos o comprobar los valores medidos de ciertos parámetros, como la demanda teórica de oxígeno (DTO), el carbono orgánico disuelto (COD) y la demanda química de oxígeno (DQO).
13. El disponer de datos sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microrganismos (véase el apéndice 4) puede ser útil para seleccionar las concentraciones adecuadas para el ensayo y puede ser fundamental para interpretar correctamente los valores bajos de la biodegradación.

UMBRALES

14. En la aplicación original de este ensayo (confirmatorio) de simulación a la biodegradación primaria de tensioactivos, se exige una eliminación del 80 % de la sustancia específica para poder comercializar el tensioactivo. Si no se alcanza el valor del 80 %, puede aplicarse este ensayo (confirmatorio) de simulación y el tensioactivo puede comercializarse solamente si se elimina más del 90 % de la sustancia específica. Con las sustancias en general, no se trata de pasar un umbral sino de que el valor obtenido del porcentaje de la eliminación pueda utilizarse para calcular aproximadamente la concentración probable en el medio ambiente que deba utilizarse en la evaluación del peligro planteado por las sustancias. Los resultados tienden a seguir un modelo de todo o nada. En una serie de estudios de sustancias puras, se observó que el porcentaje de la eliminación de COD era > 90 % en más de tres cuartos y > 80 % en más del 90 % de las sustancias que mostraban un grado significativo de biodegradabilidad.
15. Son relativamente pocas las sustancias (por ejemplo, tensioactivos) que están presentes en las aguas residuales a las concentraciones utilizadas en el presente ensayo (alrededor de 10 mg C/l). Algunas sustancias pueden resultar inhibidoras a estas concentraciones, mientras que la cinética de eliminación de otras puede ser diferente a concentraciones bajas. Podría conseguirse una evaluación más exacta de la degradación utilizando métodos modificados, con concentraciones de la sustancia problema a un nivel más bajo próximo a las situaciones reales, y los datos recogidos podrían utilizarse para calcular las constantes cinéticas. Sin embargo, aún no se han validado las técnicas experimentales necesarias, y tampoco se han establecido los modelos cinéticos que describen las reacciones de biodegradación (véase el apéndice 7).

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

16. Para asegurarse de la correcta ejecución del procedimiento experimental, es conveniente someter a ensayo ocasionalmente sustancias cuyo comportamiento se conozca, a la vez que se investigan sustancias problema. Entre esas sustancias se cuentan el ácido adípico, el 2-fenil-fenol, el 1-naftol, el ácido difénico, el ácido 1-naftoico, etc. (9) (10) (11).

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

17. Ha habido muchos menos informes de estudios de ensayos de simulación que de ensayos de la biodegradabilidad fácil. La reproducibilidad obtenida con muestras en paralelo es buena (dentro del 10-15 %) en el caso de las sustancias problema degradadas en un 80 % o más, pero la variabilidad es mayor cuando se trata de sustancias que se degradan menos bien. Asimismo, con algunas sustancias límite se han encontrado resultados muy dispares (por ejemplo, 10 %, 90 %) en distintas ocasiones dentro del plazo de 9 semanas permitido en el ensayo.
18. Se ha observado poca diferencia en los resultados obtenidos con los dos tipos de equipo, pero algunas sustancias se han degradado de forma más amplia y sistemática en presencia de agua residual doméstica que con el agua residual sintética de la OCDE.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Equipo

Sistema de ensayo

19. El sistema de ensayo para una sola sustancia problema consiste en una unidad de ensayo y una unidad de control, pero cuando solo se efectúan análisis específicos (biodegradación primaria) únicamente hace falta la unidad de ensayo. Una misma unidad de control puede utilizarse con varias unidades de ensayo que reciban la misma o diferentes sustancias problema. En caso de acoplamiento (apéndice 3), cada unidad de ensayo debe disponer de su propia unidad de control. El sistema de ensayo puede ser bien un modelo de instalación de lodo activado, unidad Husmann (apéndice 1, figura 1), o bien un depósito poroso (apéndice 1, figura 2). En ambos casos es necesario disponer de recipientes de almacenamiento de tamaño suficiente para los afluente y efluentes, así como bombas para dosificar el afluente, bien mezclado con una disolución de la sustancia problema o bien aparte.

20. Cada instalación de lodo activado consiste en un recipiente de aireación con una capacidad conocida de unos 3 litros de lodo activado y en un separador (depósito de decantación secundario) de una capacidad de unos 1,5 litros; los volúmenes pueden modificarse en cierta medida ajustando la altura del depósito de decantación. Pueden utilizarse recipientes de tamaños diferentes si funcionan con presiones hidráulicas comparables. Si no es posible mantener la temperatura de la sala de ensayo en la banda deseada, se recomienda utilizar recipientes con camisa de agua a temperatura regulada. Se utiliza una bomba de elevación por aire comprimido o una bomba dosificadora para reciclar el lodo activado, pasándolo desde el depósito de decantación al recipiente de aireación, bien de forma continua o bien de forma intermitente, a intervalos periódicos.
21. El sistema de depósito poroso consiste en un cilindro interior, poroso, de fondo cónico, incluido en un recipiente algo más grande, de la misma forma, pero hecho de material plástico impermeable. El recipiente poroso puede estar hecho, por ejemplo, de polietileno poroso con un diámetro máximo de poro de 90 µm y 2 mm de espesor. La separación del lodo respecto al medio orgánico tratado se efectúa mediante el paso diferencial a través de la pared porosa. Los efluentes se recogen en el espacio anular a partir del cual rebosan al recipiente de recogida. No se produce sedimentación y, por tanto, no hay retorno del lodo. El sistema en conjunto puede estar montado en un baño de agua de temperatura regulada. Los depósitos porosos se pueden bloquear y rebosar en las fases iniciales. En tal caso, se debe sustituir el forro poroso por uno limpio, pasando previamente con sifón el lodo del depósito a un cubo limpio y extrayendo el forro bloqueado. Tras limpiar el cilindro exterior impermeable, se inserta un forro limpio y se devuelve el lodo al depósito. El lodo que pueda quedar adherido a los lados del forro bloqueado se raspa cuidadosamente y se transfiere también. Los depósitos bloqueados se limpian primero con un chorro fino de agua para eliminar el lodo restante; luego se sumergen en solución diluida de hipoclorito sódico y después en agua; finalmente, se enjuagan a fondo con agua.
22. Para la aireación del lodo en los recipientes de aireación de ambos sistemas, es necesario aplicar técnicas adecuadas como, por ejemplo, cubos sinterizados (piedras difusoras) y aire comprimido. El aire se limpiará, en caso necesario, pasándolo por un filtro adecuado y lavándolo. Debe pasar suficiente aire a través del sistema para mantener las condiciones aeróbicas y mantener en suspensión los flóculos de lodo todo el tiempo que dure el ensayo.

Equipo de filtración o centrífuga

23. Dispositivo de filtración de muestras con filtros de membrana de porosidad adecuada (diámetro de abertura nominal de 0,45 µm) que adsorban sustancias orgánicas solubles y liberen carbono orgánico en un grado mínimo. Si se utilizan filtros que liberan carbono orgánico, lavar cuidadosamente los filtros con agua caliente para eliminar el carbono orgánico lixiviante. Otra posibilidad es utilizar una centrífuga que pueda alcanzar una aceleración de 40 000 m/s².

Equipo analítico

24. Equipo necesario para determinar:
- el COD (carbono orgánico disuelto) y el COT (carbono orgánico total), o la DQO (demanda química de oxígeno),
 - la sustancia específica, en su caso,
 - los sólidos en suspensión, el pH, la concentración de oxígeno en el agua,
 - la temperatura, la acidez y la alcalinidad,
 - el amonio, el nitrito y el nitrato, si el ensayo se efectúa en condiciones de nitrificación.

Agua

25. Agua del grifo, con menos de 3 mg/l de COD. Debe determinarse la alcalinidad, en caso de que no se conozca previamente.

26. Agua desionizada, con menos de 2 mg/l de COD.

Medio orgánico

27. Como medio orgánico puede aceptarse agua residual sintética, agua residual doméstica o una mezcla de ambos tipos. Se ha observado (11) (14) que el uso de agua residual doméstica sola suele llevar a un mayor porcentaje de eliminación del COD y que incluso permite la eliminación y la biodegradación de algunas sustancias no biodegradadas cuando se utiliza el agua residual sintética de la OCDE. Asimismo, la adición constante o intermitente de agua residual doméstica suele estabilizar el lodo activado, incluida la capacidad crucial de sedimentar bien. Así pues, se recomienda el uso de agua residual doméstica. Debe medirse la concentración de COD o de DQO en cada nuevo lote de medio orgánico. Es necesario conocer la acidez o la alcalinidad del medio orgánico. Es posible que el medio orgánico requiera la adición de un amortiguador adecuado (carbonato de hidrógeno y sodio, o fosfato de dihidrógeno y potasio) si es baja su acidez o su alcalinidad, para mantener durante el ensayo un pH de alrededor de 7,5 ± 0,5 en el recipiente de aireación. Debe decidirse en cada caso la cantidad de amortiguador que ha de añadirse, y en qué momento hacerlo. Cuando se hagan mezclas tanto de forma continua como de forma intermitente, es necesario mantener aproximadamente constante el valor del COD (o de la DQO) de la mezcla, por ejemplo mediante dilución con agua.

Agua residual sintética

28. Disuélvase en cada litro de agua del grifo: peptona, 160 mg; extracto de carne, 110 mg; urea, 30 mg; fosfato de hidrógeno y dipotasio anhidro (K_2HPO_4), 28 mg; cloruro de sodio ($NaCl$), 7 mg; cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 4 mg; sulfato de magnesio heptahidratado ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$), 2 mg. El agua residual sintética de la OCDE es un ejemplo y da una concentración media de COD en el afluente de unos 100 mg/l. También es posible utilizar otras composiciones, con la misma concentración aproximada de COD, que se acerquen más al agua residual real. Si hace falta un afluente menos concentrado, puede diluirse el agua residual sintética, por ejemplo en la proporción 1:1, con agua del grifo para obtener una concentración de unos 50 mg/l. Este afluente más débil permitirá un mejor crecimiento de los organismos nitrificantes, y esta modificación debe utilizarse si se tiene que investigar la simulación de las instalaciones de aguas residuales nitrificantes. El agua residual sintética puede elaborarse con agua destilada en forma concentrada y conservarse a alrededor de 1 °C durante una semana como máximo. En el momento en que se necesite, se diluye con agua del grifo. (Este medio no es satisfactorio ya que, por ejemplo, la concentración de nitrógeno es muy elevada y el contenido de carbono es relativamente bajo, pero no se ha sugerido nada mejor, salvo añadir más fosfato como amortiguador y peptona adicional.)

Agua residual doméstica

29. Debe utilizarse agua residual recién decantada, recogida cada día en una depuradora que reciba predominantemente agua residual doméstica. Debe recogerse, antes de la sedimentación primaria, del canal del rebosadero del tanque de sedimentación primaria o de la alimentación a la instalación de lodo activado y encontrarse exenta en gran medida de partículas gruesas. El agua residual puede seguir utilizándose tras guardarse varios días (pero en general no más de siete días) a una temperatura de unos 4 °C, si se demuestra que el COD (o la DQO) no ha descendido de forma significativa (es decir, en menos del 20 %) durante el almacenamiento. A fin de limitar las perturbaciones del sistema, el COD (o la DQO) de cada lote nuevo debe ajustarse a un nivel constante adecuado, antes de utilizarlo, por ejemplo, mediante dilución con agua del grifo.

Lodo activado

30. Debe recogerse lodo activado para la inoculación, a partir del tanque de aireación de una depuradora de aguas residuales que funcione bien o de una unidad de lodo activado de laboratorio que trate predominantemente aguas residuales domésticas.

Soluciones madre de sustancia problema

31. Con sustancias de solubilidad adecuada, deben prepararse soluciones madre a concentraciones apropiadas (por ejemplo, de 1 a 5 g/l) en agua desionizada, o en la porción mineral del agua residual sintética (respecto a las sustancias insolubles y volátiles, véase el apéndice 5). Hay que determinar el COD y el carbono orgánico total (COT) de la solución madre y repetir las mediciones con cada lote nuevo. Si la diferencia entre el COD y el COT es superior al 20 %, ha de comprobarse la hidrosolubilidad de la sustancia problema. Hay que comparar los valores nominales con los valores de COD o la concentración de la sustancia problema medidos por análisis específico de la solución madre, para considerar si la recuperación es suficientemente buena (normalmente puede esperarse > 90 %). Ha de comprobarse, especialmente en el caso de dispersiones, si el COD puede utilizarse como parámetro analítico o si solo es posible utilizar una técnica analítica específica para la sustancia problema. En el caso de dispersiones es necesario centrifugar las muestras. Con cada lote nuevo hay que medir el COD, la DQO o la sustancia mediante análisis específico.
32. Determíñese el pH de la solución madre. La presencia de valores extremos indica que la adición de la sustancia puede influir en el pH de lodo activado en el sistema de ensayo. En este caso, haya que neutralizar la solución madre para obtener un pH de $7 \pm 0,5$, utilizando pequeñas cantidades de ácidos o bases inorgánicos, pero evitando la precipitación de la sustancia problema.

PROCEDIMIENTO

33. Se describe el procedimiento para las unidades de instalaciones de lodo activado; para el sistema de depósito poroso ha de adaptarse ligeramente.

Preparación del inóculo

34. Inocúlese el sistema de ensayo al inicio del ensayo con lodo activado o bien con un inóculo que contenga una pequeña concentración de microorganismos. Manténgase el inóculo aireado a temperatura ambiente hasta que se vaya a utilizar, en el plazo máximo de 24 h. En el primer caso, tómese una muestra de lodo activado del tanque de aireación de una depuradora biológica de aguas residuales que funcione con eficiencia o bien de una depuradora de laboratorio, que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Si se van a simular condiciones de nitrificación, tómese lodo de una depuradora de aguas residuales de nitrificación. Determíñese la concentración de sólidos en suspensión y, en caso necesario, concéntrese el lodo por sedimentación, de forma que el volumen añadido al sistema de ensayo sea mínimo. Ha de asegurarse que la concentración inicial de materia seca es de alrededor de 2,5 g/l.
35. En el segundo caso, utilíicense como inóculo entre 2 ml/l y 10 ml/l de un efluente procedente de una depuradora biológica de aguas residuales domésticas. Para conseguir tantas especies diferentes de bacterias como sea posible, puede ser conveniente añadir inóculos procedentes de otras fuentes diversas como, por ejemplo, aguas superficiales. En este caso, el lodo activado se va a desarrollar y crecer en el sistema de ensayo.

Dosificación del medio orgánico

36. Hay que asegurarse de que los recipientes del afluente y del efluente, así como los tubos que los unen, se limpian a fondo para eliminar la eventual proliferación microbiana, tanto al principio como durante todo el ensayo. Móntense los sistemas de ensayo en salas donde la temperatura esté regulada (normalmente en la banda de 20-25 °C) o utilízense unidades de ensayo provistas de camisas de agua. Prepárese un volumen suficiente del medio orgánico requerido (puntos 27-29). Lléñese inicialmente el recipiente de aireación y el depósito de decantación con el medio orgánico y añádase el inóculo (puntos 34 y 35). Iníciense la aireación de forma que el lodo se mantenga en suspensión y en condiciones aeróbicas, y empiécese a introducir el afluente y a reciclar el lodo sedimentado. Pásele medio orgánico de los recipientes de almacenamiento a los de aireación (puntos 20 y 21) de las unidades de ensayo y de control, y recójanse los efluentes respectivos en recipientes de almacenamiento similares. Para conseguir el tiempo normal de retención hidráulica de 6 h, el medio orgánico se bombea con un caudal de 0,5 l/h. A fin de confirmar este extremo, mídase la cantidad diaria de medio orgánico introducido anotando la reducción de volumen del medio presente en los recipientes de almacenamiento. Serían necesarios otros modos de dosificación para determinar los efectos de una liberación intermitente y de una aportación de sustancias de "choque".
37. Si el medio orgánico se prepara para utilizarlo durante un plazo superior a 1 día, es necesario enfriarlo a unos 4 °C o aplicar otros métodos adecuados de conservación para impedir el crecimiento microbiano y la biodegradación fuera de las unidades de ensayo (punto 29). Si se utiliza agua residual sintética, es posible preparar y conservar a unos 4 °C una solución madre concentrada (por ejemplo, a una concentración 10 veces superior a la normal, punto 28) Esta solución madre puede mezclarse bien con el volumen adecuado de agua del grifo antes de utilizarla; otra posibilidad consiste en bombearla directamente a la vez que se bombea aparte la cantidad adecuada de agua del grifo.

Dosificación de la sustancia problema

38. Añádase un volumen adecuado de la solución madre de sustancia problema (punto 31) al recipiente de almacenamiento del afluente o introduzcase directamente con una bomba aparte en el recipiente de aireación. La concentración de ensayo media normal en el afluente debe situarse entre 10 y 20 mg/l de COD, con una concentración máxima no superior a 50 mg/l. Si la hidrosolubilidad de la sustancia problema es baja o resulta probable que aparezcan efectos tóxicos, puede reducirse la concentración a 5 mg/l de COD, o incluso menos, pero solo si existe y se utiliza un método analítico específico adecuado (las sustancias problema dispersadas que son poco hidrosolubles pueden añadirse mediante técnicas de dosificación especiales, véase el apéndice 5).
39. Se empieza a añadir la sustancia problema cuando el sistema se haya estabilizado y ya esté reduciendo eficientemente el COD del medio orgánico (alrededor del 80 %). Es importante comprobar que todas las unidades funcionan con la misma eficiencia antes de la adición de la sustancia problema; en caso contrario, suele ser útil mezclar los distintos lodos y volver a repartirlos en cantidades iguales a cada unidad. Cuando se utilice un inóculo de unos 2,5 g/l (en peso seco), es posible añadir la sustancia problema desde el inicio del ensayo ya que la adición directa de cantidades crecientes desde el principio ofrece la ventaja de que el lodo activado puede adaptarse mejor a la sustancia problema. Independientemente de la manera de añadir la sustancia problema, se recomienda que se midan a intervalos regulares el caudal pertinente y/o los volúmenes de los recipientes de almacenamiento.

Manipulación del lodo activado

40. La concentración de sólidos del lodo activado suele estabilizarse entre unos límites durante el ensayo, independientemente del inóculo utilizado, en la banda de 1 a 3 g/l (en peso seco), en función de la calidad y de la concentración del medio orgánico, las condiciones de funcionamiento, la naturaleza de los microorganismos presentes y la influencia de la sustancia problema.
41. Procédase bien a determinar los sólidos en suspensión de los recipientes de aireación al menos una vez por semana y desechar el exceso de lodo para mantener la concentración entre 1 y 3 g/l (en peso seco), o bien a controlar la edad media del lodo para conseguir un valor constante, normalmente en la banda de 6 a 10 días. Si, por ejemplo, se elige un tiempo de retención del lodo de 8 días, hay que eliminar cada día 1/8 del volumen del lodo activado presente en el recipiente de aireación y desecharlo. Esta operación debe realizarse cada día o, preferentemente, mediante una bomba que funcione de forma automática e intermitente. El mantener constante (o dentro de unos límites estrechos) la concentración de sólidos en suspensión no mantiene constante el tiempo de retención del lodo (TRL), que es la variable operativa que determina el valor de la concentración de la sustancia problema en el efluente.
42. A lo largo de todo el ensayo debe retirarse, con una frecuencia al menos diaria, todo el lodo que se adhiera a las paredes del recipiente de aireación y del depósito de decantación, de forma que se vuelva a suspender. Obsérvense y límpiese periódicamente todos los tubos para evitar el crecimiento de biopelículas. El lodo sedimentado del depósito de decantación se recicla introduciéndolo de nuevo en el recipiente de aireación, de preferencia mediante bombeo intermitente. En el sistema de depósito poroso no se efectúa ningún reciclado, pero ha de asegurarse la introducción de cilindros internos limpios antes de que el volumen del recipiente aumente significativamente (punto 21).
43. En las unidades Husmann puede darse escasa sedimentación y pérdida de lodo. Estas unidades pueden rectificarse aplicando una o varias de las medidas que figuran a continuación, en paralelo en las unidades de ensayo y de control:

- puede añadirse a intervalos periódicos (por ejemplo, cada semana) lodo nuevo o floculante (por ejemplo, 2 ml/recipiente de solución de FeCl_3 de 50 g/l), pero asegurándose de que no se produce ninguna precipitación ni reacción de la sustancia problema con el FeCl_3 ,
- puede sustituirse la bomba de elevación por aire comprimido mediante una bomba peristáltica, permitiendo así un flujo de recirculación de lodo que compensa aproximadamente el flujo de afluente que debe utilizarse y permitiendo el desarrollo de una zona anaerobia en el lodo sedimentado (la geometría de la bomba de aire comprimido limita el caudal mínimo del lodo retornado a unas 12 veces el del afluente),
- puede bombearse intermitentemente lodo desde el depósito de decantación al recipiente de aireación (por ejemplo, 5 min. cada 2,5 h para reciclar entre 1 l/h y 1,5 l/h),
- puede utilizarse un agente antiespumante no tóxico a una concentración mínima, para evitar pérdidas por formación de espuma (por ejemplo, aceite de silicona),
- puede pasarse aire a través del lodo en el depósito de decantación en forma de fuertes impulsos breves (por ejemplo, de 10 sec cada hora),
- es posible añadir el medio orgánico al recipiente de aireación a intervalos (por ejemplo, de 3 a 10 min cada hora).

Muestreo y análisis

44. A intervalos periódicos debe medirse la concentración de oxígeno disuelto, la temperatura y el valor del pH del lodo activado presente en los recipientes de aireación. Hay que velar por que siempre se disponga de oxígeno suficiente ($> 2 \text{ mg/l}$) y que la temperatura se mantenga en la banda necesaria (normalmente, de 20 a 25 °C). Manténgase el pH a $7,5 \pm 0,5$ añadiendo al recipiente de aireación o al afluente pequeñas cantidades de base o ácido inorgánico, o aumentando la capacidad de amortiguación del medio orgánico (véase el punto 27). Cuando se efectúa la nitrificación se produce ácido: la oxidación de 1 mg de N produce el equivalente de unos 7 mg de CO_3^{2-} . La frecuencia de las mediciones depende del parámetro que se mida y de la estabilidad del sistema, y puede variar entre diaria y semanal.
45. Mídanse el COD o la DQO en los afluentes que entran en los recipientes de control y de ensayo. Mídase la concentración de la sustancia problema en el afluente de la unidad de ensayo mediante análisis específico o estímese a partir de la concentración en la solución madre (punto 31), el volumen utilizado y la cantidad de agua residual introducida en la unidad de ensayo. Se recomienda calcular la concentración de la sustancia problema para reducir la variabilidad de los datos de concentración.
46. Tómense muestras adecuadas del afluente recogido (por ejemplo, muestras compuestas de 24 h) y filtrense por una membrana de 0,45 μm de diámetro de poro, o centrifíguense a unos $40\,000 \text{ m/s}^2$ durante 15 min aproximadamente. La centrifugación debe utilizarse si resulta difícil realizar la filtración. Determíñese el COD o la DQO al menos por duplicado para medir la biodegradación final y, en caso necesario, la biodegradación primaria mediante un análisis específico de la sustancia problema.
47. El uso del COD puede ocasionar problemas analíticos a concentraciones bajas, por lo que se recomienda solo si se utiliza una concentración suficientemente alta de la sustancia problema (unos 30 mg/l). Asimismo, en caso de sustancias muy adsorbentes, se recomienda medir la cantidad de sustancia adsorbida en el lodo mediante una técnica analítica específica de la sustancia problema.
48. La frecuencia del muestreo depende de la duración prevista del ensayo. Es recomendable una frecuencia de tres veces por semana. Una vez que las unidades estén funcionando con eficiencia, debe dejarse pasar entre 1 semana y un máximo de 6 semanas después de la introducción de la sustancia problema, para permitir que se alcance el estado de equilibrio. Es preferible obtener al menos 15 valores válidos en la fase de meseta (punto 59), que dura normalmente 3 semanas, para la evaluación del resultado del ensayo. El ensayo puede completarse si se alcanza un grado suficiente de eliminación (por ejemplo, $> 90\%$) y se dispone de estos 15 valores, que representan análisis efectuados cada día laborable durante 3 semanas. Normalmente, no debe llegarse a una duración del ensayo superior a 12 semanas tras la adición de la sustancia problema.
49. Si se produce nitrificación en el lodo, y si se quiere estudiar los efectos de la sustancia problema sobre la nitrificación, debe analizarse el contenido de amonio y/o de nitrito más nitrato en muestras tomadas del afluente de las unidades de ensayo y de control, al menos una vez por semana.
50. Todos los análisis deben llevarse a cabo lo antes posible, especialmente las determinaciones de nitrógeno. Si resulta necesario retrasar un análisis, las muestras deben conservarse a unos 4 °C a oscuras, en frascos llenos y bien cerrados. Si resulta necesario almacenar las muestras durante más de 48 h, hay que conservarlas por ultracongelación, por acidificación (por ejemplo, 10 ml/l de una solución de ácido sulfúrico de 400 g/l) o por adición de una sustancia tóxica adecuada [por ejemplo, 20 ml/l de una solución de cloruro de mercurio (II) de 10 g/l]. Hay que verificar que la técnica de conservación no altera los resultados de los análisis.

Acoplamiento de unidades de ensayo

51. Si se utiliza el acoplamiento (apéndice 3), hay que intercambiar cada día la misma cantidad de lodo activado (entre 150 y 1 500 ml en el caso de recipientes de aireación que contienen 3 litros de líquido) entre los recipientes de aireación de la unidad de ensayo y de su unidad de control. Si la sustancia problema se adsorbe fuertemente al lodo, debe cambiarse solo el sobrenadante de los depósitos de decantación. En ambos casos hay que aplicar un factor de corrección para calcular los resultados del ensayo (punto 55).

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

52. Calcúlese el porcentaje de eliminación de la sustancia problema en términos de COD o de DQO respecto a cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_0)}{C_s} \times 100$$

donde:

D_t = % de eliminación del COD o de la DQO al tiempo t

C_s = valores de COD o DQO en el afluente debidos a la sustancia problema, de preferencia estimados a partir de la solución madre (mg/l)

E = valores de COD o DQO medidos en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l)

E_0 = valores de COD o DQO medidos en el afluente de control al tiempo t (mg/l)

53. El grado de eliminación del COD o de la DQO del medio orgánico en la unidad de control es un dato útil para evaluar la actividad de biodegradación del lodo activado durante el ensayo. Calcúlese el porcentaje de eliminación con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_B = \frac{C_M - E_0}{C_M} \times 100$$

donde:

D_B = % de eliminación del COD o de la DQO del medio orgánico de la unidad de control al tiempo t

C_M = valores de COD o de DQO del medio orgánico en el afluente de control (mg/l)

También es posible calcular el porcentaje de eliminación del COD o de la DQO debidos al medio orgánico más la sustancia problema en la unidad de ensayo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

donde:

D_T = % de eliminación del COD o de la DQO en la totalidad del afluente de ensayo

C_T = valores de COD o de DQO de la totalidad del afluente de ensayo o calculados a partir de las soluciones madre (mg/l)

54. Calcúlese la eliminación de la sustancia problema si se mide con un método analítico específico en cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

donde:

D_{ST} = % de eliminación primaria de la sustancia problema al tiempo t

S_i = concentración medida o estimada de la sustancia problema en el afluente de ensayo (mg/l)

S_e = concentración medida de la sustancia problema en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l)

55. Si se ha utilizado el modo de acoplamiento, compénsese la dilución de la sustancia problema en el recipiente de aireación debida al intercambio de lodo utilizando un factor de corrección (véase el apéndice 3). Si se ha aplicado un tiempo medio de retención hidráulica de 6 h y el intercambio de la mitad del volumen del lodo activado en el recipiente de aireación, es necesario corregir los valores de eliminación determinados diariamente (D_t , punto 52) para obtener el grado real de eliminación, D_{tc} , de la sustancia problema con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Expresión de los resultados del ensayo

56. Represéntese el porcentaje de eliminación D_t (o D_{tc}) y D_{sp} , si está disponible, frente al tiempo (véase el apéndice 2). Es posible extraer conclusiones sobre el proceso de eliminación a partir de la forma de la curva de eliminación de la sustancia problema (en sí misma o como COD).

Adsorción

57. Si desde el inicio del ensayo se observa una elevada eliminación del COD de la sustancia problema, es probable que esta se elimine por adsorción a los sólidos del lodo activado. Es posible comprobar este extremo determinando la sustancia problema adsorbida mediante análisis específico. No es normal que la eliminación del COD de sustancias adsorbidas se mantenga elevada durante todo el ensayo; normalmente la eliminación es intensa al principio y después va cayendo gradualmente hasta alcanzar un valor de equilibrio. Si, no obstante, la sustancia problema adsorbida pudiera causar de alguna forma la aclimatación de la población microbiana, la eliminación del COD de la sustancia problema aumentaría posteriormente y alcanzaría un elevado nivel de meseta.

Tiempo de latencia

58. Como en los ensayos estáticos exploratorios, muchas sustancias problema requieren una fase de latencia antes de que se produzca la biodegradación plena. En esta fase de latencia tiene lugar la aclimatación o adaptación de las bacterias de degradación, sin que haya apenas eliminación de la sustancia problema; después empieza el crecimiento de estas bacterias. Esta fase termina y se supone que comienza la fase de degradación cuando se ha eliminado alrededor del 10 % de la cantidad inicial de sustancia problema (después de tener en cuenta la adsorción, en su caso). La fase de latencia suele ser muy variable y poco reproducible.

Fase de meseta

59. La fase de meseta de una curva de eliminación en un ensayo continuo se define como la fase en que se produce el máximo de degradación. La fase de meseta debe durar al menos 3 semanas y permitir la medición de unos 15 valores válidos.

Grado medio de eliminación de la sustancia problema

60. Calcular la media de los valores de eliminación (D_t) de la sustancia problema en la fase de meseta. Redondeado al entero más próximo (1 %), es el grado de eliminación de la sustancia problema. Se recomienda calcular asimismo el intervalo de confianza del 95 % para la media.

Eliminación del medio orgánico

61. Represéntese frente al tiempo el porcentaje de eliminación del COD o de la DQO del medio orgánico en la unidad de control (D_B). Indíquese el grado medio de eliminación de la misma forma que con la sustancia problema (punto 60).

Indicación de la biodegradación

62. Si la sustancia problema no se adsorbe significativamente al lodo activado y la curva de eliminación tiene la forma típica de una curva de biodegradación con fases de latencia, de degradación y de meseta (puntos 58 y 59), la eliminación medida puede atribuirse con seguridad a la biodegradación. Si ha tenido lugar una eliminación inicial importante, el ensayo de simulación no puede diferenciar entre el proceso de eliminación biológico y el abiótico. En tales casos, y en otros en que haya alguna duda sobre la biodegradación (por ejemplo, si se produce eliminación), se deben analizar las sustancias problema adsorbidas o efectuar ensayos adicionales de biodegradación estática, con parámetros que indiquen claramente si se trata de procesos biológicos. Tales ensayos son los métodos de consumo de oxígeno [capítulo C.4-D, E y F del presente anexo (6)] o un ensayo con medición de la producción de dióxido de carbono [capítulo C.4-C del presente anexo (6)], o el método del espacio de cabeza de la ISO (18), utilizando un inóculo preexpuesto del ensayo de simulación. Si se han medido tanto la eliminación del COD como la eliminación específica de la sustancia, una diferencia significativa (siendo la primera más baja que la segunda) entre los porcentajes de eliminación indica la presencia en los efluentes de productos orgánicos intermedios que pueden ser más difíciles de degradar que la sustancia original.

Validez de los resultados del ensayo

63. Mediante la determinación del grado de eliminación del medio orgánico (punto 53) en la unidad de control se consigue información sobre el comportamiento normal de biodegradación del inóculo. Se considera que el ensayo es válido si el grado de eliminación del COD o de la DQO en la unidad o unidades de control es > 80 % tras dos semanas y no se han observado fenómenos inusuales.
64. Si se ha utilizado una sustancia (de referencia) fácilmente biodegradable, el grado de biodegradación (D_t , punto 52) debe ser > 90 %.
65. Si el ensayo se realiza en condiciones de nitrificación, la concentración media en los efluentes debe ser < 1 mg/l de N amoniacial y < 2 mg/l de N nitroso.
66. Si no se cumplen estos criterios (puntos 63-65), repítase el ensayo utilizando un inóculo de una fuente diferente, sométase a ensayo una sustancia de referencia y revisense todos los procedimientos experimentales.

Informe del ensayo

67. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

- Datos de identificación.
- Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas.

Condiciones de ensayo:

- Tipo de sistema de ensayo, eventuales modificaciones para el ensayo de sustancias insolubles y volátiles.
- Tipo de medio orgánico.
- Proporción y naturaleza de los residuos industriales presentes en las aguas residuales, si se conocen.
- Inóculo, naturaleza y lugar o lugares de recogida, concentración y posible tratamiento previo.
- Solución madre de sustancia problema: contenido de COD y COT, forma de preparación si se trata de una suspensión, concentración utilizada en el ensayo, justificación del eventual recurso a concentraciones fuera de la banda de 10 a 20 mg/l de COD, método de adición, fecha de la primera adición, cambios eventuales.
- Edad media del lodo y tiempo medio de retención hidráulica, método de retirada del lodo, métodos para solucionar la aglomeración, la pérdida de lodo, etc.
- Técnicas analíticas empleadas.
- Temperatura del ensayo.
- Cualidades de la aglomeración del lodo, índice volumétrico de lodo (IVL), sólidos en suspensión en el licor mixto (SSLM).
- Eventuales desviaciones respecto a los procedimientos normalizados y circunstancias que puedan afectar a los resultados.

Resultados del ensayo:

- Todos los datos medidos (COD, DQO, análisis específicos, pH, temperatura, concentración de oxígeno, sólidos en suspensión, sustancias nitrogenadas (cuando sea pertinente).
- Todos los valores calculados de D_t (o D_{tc}), D_B , D_{St} obtenidos en formato tabular y las curvas de eliminación.
- Información de las fases de latencia y de meseta, duración del ensayo, grado de eliminación de la sustancia problema y del medio orgánico en la unidad de control, junto con información estadística y declaraciones sobre la biodegradabilidad y la validez del ensayo.
- Discusión de los resultados.

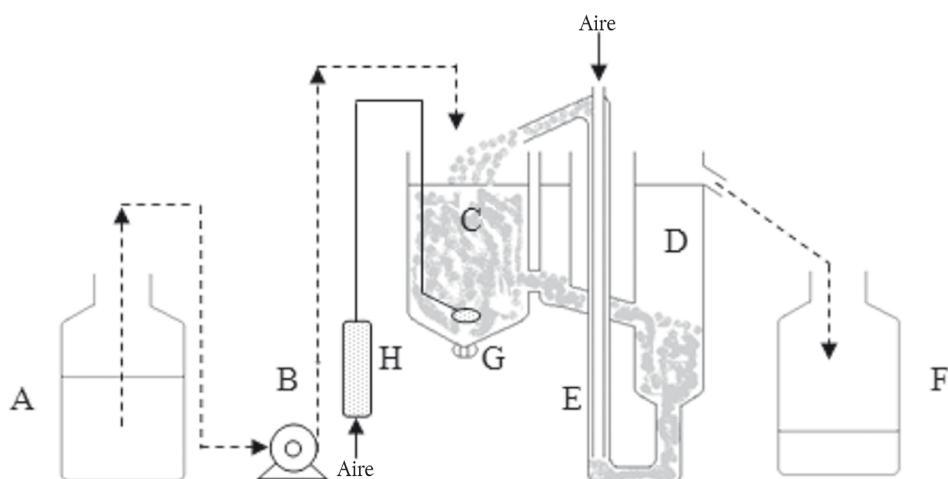
BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Swisher RD (1987). "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.
- (2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.
- (3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.
- (4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.
- (5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.
- (6) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil".
- (7) Capítulo C.12 del presente anexo. Biodegradación — Prueba LASC modificada.
- (8) Capítulo C.19 del presente anexo. Cálculo del coeficiente de adsorción (KOC) en suelos y en lodos de aguas residuales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- (9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.
- (10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.
- (11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp. 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (12) ISO 11733 (1995; revisada de 2004). Evaluación de la eliminación y de la biodegradabilidad de los compuestos orgánicos en medio acuoso-ensayo de simulación de lodos activados.
- (13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornadas Com. Español. Deterg.: 33-48.
- (14) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.
- (15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat. Res. 14: 753-758.
- (16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
- (17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.
- (18) ISO 14593 (1998). Calidad del agua-Evaluación de la biodegradabilidad final de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método de análisis del carbono inorgánico en recipientes cerrados.

Apéndice 1

Figura 1
Equipo utilizado para evaluar la biodegradabilidad

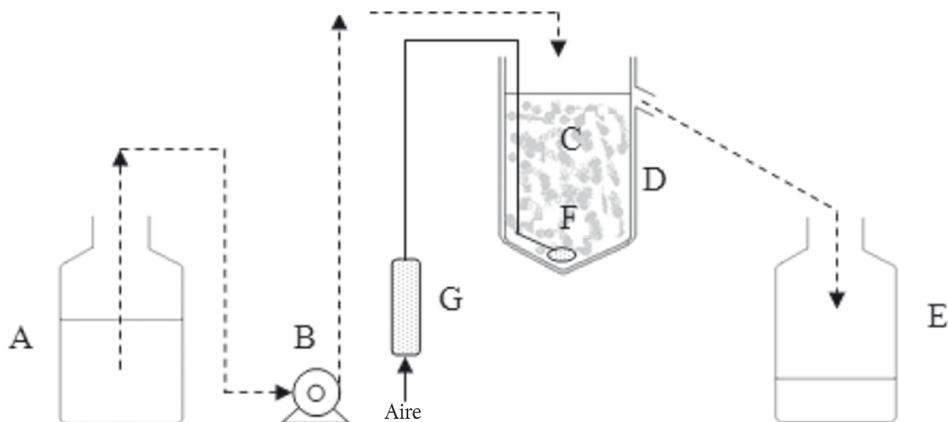
Unidad de Husmann



- | | |
|---|---|
| A. Recipiente de almacenamiento | E. Bomba de elevación por aire comprimido |
| B. Bomba dosificadora | F. Recipiente de recogida |
| C. Cámara de aireación (3 l de capacidad) | G. Aireador |
| D. Recipiente de sedimentación | H. Caudalímetro de aire |

Figura 2
Equipo utilizado para evaluar la biodegradabilidad

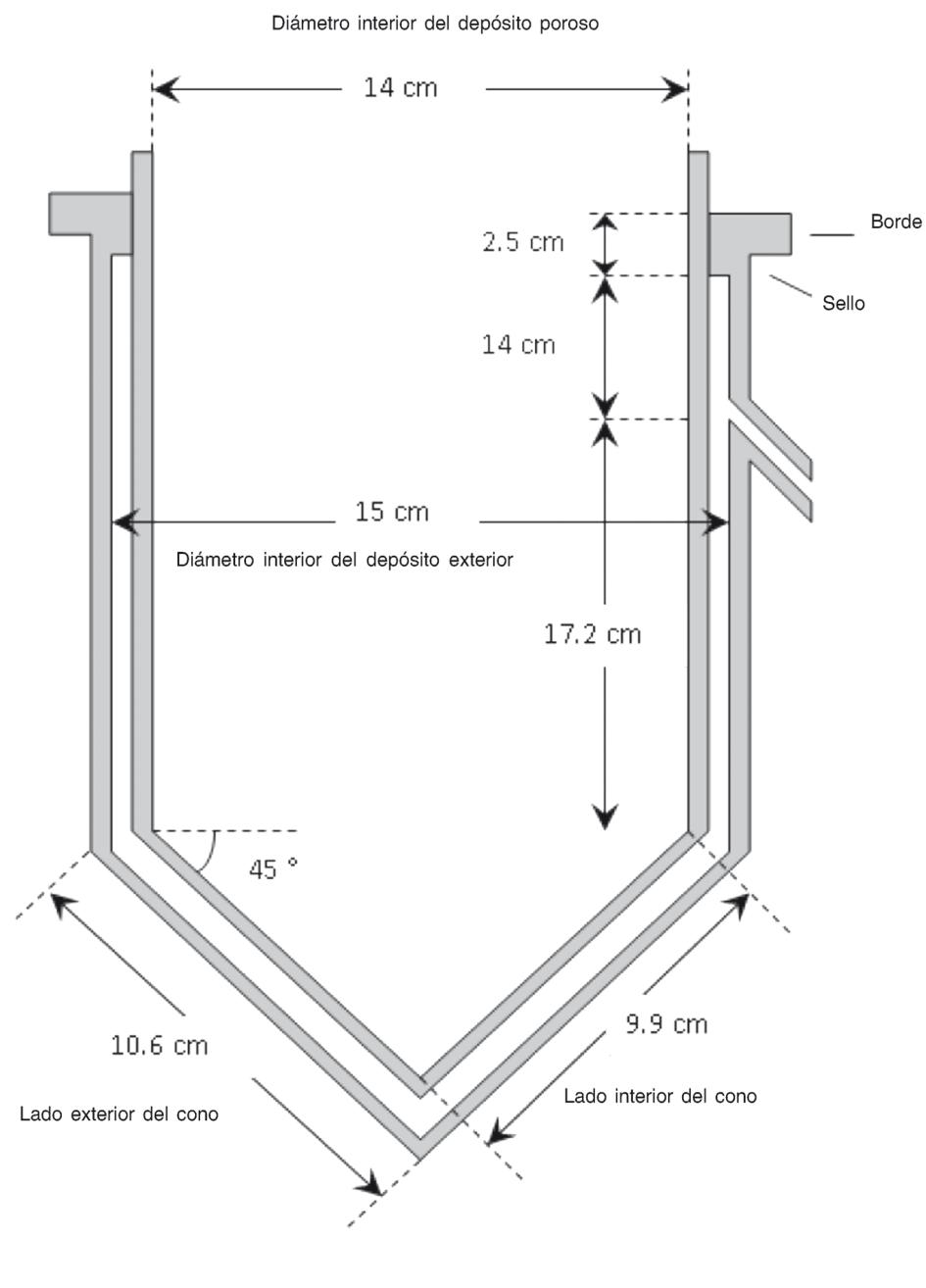
Depósito poroso



- | | |
|------------------------------------|---------------------------|
| A. Recipiente de almacenamiento | E. Recipiente de recogida |
| B. Bomba dosificadora | F. Difusor |
| C. Recipiente de aireación poroso | G. Caudalímetro de aire |
| D. Recipiente impermeable exterior | |

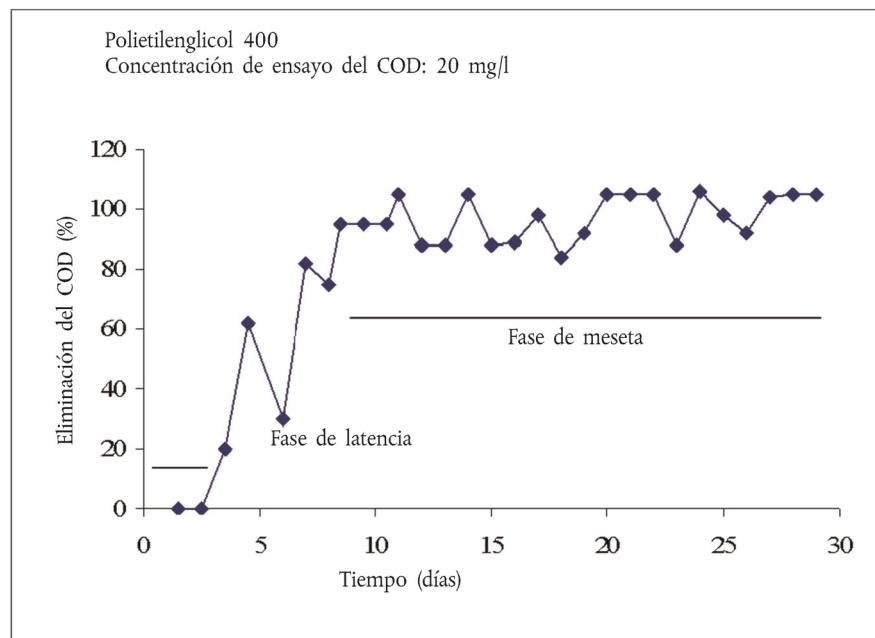
Figura 3

Detalles del recipiente de aireación con depósito poroso de tres litros



Apéndice 2

Ejemplo de curva de eliminación



Apéndice 3

[CON CARÁCTER INFORMATIVO]

ACOPLAMIENTO DE LAS UNIDADES DE ENSAYO

A fin de equilibrar las poblaciones microbianas de los lodos presentes en la unidad de ensayo, que recibe el agua residual más la sustancia problema, y en la unidad de control, que solo recibe el agua residual, se introdujo el intercambio diario de lodos (1). El procedimiento se denominó acoplamiento y el método se conoce como el de unidades acopladas. El acoplamiento se llevó a cabo inicialmente utilizando las unidades de lodo activado de Husmann, pero también se ha aplicado a unidades de depósito poroso (2) (3). No se han encontrado diferencias significativas entre los resultados obtenidos utilizando unidades acopladas y los obtenidos utilizando unidades no acopladas, ni con unidades Husmann ni con depósitos porosos, por lo que no ofrece ninguna ventaja dedicar tiempo y energía a acoplar las unidades.

Los intercambios de lodos pueden dar la apariencia de una eliminación considerable, ya que parte de la sustancia problema se transfiere y las concentraciones de esta sustancia problema en los efluentes de ensayo y de control llegan a equilibrarse más. Así pues, es necesario utilizar factores de corrección, que dependen de la fracción intercambiada y del tiempo medio de retención hidráulica. Se han publicado más detalles del cálculo (1).

Calcúlese el grado corregido de eliminación de COD o de DQO utilizando la fórmula general siguiente:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12) \%$$

donde:

D_{tc} = porcentaje corregido de eliminación de COD o de DQO

D_t = porcentaje determinado de eliminación de COD o de DQO

a = fracción intercambiada del volumen de las unidades de lodo activado

r = tiempo medio de retención hidráulica (h)

Si, por ejemplo, se intercambia la mitad del volumen del tanque de aireación ($a = 0,5$) y el tiempo medio de retención hidráulica es de 6 h, la fórmula de corrección es la siguiente:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. *Wat. Res.* 9: 1131-1135.
- (2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: *Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18*. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- (3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

Apéndice 4

EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL LODO ACTIVADO

Procedimiento con sustancias problema

1. Es posible que una sustancia (o un agua residual) no se degrade ni se elimine en el ensayo de simulación, e incluso que tenga un efecto inhibidor sobre los microorganismos del lodo. Otras sustancias se biodegradan a pequeñas concentraciones pero son inhibidoras a concentraciones más elevadas (hormesis). Los efectos inhibidores pueden haberse puesto de manifiesto en una fase anterior o haberse determinado en un ensayo de toxicidad, utilizando un inóculo similar o idéntico al utilizado en el ensayo de simulación (1). Tales métodos son la inhibición del consumo de oxígeno [capítulo C.11 del presente anexo (2) y norma ISO 8192(3)] o la inhibición del crecimiento de los organismos del lodo [ISO 15522 (4)].
2. En el ensayo de simulación, la eventual inhibición se manifiesta en que la diferencia en carbono orgánico disuelto (COD) o en demanda química de oxígeno (DQO) entre el efluente del recipiente de ensayo y el del recipiente de control es mayor que el COD añadido como sustancia problema. Dicho de otra manera, el porcentaje de eliminación de COD [y de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), de demanda química de oxígeno (DQO) y/o de NH_4^+] del medio orgánico en tratamiento se ve reducido por la presencia de la sustancia problema. Si ocurre esto, es necesario repetir el ensayo reduciendo la concentración de la sustancia problema hasta que se alcance un nivel al que no se produzca inhibición, y quizás reduciendo aún más la concentración hasta que la sustancia problema sea biodegradada. Sin embargo, si la sustancia problema (o el agua residual) tiene efectos negativos sobre el proceso a todas las concentraciones ensayadas, se puede deducir que la sustancia es difícil, o incluso imposible, de tratar biológicamente, pero puede merecer la pena repetir el ensayo con lodo activado procedente de otra fuente o someter el lodo a una aclimatación más gradual.
3. Inversamente, si la sustancia problema se bioelimina al primer intento en el ensayo de simulación, debe aumentarse su concentración cuando se necesite saber si esta sustancia puede ser inhibidora.
4. Al tratar de determinar el grado de inhibición, ha de tenerse presente que puede cambiar la población del lodo activado, de forma que con el tiempo los microorganismos pueden desarrollar tolerancia frente a una sustancia inhibidora.
5. Cálculo del grado de inhibición:

Los porcentajes generales de eliminación R_o de DBO, COD, DQO, etc., de las unidades de ensayo y de control pueden calcularse con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_o = 100 (I - E)/I \%$$

donde:

I = concentración de DBO, COD, DQO, etc., en los afluentes de los recipientes de ensayo o de control (mg/l)

E = concentraciones en los efluentes respectivos (mg/l)

Es necesario corregir I y E para tener en cuenta el COD debido a la sustancia problema en las unidades de ensayo; en caso contrario, serán incorrectos los cálculos del porcentaje de inhibición.

El grado de inhibición debido a la presencia de la sustancia problema puede calcularse con ayuda de la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = 100 (R_c - R_t)/R_c$$

donde:

R_c = porcentaje de eliminación en los recipientes de control

R_t = porcentaje de eliminación en los recipientes de ensayo

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Reynolds L *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere* 16: 2259.
- (2) Capítulo C.11 del presente anexo. Biodegradación — Lodo activado: Prueba de inhibición de la respiración.
- (3) ISO 8192 (2007): Calidad del agua — Ensayo de inhibición del consumo de oxígeno por lodos activados por oxidación del carbono y del amonio.
- (4) ISO 15522 (1999) Calidad del agua — Determinación del efecto inhibidor de los componentes del agua sobre los microorganismos de los lodos activados.

Apéndice 5

Sustancias problema poco hidrosolubles — sustancias volátiles**Sustancias poco hidrosolubles**

Parece que se han publicado pocos informes sobre la posibilidad de someter las sustancias poco hidrosolubles e insolubles a ensayos de simulación del tratamiento de las aguas residuales (1) (2) (3).

No hay un solo método de dispersión de la sustancia problema que pueda aplicarse a todas las sustancias insolubles. Parece que dos de los cuatro tipos de métodos descritos en la norma ISO 10634 (4) pueden ser adecuados para intentar dispersar las sustancias problema para el ensayo de simulación; consisten en el uso de emulgentes y de energía de ultrasonidos. Hay que determinar la estabilidad de la dispersión resultante a lo largo de períodos de al menos 24 h. La dispersión estabilizada de forma adecuada en un depósito con agitación constante (punto 38) se pasa al tanque de aireación aparte del agua residual doméstica (o sintética).

Si las dispersiones son estables, investiguese cómo puede determinarse la sustancia problema en la forma dispersa. Resulta poco probable que el COD sea adecuado, por lo que debería establecerse un método analítico específico para la sustancia problema que pueda aplicarse a los efluentes, a los sólidos del efluente y al lodo activado. Entonces se determinaría el destino de la sustancia problema en la simulación del proceso del lodo activado, tanto en la fase líquida como en la sólida. Por tanto, se establecería un "balance de masas" para decidir si la sustancia problema se ha degradado. Sin embargo, de esta forma se indicaría solo la biodegradación primaria. Debe intentarse demostrar la biodegradación final mediante un ensayo de respirometría (capítulo C.4-C, F o D del presente anexo) (5) utilizando como inóculo lodo expuesto a la sustancia problema en el ensayo de simulación.

Sustancias volátiles

La aplicación de simulaciones de la depuración de agua residual a las sustancias volátiles es controvertida y problemática. Igual que en el caso de las sustancias poco hidrosolubles, se encuentran muy pocos informes publicados sobre ensayos de simulación de sustancias volátiles. Se adapta un tipo convencional de aparato de mezcla completa sellando los tanques de aireación y de sedimentación, midiendo y controlando el flujo de aire con caudalímetros y pasando el gas de salida por trampas para recoger la materia orgánica volátil. En ciertos casos se utiliza una bomba de vacío para extraer el gas de salida a través de una trampa "fria" o una trampa de purga que contenga Tenax y gel de sílice para efectuar después análisis cromatográficos de gases. La sustancia problema presente en la trampa puede determinarse analíticamente.

El ensayo se lleva a cabo en dos partes. En primer lugar se hacen funcionar las unidades sin lodo pero bombeando al tanque de aireación el agua residual sintética más la sustancia problema. Se toman muestras del afluente, del efluente y del gas de salida, y se analizan para determinar su contenido en sustancia problema durante varios días. A partir de los datos obtenidos, es posible calcular el porcentaje (R_{vs}) de sustancia problema eliminado del sistema.

A continuación se efectúa el ensayo biológico normal (con lodo), en condiciones de funcionamiento idénticas a las del estudio de eliminación. También se toman mediciones del COD o de la DQO para comprobar que las unidades funcionan de forma eficiente. Se efectúan análisis ocasionales para determinar la presencia de sustancia problema en el afluente, en el efluente y en el gas de salida de la primera parte del ensayo; tras la aclimatación se efectúan análisis con más frecuencia. También aquí es posible calcular, a partir de los datos del estado de equilibrio, el porcentaje de eliminación de la sustancia problema a partir de la fase líquida mediante todos los procesos (R_T) (físicos y biológicos), así como la proporción (R_V) eliminada del sistema.

Cálculo

a) En el ensayo no biológico, es posible calcular el porcentaje (R_{VP}) de sustancia problema eliminado del sistema con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

donde:

R_{VP} = eliminación de la sustancia problema por volatilización (%),

S_{VP} = sustancia problema recogida en la trampa, expresada en concentración equivalente de la fase líquida (mg/l),

S_{IP} = concentración de la sustancia problema en el afluente (mg/l).

b) En el ensayo biológico, es posible calcular el porcentaje (R_V) de sustancia problema eliminado del sistema con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

donde:

R_V = eliminación de la sustancia problema por volatilización en el ensayo biológico (%),

S_V = sustancia problema recogida en la trampa en el ensayo biológico, expresada en concentración equivalente del afluente líquido (mg/l),

S_I = concentración de la sustancia problema en el afluente (mg/l).

- c) En el ensayo biológico, el porcentaje de sustancia problema eliminado por todos los procesos viene dado por la fórmula siguiente:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

donde:

S_E = concentración de la sustancia problema en el efluente (líquido) (mg/l).

- d) Así pues, el porcentaje (R_{BA}) eliminado por biodegradación más adsorción puede calcularse con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Deben llevarse a cabo ensayos separados para determinar si la sustancia problema se adsorbe; en caso afirmativo, es posible aplicar otra corrección más.

- e) La comparación entre la proporción de sustancia problema eliminada de los sistemas de ensayo biológico (R_V) y no biológico (R_{VP}) indica el efecto general que ha tenido el tratamiento biológico sobre la emisión de la sustancia problema a la atmósfera.

Ejemplo: Benceno

Tiempo de retención del lodo = 4 días

Aqua residual sintética; tiempo de retención = 8 h

$$S_{IP} = S_I = 150 \text{ mg/l}$$

$$S_{VP} = 150 \text{ mg/l} (S_{EP} = 0)$$

$$S_V = 22,5 \text{ mg/l}$$

$$S_E = 50 \text{ } \mu\text{g/l}$$

Así pues,

$$R_{VP} = 100 \%, R_V = 15 \%$$

$$R_T = 100 \% \text{ y } R_{BA} = 85 \text{ \%}.$$

Se deduce que el benceno no es adsorbido por el lodo.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.
- (2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
- (3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- (4) ISO 10634 (1995) Calidad del agua. Líneas directrices para la preparación y tratamiento de los compuestos orgánicos poco solubles en agua para la subsecuente evaluación de su biodegradabilidad en medio acuoso.
- (5) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil".

Apéndice 6

Efectos del tiempo de retención del lodo (TRL) para el tratamiento de las sustancias

INTRODUCCIÓN

1. El método descrito en el texto principal se ideó para determinar si las sustancias objeto del ensayo (generalmente, aquellas de las que se sabe que son intrínsecamente biodegradables, pero no fácilmente biodegradables) pueden biodegradarse dentro de los límites impuestos en las depuradoras de aguas residuales. Los resultados se expresan en términos de porcentaje de eliminación y de porcentaje de biodegradación. Las condiciones de funcionamiento de las unidades de lodo activado y la elección del afluente permiten variaciones bastante amplias en la concentración de la sustancia problema en el efluente. Los ensayos se efectúan a una sola concentración nominal o a un solo tiempo nominal de retención del lodo (TRL) y los regímenes de retirada de lodo descritos pueden hacer que el valor del TRL varíe considerablemente tanto de un día a otro como a lo largo de un mismo día.
2. En esta variante (1) (2), el TRL se controla dentro de unos límites mucho más estrechos durante la totalidad de cada período de 24 h (igual que sucede a gran escala), lo que hace que la concentración en los efluentes sea más constante. Se recomienda utilizar agua residual doméstica porque da unos porcentajes de eliminación más constantes y elevados. Asimismo, se investigan los efectos de una serie de valores del TRL y es posible determinar en un estudio más detallado los efectos de una serie de temperaturas sobre la concentración en el efluente.
3. No hay acuerdo general sobre qué modelos cinéticos son aplicables cuando se biodegradan sustancias en las condiciones de la depuración de aguas residuales. Se eligió el modelo de Monod de crecimiento bacteriano y de utilización del sustrato (1) (2) para aplicarlo a los datos recogidos, ya que el método estaba destinado a aplicarse solo a las sustancias producidas en grandes cantidades, lo que lleva a concentraciones superiores a 1 mg/l en las aguas residuales. La validez del modelo simplificado y de las suposiciones aceptadas se estableció utilizando una serie de etoxilatos de alcohol con diversos grados de biodegradabilidad primaria (2) (3).

Nota: Esta variante del método sigue muy de cerca el grueso del texto del método de ensayo C.10-A, y a continuación se indican solo los detalles en que difiere.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

4. Se utilizan depósitos porosos de lodo activado, diseñados para facilitar la retirada (casi) continua de mezcla líquida para permitir un control muy preciso del tiempo de retención del lodo (TRL, o ϑ), en modo sin acoplamiento con una serie de TRL y, de forma optativa, con una serie de temperaturas. El tiempo de retención suele ser de 2 a 10 días y la temperatura varía entre 5 y 20 °C. Se introducen en las unidades, por separado, el agua residual, preferentemente de tipo doméstico, y la solución de la sustancia problema, a un caudal que permita alcanzar el tiempo deseado de retención del agua residual (de 3 a 6 horas) y la concentración deseada de sustancia problema en el afluente. Con fines comparativos, se hacen funcionar en paralelo unidades de control sin sustancia problema.
5. Pueden utilizarse otros tipos de aparatos, pero debe ponerse mucha atención para velar por que se consiga un buen control del TRL. Por ejemplo, cuando se utilicen instalaciones que incorporen un sedimentador, puede ser necesario tener en cuenta la pérdida de sólidos a través del efluente de la depuradora. Por otra parte, deben tomarse precauciones especiales para evitar errores debidos a la variación en la cantidad de lodo presente en el sedimentador.
6. Las unidades se hacen funcionar bajo cada conjunto seleccionado de condiciones y, una vez alcanzado el equilibrio, se obtienen a lo largo de unas tres semanas las concentraciones medias de la sustancia problema en el estado de equilibrio en los efluentes y, de forma optativa, los valores de COD. Además de evaluar el porcentaje de eliminación de la sustancia problema y, opcionalmente, del COD, debe expresarse de forma gráfica la relación entre las condiciones de funcionamiento de la instalación y la concentración en el efluente. A partir de aquí pueden calcularse constantes cinéticas orientativas y es posible predecir bajo qué condiciones podrá depurarse la sustancia problema.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

7. Son aplicables los puntos 12 y 13 del capítulo C.10-A.

UMBRALES

8. Son aplicables los puntos 14 y 15 del capítulo C.10-A.

SUSTANCIA DE REFERENCIA

9. Es aplicable el punto 16 del capítulo C.10-A.

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

10. Son aplicables los puntos 17 y 18 del capítulo C.10-A.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Equipo

11. Una unidad adecuada es la constituida por el sistema del depósito poroso modificado (apéndice 6.1). Consiste en un recipiente interior (o revestimiento) hecho de polipropileno poroso de 3,2 mm de espesor y un diámetro de poro de unos 90 µm, con la junta soldada a tope (de esta manera, la unidad es más sólida que la descrita en el punto 21 del presente capítulo, C.10 A). El revestimiento se introduce en un recipiente exterior de polietileno impermeable, que consiste en dos partes: una base circular en la que se perforan agujeros para alojar dos tubos de aire y un tubo de retirada de lodo, y un cilindro superior que se atornilla a la base y que tiene una salida situada de forma que pase un volumen conocido (3 l) al recipiente del depósito poroso. Uno de los tubos de aire está provisto de una piedra difusora y el otro tiene el extremo abierto y está colocado en ángulo recto respecto a la piedra del depósito. Este sistema produce la turbulencia necesaria para garantizar que el contenido del depósito se mezcla completamente, y que la concentración de oxígeno disuelto es > 2 mg/l.
12. Se mantiene el número adecuado de unidades a una temperatura controlada en el rango de 5 a 20 °C (± 1 °C), bien en baño de agua o bien en salas de temperatura constante. Se requieren bombas que introduzcan en los recipientes de aireación la solución de la sustancia problema y el lodo sedimentado, al caudal necesario (0-1,0 ml/min y 0-25 ml/min, respectivamente), y una tercera bomba que elimine el lodo residual de los recipientes de aireación. El caudal necesario, que debe ser muy bajo, de lodo residual se consigue con una bomba regulada a un caudal superior y que funcione de forma intermitente por medio de un temporizador que la active, por ejemplo, durante 10 s cada minuto, si el caudal de la bomba es de 3 ml/min, lo que da un caudal de retirada de lodo de 0,5 ml/min.

Equipo de filtración o centrífuga

13. Es aplicable el punto 23 del capítulo C10-A.

Equipo analítico

14. Es aplicable el punto 24 del capítulo C.10-A.

Aqua

15. Son aplicables los puntos 25 y 26 del capítulo C.10-A.

Medio orgánico

16. Es aplicable el punto 27 del capítulo C.10-A.

Aqua residual sintética

17. Es aplicable el punto 28 del capítulo C.10-A.

Aqua residual doméstica

18. Es aplicable el punto 29 del capítulo C.10-A.

Lodo activado

19. Es aplicable el punto 30 del capítulo C10-A.

Soluciones madre de sustancia problema

20. Son aplicables los puntos 31 y 32 del capítulo C.10-A.

PROCEDIMIENTO

Preparación del inóculo

21. Es aplicable solamente el punto 34 del capítulo C.10-A. Utilícese lodo activado (con una concentración en torno a 2,5 g/l).

Número de unidades de ensayo

22. Para un ensayo sencillo, es decir, para medir el porcentaje de eliminación, solo se necesita un único TRL, pero para conseguir los datos necesarios para calcular las constantes cinéticas orientativas hacen falta 4 o 5 valores de TRL. Generalmente se eligen valores de entre 2 y 10 días. En la práctica, es conveniente efectuar el ensayo con 4 o 5 TRL simultáneamente a una única temperatura; en estudios ampliados se utilizan los mismos valores de TRL, o quizás una

gama diferente de valores, pero a otras temperaturas en el rango de 5 a 20 °C. Para la degradación primaria (uso principal), normalmente solo es necesaria una unidad por conjunto de condiciones. Sin embargo, para estudiar la biodegradabilidad final hay que disponer de una unidad de control, con cada conjunto de condiciones, que reciba el agua residual pero no la sustancia problema. Si se piensa que la sustancia problema se encuentra en el agua residual utilizada, será necesario utilizar unidades de control cuando se haga la evaluación de la biodegradación primaria, y aplicar las correcciones pertinentes en los cálculos.

Introducción del medio orgánico y de la sustancia problema

23. Aplíquense los puntos 36 a 39 del capítulo C.10-A, pero obsérvese que la solución de sustancia problema se introduce aparte y que se utilizan diversas proporciones de retirada de lodo. Debe procederse a medir y ajustar, en caso necesario, en una banda de $\pm 10\%$, los caudales de los afluentes, efluentes y lodo retirado, con frecuencia, por ejemplo, dos veces al día. Si se encuentran dificultades en los métodos analíticos cuando se utiliza agua residual doméstica, efectúese el ensayo con agua residual sintética, pero asegurándose de que los medios diferentes proporcionan datos cinéticos comparables.

Manipulación de las unidades de lodo activado

24. Son aplicables los puntos 40 a 43 del capítulo C.10-A, pero hay que controlar el TRL solamente por medio de la retirada "constante" de lodo.

Muestreo y análisis

25. Son aplicables los puntos 44 a 50 del capítulo C.10-A, salvo que aquí debe determinarse la concentración de la sustancia problema y es opcional la determinación del COD; no debe utilizarse la DQO.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

26. Son aplicables los puntos 52 a 54 del capítulo C.10-A.

Expresión de los resultados del ensayo

27. Son aplicables los puntos 56 a 62 del capítulo C.10-A.

Cálculo de las constantes cinéticas

28. Es más realista indicar la concentración media de la sustancia problema en el estado de equilibrio en el efluente y describir cómo varía en función de las condiciones de funcionamiento de la instalación, en lugar de indicar el porcentaje de biodegradación primaria. Puede hacerse atendiendo a la ecuación (6) del apéndice 6.2, con la que se pueden obtener valores de K_S , μ_m y ϑ_{SC} , que es el tiempo crítico de retención de lodo.

[Otra posibilidad consiste en obtener valores aproximados de K_S y μ_m utilizando un sencillo programa informático para ajustar a los valores experimentales obtenidos la curva teórica calculada a partir de la ecuación 2 (apéndice 6.2). Aunque las eventuales soluciones dadas no serán únicas, puede obtenerse una aproximación razonable de K_S y μ_m].

Variabilidad de los resultados

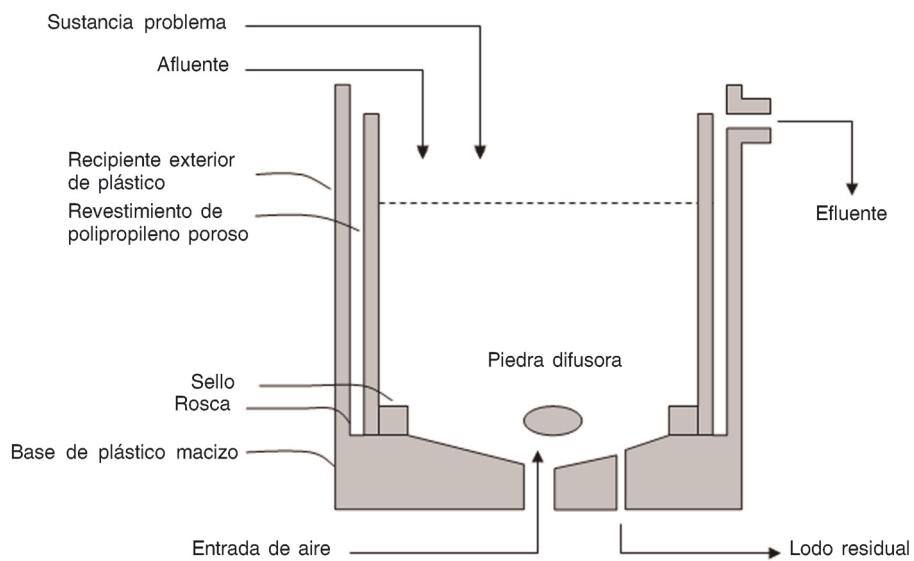
29. Es una experiencia común obtener valores variables de los parámetros cinéticos para las distintas sustancias. Se piensa que en los valores resultantes influyen mucho las condiciones en las que se ha formado el lodo, así como las condiciones reinantes durante el ensayo efectuado (como en el punto 5 y en otros ensayos). Grady *et al.* (4) han discutido un aspecto de esta variabilidad y han sugerido que los términos "existente" e "intrínseca" deben aplicarse a dos situaciones extremas que representan los límites del estado fisiológico que un cultivo puede alcanzar durante un experimento cinético. Si no se permite que cambie el estado durante el ensayo, los valores de los parámetros cinéticos reflejan las condiciones del ambiente del que se han tomado los microorganismos; estos valores se denominan "existentes" o presentes en el momento. Al otro extremo, si las condiciones del ensayo son tales que permiten el pleno desarrollo del sistema de síntesis de proteínas y así alcanzar la tasa de crecimiento más elevada posible, los parámetros cinéticos obtenidos se denominan "intrínsecos", y solo dependen de la naturaleza del sustrato y de los tipos de bacterias del cultivo. Como referencia, se obtendrán valores existentes manteniendo baja la proporción de concentración del sustrato respecto a los microorganismos competentes (S_0/X_0), por ejemplo 0,025, y los valores intrínsecos aparecen cuando la proporción es elevada, es decir, de al menos 20. En ambos casos, S_0 debe igualar o superar al valor pertinente de K_S , la constante de semisaturación.
30. En un reciente taller de la SETAC (5) se discutieron la variabilidad y otras facetas de la cinética de la biodegradación. De tales estudios, tanto de los ya publicados como de los que aún están en fase de proyecto, debe obtenerse una visión más clara de la cinética de las depuradoras, a fin de permitir una mejor interpretación de los datos disponibles, y para sugerir mejoras de los futuros métodos de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornadas Com. Español. Deterg.: 33-48.
- (2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.
- (3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.
- (4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.
- (5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feijel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

Apéndice 6.1

Depósito poroso con control del TRL



Apéndice 6.2

Cálculo de las constantes cinéticas

1. Aceptando que se aplica la cinética de Monod y considerando un balance de masas de sólidos activos y de sustrato en todo el sistema de lodo activado (1), pueden obtenerse las siguientes expresiones del estado de equilibrio:

$$\frac{1}{\vartheta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

o

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \vartheta_s)}{\vartheta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

donde:

S_1 = concentración de sustrato en el efluente (mg/l)

K_s = constante de semisaturación, concentración a la que $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = tasa de crecimiento específico (d^{-1})

μ_m = valor máximo de μ_m (d^{-1})

K_d = tasa de degradación específica de los sólidos activos (d^{-1})

ϑ_s = tiempo medio de retención del lodo, TRL (d)

Del examen de esta ecuación se deducen las conclusiones siguientes:

i) la concentración del efluente es independiente de la del afluente (S_0); por tanto, el porcentaje de biodegradación varía con la concentración del afluente, S_0 ,

ii) el único parámetro de control de la instalación que afecta a S_1 es el tiempo de retención del lodo, ϑ_s ,

iii) para una concentración dada en el afluente, S_0 , habrá un tiempo crítico de retención del lodo tal que:

$$\frac{1}{\vartheta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

donde:

ϑ_{SC} = tiempo crítico de retención del lodo, por debajo del cual los microorganismos competentes serán arrastrados fuera de la instalación,

iv) dado que los demás parámetros de la ecuación (2) están asociados con la cinética de crecimiento, es probable que la temperatura afecte al nivel del sustrato del efluente y a la edad crítica del lodo, es decir, el tiempo de retención del lodo necesario para obtener cierto grado de depuración aumentará según descienda la temperatura.

2. A partir del balance de masas de sólidos en el sistema del depósito poroso, y aceptando que la concentración de sólidos en el efluente de la instalación, X_2 , es baja respecto a la del recipiente de aireación, X_1 , el tiempo de retención del lodo es:

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

y

$$\vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

donde:

V = volumen del recipiente de aireación (l)

X_1 = concentración de sólidos en el recipiente de aireación (mg/l)

X_2 = concentración de sólidos en el efluente (mg/l)

Q_0 = caudal del afluente (l/d)

Q_1 = caudal del lodo residual (l/d).

Así pues, es posible fijar el tiempo de retención del lodo a cualquier valor preseleccionado mediante el control del caudal del lodo residual, Q_1 .

Conclusiones:

3. En consecuencia, el objetivo principal del ensayo consiste en poder prever la concentración del efluente y, por tanto, los niveles de sustancia problema en las aguas receptoras.
4. Mediante la representación gráfica de S_1 frente a ϑ_s , a veces puede evaluarse fácilmente el tiempo crítico de retención del lodo, ϑ_{SC} ; véase por ejemplo la curva 3 de la figura 1. Cuando esto no es posible, se puede calcular ϑ_{SC} , junto con los valores aproximados de μ_m y K_s , representando S_1 frente a $S_1 \cdot \vartheta_s$.

Una reordenación de la ecuación (1) da el resultado siguiente:

$$\frac{S_1 \cdot \vartheta_s}{1 + \vartheta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

Si K_d es pequeña, entonces $1 + \vartheta_s \cdot K_d \sim 1$ y [5] se convierte en lo siguiente:

$$S_1 \cdot \vartheta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

Así pues, la gráfica deberá ser una línea recta (véase la figura 2) de pendiente $1/\mu_m$ y ordenada en el origen K_s/μ_m ; también $\vartheta_s \sim 1/\mu_m$.

Figura 1

Tres temperaturas; cinco TRL

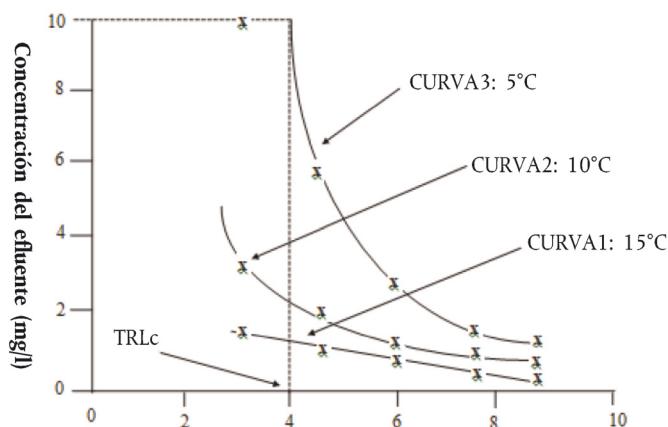
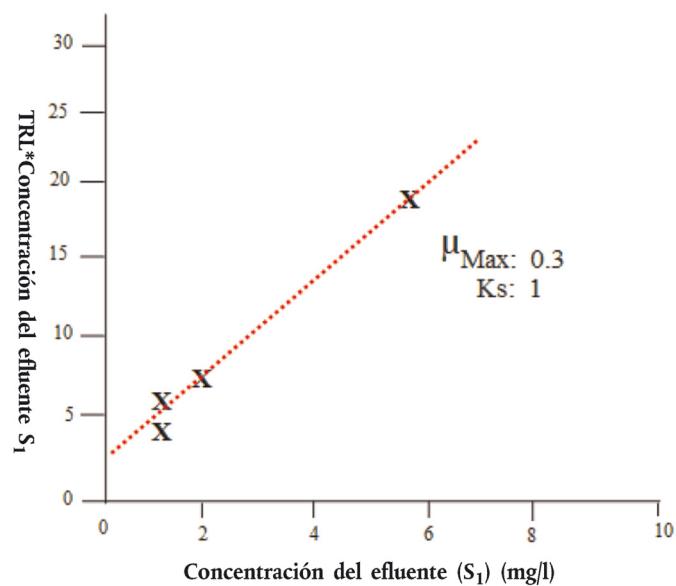


Figura 2

Recta de regresión TRL · S_1 frente a S_1 a $T = 5^\circ\text{C}$ 

Glosario:

TRL

Concentración del efluente

Apéndice 7

ENSAYO CON UN RANGO DE CONCENTRACIONES BAJAS (µg/l)

1. En el medio acuático suele haber muchas sustancias presentes, incluso en las aguas residuales, a concentraciones muy bajas (µg/l). A tales concentraciones, no es probable que sirvan de sustratos primarios que permitan el crecimiento, pero es más probable que se degraden como sustratos secundarios, no responsables del crecimiento, en paralelo con otras diversas sustancias carbonadas presentes de forma natural. Por tanto, la degradación de tales sustancias no se ajustará al modelo descrito en el apéndice 6. Hay muchos modelos que podrían aplicarse y, bajo las condiciones reinantes en los sistemas de depuración de aguas residuales, podrían estar operativos simultáneamente más de uno. Es mucha la investigación que ha de hacerse todavía para poder resolver este problema.
2. Mientras tanto, puede seguirse el procedimiento indicado en el texto principal (capítulo C.10-A), pero solo en relación con la biodegradabilidad primaria, utilizando concentraciones suficientemente bajas (< 100 µg/l) y un procedimiento analítico validado. Puede calcularse el porcentaje de biodegradación (véase el punto 54 del método de ensayo) siempre que se tengan en cuenta los eventuales procesos abióticos (adsorción, volatilidad, etc.). Puede citarse como ejemplo el estudio de Nyholm y sus asociados (1) (2), con un ciclo de 4 h en un sistema de llenado y recogida. Calcularon constantes de pseudoprimer orden respecto a 5 sustancias añadidas a un agua residual a concentraciones entre 5 y 100 µg/l. Para la biodegradabilidad final, pueden utilizarse sustancias marcadas con ¹⁴C. Queda fuera del ámbito del presente método de ensayo recoger una descripción de esta posibilidad, ya que por ahora no se dispone de procedimientos aprobados, aunque un método propuesto para la norma ISO 14592 (3) contiene orientaciones sobre el uso de sustancias marcadas con ¹⁴C.

Prueba LASC

3. Después se propuso un ensayo más simple en dos etapas (4) (5) (6); el método del lodo activado semicontinuo (LASC) va seguido por ensayos cinéticos a corto plazo con muestras tomadas de las unidades de LASC. El sistema LASC funciona con tasas conocidas de retirada de lodo (a diferencia del método de ensayo C.12 original) y se alimenta con agua residual sintética de la OCDE modificada o con agua residual doméstica. El agua residual sintética se modificó (debido a que el valor de pH variaba y a que la capacidad de sedimentación del lodo era baja) por la adición de fosfato como amortiguador, extracto de levadura, cloruro de hierro (III) y sales de oligoelementos, y se aumentó su DQO hasta alrededor de 750 mg/l por la elevación de la concentración de peptona y extracto de carne. Las unidades funcionaban en ciclos de 24 h: aireación durante 23 h, retirada del lodo, sedimentación, retirada del sobrenadante (efluente) seguida de la adición del agua residual sintética más la sustancia problema, hasta 100 µg/l, (es decir, a la misma concentración aproximadamente que en el ensayo a corto plazo). Una vez por semana, el 10 % del lodo total se sustituye con lodo nuevo a fin de mantener la población microbiana en equilibrio.
4. Se miden las concentraciones de la sustancia problema al inicio y al final de la aireación, y el ensayo prosigue hasta que se estabilice la eliminación de la sustancia problema; esto puede necesitar desde una semana hasta varios meses.

Ensayo a corto plazo

5. Se lleva a cabo un ensayo a corto plazo (por ejemplo, 8 horas) para determinar la constante cinética de velocidad de (pseudo) primer orden de la degradación de la sustancia problema en lodo activado de orígenes e históricos conocidos pero diferentes. En particular, se toman muestras de lodo de los reactores LASC —al final de un período de aireación cuando la concentración de sustrato orgánico es baja— durante la realización de un experimento de aclimatación (puntos 3, 4). También puede tomarse lodo de una unidad paralela de LASC no expuesta a la sustancia problema, con fines comparativos. Se airean las mezclas de lodo y de sustancia problema añadida a dos o más concentraciones en el rango de 1-50 µg/l, sin adición de agua residual sintética ni otro sustrato orgánico. Se determina el contenido de sustancia problema que queda en disolución a intervalos periódicos como, por ejemplo, cada hora, en función de la degradabilidad de la sustancia, durante no más de 24 h. Se centrifugan las muestras antes de someterlas a un análisis adecuado.

Cálculos

6. Los datos de las unidades LASC se utilizan para calcular el porcentaje de eliminación de la sustancia problema (punto 54). Asimismo es posible calcular la constante media de velocidad, K_1 , (normalizada para tener en cuenta la concentración de sólidos en suspensión) con ayuda de la ecuación siguiente:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g h)$$

donde:

t = tiempo de aireación (23 h)

C_e = concentración al final del período de aireación (µg/l)

C_i = concentración al inicio de la aireación (µg/l)

SS = concentración de sólidos en el lodo activado (mg/l)

7. En el ensayo a corto plazo, se representa frente al tiempo el log del porcentaje de la concentración restante, y la pendiente de la parte inicial (degradación del 10-50 %) de la gráfica es equivalente a K_1 , la constante de (pseudo) primer orden. La constante se normaliza respecto a la concentración de sólidos en el lodo dividiendo la pendiente por la concentración de sólidos en el lodo. El resultado comunicado debe incluir asimismo datos de las concentraciones iniciales de la sustancia problema y de los sólidos en suspensión, tiempo de retención del lodo, carga y origen del lodo, así como datos de la eventual exposición previa a la sustancia problema.

Variabilidad de los resultados

8. En un reciente taller de la SETAC (7) se discutieron la variabilidad y otras facetas de la cinética de la biodegradación. De tales estudios, tanto de los ya publicados como de los que aún están en fase de proyecto, debe obtenerse una visión más clara de la cinética de las depuradoras, a fin de permitir una mejor interpretación de los datos disponibles, y para sugerir mejoras de los futuros métodos de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Damboorg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. *Biodegradability*. *Wat. Res.* 26: 339-353.
- (2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: *Sorption*. *Wat. Res.* 27: 1505-1510.
- (3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia de compuestos orgánicos a baja concentración en el agua.
- (4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and $\mu\text{g/l}$ range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851-864.
- (5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low ($\mu\text{g/l}$ range) and estándar (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.
- (7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

C.10-B: Biopelículas

INTRODUCCIÓN

1. Los ensayos de simulación se aplican normalmente a sustancias que no han superado un ensayo exploratorio de la biodegradabilidad fácil [(capítulo C.4-A a F del presente anexo (9)], pero sí han pasado un ensayo de biodegradabilidad intrínseca. Con carácter excepcional, también se aplican los ensayos de simulación a cualquier sustancia de la que se requiera más información, especialmente sustancias comercializadas en grandes cantidades, y normalmente se aplica el ensayo del lodo activado (C.10-A). Sin embargo, en ciertas circunstancias, es necesario conseguir información específica relativa al comportamiento de una sustancia ante métodos de depuración de aguas residuales con participación de biopelículas: filtros percoladores o por goteo, biodiscos giratorios, lechos fluidizados. Se han diseñado diversos dispositivos para satisfacer esta necesidad.
2. Gerike *et al.* (1) han utilizado grandes filtros por goteo de laboratorio, en modo de acoplamiento. Estos filtros ocupaban mucho espacio y necesitaban volúmenes relativamente grandes de agua residual natural o sintética. Truesdale *et al.* (2) han descrito filtros más pequeños (6 pies \times 6 pulgadas de diámetro) que aceptaban aguas residuales naturales exentas de agentes tensioactivos, pero seguían necesitando volúmenes bastante grandes. Para que se formara una biopelícula "madura" hacían falta hasta 14 semanas, y se necesitaba un plazo adicional de 4-8 semanas tras la primera introducción del agente tensioactivo antes de que se realizara la aclimatación.
3. Baumann *et al.* (3) han desarrollado un filtro mucho más pequeño utilizando "lana" de poliéster previamente remojada en lodo activado como medio inerte de soporte de la biopelícula. Se utilizaba como única fuente de carbono la sustancia problema, y se evaluaba la biodegradabilidad a partir de mediciones del carbono orgánico disuelto (COD) en el afluente y en el efluente, y de la cantidad de CO_2 en el gas de salida.
4. Gloyne *et al.* (4), aplicando un enfoque bastante diferente, inventaron el reactor tubular giratorio. Sobre la superficie interna del tubo giratorio se cultivaba una biopelícula sobre un área conocida pasando el afluente introducido por la parte superior del tubo, que se encontraba inclinado ligeramente respecto a la horizontal. Este reactor se ha utilizado para estudiar la biodegradabilidad de los tensioactivos (5), y también para investigar el espesor óptimo de la biopelícula y la difusión a través de la película (6). Estos últimos autores han seguido desarrollando el reactor, incluso modificándolo para que pueda determinarse el CO_2 en el gas de salida.

5. El Standing Committee of Analysts (Comité Permanente de Analistas del Reino Unido) ha adoptado el reactor tubular giratorio como método normal para evaluar tanto la biodegradabilidad de las sustancias (7) como la posibilidad de tratar las aguas residuales y su toxicidad (8). El método aquí descrito reúne las ventajas de ser simple, compacto y reproducible y de necesitar un volumen relativamente reducido de medio orgánico.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. A la superficie interna de un tubo inclinado que gira lentamente se aplica agua residual sintética o doméstica, y la sustancia problema, mezclada o sola. En esa superficie interna se forma una capa de microorganismos, similar a las presentes en los medios de los biofiltros. Las condiciones de trabajo del reactor se eligen de manera que permitan la eliminación adecuada de la materia orgánica y, cuando sea necesario, la oxidación del amonio.
7. Se recoge el efluente del tubo y se sedimenta y/o se filtra antes de analizarlo para determinar la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) y/o la de la sustancia problema mediante un método específico. Con fines comparativos, se hacen funcionar en paralelo y bajo las mismas condiciones unidades de control sin sustancia problema. Se acepta que la diferencia entre las concentraciones de COD en los efluentes de las unidades de ensayo y de control se debe a la sustancia problema y a sus metabolitos orgánicos. Para calcular la eliminación de la sustancia problema, se compara esta diferencia con la concentración de la sustancia problema añadida (como COD).
8. Normalmente puede distinguirse la biodegradación de la bioadsorción examinando atentamente la curva de la eliminación frente al tiempo. Generalmente puede confirmarse aplicando el ensayo de biodegradación fácil (consumo de oxígeno o producción de dióxido de carbono) con un inóculo aclimatado, tomado al final del ensayo de los reactores que reciben la sustancia problema.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

9. Es necesario conocer las características de pureza, hidrosolubilidad, volatilidad y adsorción de la sustancia problema para poder interpretar correctamente los resultados.
10. Normalmente no es posible hacer el ensayo con sustancias volátiles y poco solubles, salvo que se adopten precauciones especiales (véase el apéndice 5 del capítulo C.10-A). También debe conocerse la estructura química, o al menos la fórmula empírica, para poder calcular los valores teóricos o comprobar los valores medidos de ciertos parámetros, como la demanda teórica de oxígeno (DTO) o el COD.
11. El disponer de datos sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos (véase el apéndice 4 del capítulo C.10-A) puede ser útil para seleccionar las concentraciones adecuadas para el ensayo y puede ser fundamental para interpretar correctamente los valores bajos de biodegradación.

UMBRALES

12. Originalmente se exigía que la biodegradación primaria de tensioactivos llegara como mínimo al 80 % para poder comercializar la sustancia. Si no se alcanza el valor del 80 %, puede aplicarse este ensayo (confirmatorio) de simulación y el tensioactivo puede comercializarse solamente si se elimina más del 90 % de la sustancia específica. Con las sustancias en general, no se trata de pasar un umbral sino de que el valor de eliminación porcentual pueda utilizarse para calcular aproximadamente la concentración probable en el medio ambiente que deba utilizarse en la evaluación del peligro planteado por las sustancias. En una serie de estudios de sustancias puras, se observó que el porcentaje de eliminación del COD era > 90 % en más de las tres cuartas partes, y > 80 % en más del 90 %, de las sustancias que mostraban un grado significativo de biodegradabilidad.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

13. Para asegurarse de la correcta ejecución del procedimiento experimental, es conveniente someter ocasionalmente a ensayo sustancias de referencia cuyo comportamiento se conozca. Entre esas sustancias se cuentan el ácido adípico, el 2-fenil-fenol, el 1-naftol, el ácido difénico y el ácido 1-naftoíco.

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

14. Un laboratorio del Reino Unido dedujo que la desviación típica relativa era del 3,5 % dentro de un ensayo y del 5 % entre ensayos (7).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Equipo

Reactores tubulares giratorios

15. El dispositivo (véanse las figuras 1 y 2 del apéndice 8) consiste en un banco de tubos acrílicos, cada uno de los cuales mide 30,5 cm de longitud y 5 cm de diámetro interior, apoyado en ruedas con borde de caucho, con un marco metálico de soporte. Cada tubo tiene una pestaña exterior, de unos 0,5 cm de profundidad, para

mantenerlo sobre las ruedas, la superficie interior se ha hecho rugosa con lana de acero basta, y hay una pestaña interior de 0,5 cm de profundidad en el extremo superior (de alimentación) para retener el líquido. Los tubos presentan una inclinación de un grado aproximadamente respecto a la horizontal para conseguir el tiempo de contacto necesario cuando se aplica el medio de ensayo a un tubo limpio. Las ruedas con borde de caucho se hacen girar mediante un motor de velocidad lenta y variable. La temperatura de los tubos está controlada por su instalación en una zona de temperatura constante.

16. Si se encierra cada reactor de tubos dentro de un tubo taponado, ligeramente mayor, y se vela por que las conexiones sean estancas, es posible recoger el CO₂ de salida en una solución alcalina para su medición posterior (6).
17. En un recipiente de almacenamiento de 20 l se pone el suministro de 24 h, para cada tubo, de medio orgánico con la sustancia problema añadida, en su caso (A) (véase la figura 2). Cuando sea necesario, se podrá añadir aparte la solución de la sustancia problema. Cerca del fondo de cada recipiente de almacenamiento hay una salida conectada mediante los tubos adecuados (por ejemplo, de caucho de silicona) a través de una bomba peristáltica a un tubo de alimentación acrílico o de vidrio que se introduce 2-4 cm en el extremo superior (alimentación) del tubo inclinado (C). Se deja que el efluente gotee desde el extremo inferior del tubo inclinado para recogerse en otro recipiente de almacenamiento (D). El efluente se somete a sedimentación o filtración antes de proceder a su análisis.

Equipo de filtración y centrífuga

18. Dispositivo de filtración de muestras con filtros de membrana de porosidad adecuada (diámetro de abertura nominal de 0,45 µm) que adsorban sustancias orgánicas solubles o liberen carbono orgánico en un grado mínimo. Si se utilizan filtros que liberan carbono orgánico, lavarlos cuidadosamente con agua caliente para eliminar el carbono orgánico lixiviante. Otra posibilidad es utilizar una centrifugadora que pueda alcanzar una aceleración de 40 000 m/s².
19. Equipo analítico para determinar:
 - el COD, el carbono orgánico total (COT), o la demanda química de oxígeno (DQO),
 - la sustancia específica (por HPLC, CG, etc.), cuando sea necesario,
 - pH, temperatura, acidez, alcalinidad,
 - amonio, nitrito y nitrato, si los ensayos se efectúan en condiciones de nitrificación.

Agua

20. Agua del grifo, con menos de 3 mg/l de COD.
21. Agua destilada o desionizada, con menos de 2 mg/l de COD.

Medio orgánico

22. Como medio orgánico puede utilizarse agua residual sintética, agua residual doméstica o una mezcla de ambos tipos. Se ha observado que el uso de agua residual doméstica sola suele llevar a un mayor porcentaje de eliminación del COD (en las unidades de lodo activado) y que incluso permite la biodegradación de algunas sustancias que no se biodegradan cuando se utiliza el agua residual sintética de la OCDE. Así pues, se recomienda el uso de agua residual doméstica. Debe medirse la concentración de COD (o de DQO) en cada nuevo lote de medio orgánico. Es necesario conocer la acidez o la alcalinidad del medio orgánico. Es posible que el medio orgánico requiera la adición de un amortiguador adecuado (carbonato de hidrógeno y sodio, o fosfato de hidrógeno y potasio) si es baja su acidez o su alcalinidad, para mantener durante el ensayo un pH de alrededor de 7,5 ± 0,5 en el reactor. Debe decidirse en cada caso la cantidad de amortiguador que ha de añadirse, y en qué momento hacerlo.

Agua residual sintética

23. Disuélvase en cada litro de agua del grifo: peptona, 160 mg; extracto de carne, 110 mg; urea, 30 mg; fosfato de hidrógeno y dipotasio anhidro (K₂HPO₄), 28 mg; cloruro de sodio (NaCl), 7 mg; cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O), 4 mg; sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O), 2 mg. El agua residual sintética de la OCDE es un ejemplo y da una concentración media de COD en el afluente de unos 100 mg/l. También es posible utilizar otras composiciones, con la misma concentración aproximada de COD, que se acerquen más al agua residual real. El agua residual sintética puede elaborarse con agua destilada en forma concentrada y conservarse a alrededor de 1 °C durante una semana como máximo. En el momento en que se necesite, se diluye con agua del grifo. (Este medio no es satisfactorio: la concentración de nitrógeno es muy elevada y el contenido de carbono es relativamente bajo, por ejemplo, pero no se ha sugerido nada mejor, salvo añadir más fosfato como amortiguador y peptona adicional.)

Agua residual doméstica

24. Debe utilizarse agua residual recién decantada, recogida cada día en una depuradora que reciba predominantemente agua residual doméstica. Debe recogerse del canal del rebosadero del tanque de sedimentación primaria, o de la alimentación a la instalación de lodo activado, y encontrarse exenta en gran medida de partículas gruesas. El agua residual puede seguir utilizándose tras guardarse varios días a unos 4 °C, si se demuestra que el COD (o la DQO) no ha descendido de forma significativa (es decir, en menos del 20 %) en ese plazo. A fin de limitar las perturbaciones del sistema, el COD (o la DQO) de cada lote nuevo debe ajustarse a un nivel constante adecuado, antes de utilizarlo, por ejemplo, mediante dilución con agua del grifo.

Lubricante

25. Puede aplicarse glicerol o aceite de oliva para lubricar los rodillos de la bomba peristáltica: ambos productos son adecuados para utilizarse con tubos de caucho de silicona.

Soluciones madre de sustancia problema

26. Con sustancias de solubilidad adecuada, preparar soluciones madre a concentraciones apropiadas (por ejemplo, de 1 a 5 g/l) en agua desionizada, o en la porción mineral del agua residual sintética. Respecto a las sustancias insolubles, véase el apéndice 5 del capítulo C.10-A. Este método no es adecuado para las sustancias volátiles si no se modifican los reactores tubulares (punto 16). Hay que determinar el COD y el COT de la solución madre y repetir las mediciones con cada lote nuevo. Si la diferencia entre el COD y el COT es superior al 20 %, ha de comprobarse la hidrosolubilidad de la sustancia problema. Comparar con los valores nominales el COD o la concentración de la sustancia problema medida por análisis específico de la solución madre, para considerar si la recuperación es suficientemente buena (normalmente puede esperarse > 90 %). Ha de evaluarse, especialmente en el caso de las dispersiones, si el COD puede utilizarse como parámetro analítico o si solo es posible utilizar una técnica analítica específica de la sustancia problema. En el caso de las dispersiones es necesario centrifugar las muestras. Con cada lote nuevo hay que medir el COD, la DQO o la sustancia mediante análisis específico.
27. Determíñese el pH de la solución madre. La presencia de valores extremos indica que la adición de la sustancia puede influir en el pH de lodo activado en el sistema de ensayo. En este caso, haya que neutralizar la solución madre para obtener un pH de $7 \pm 0,5$, utilizando pequeñas cantidades de ácidos o bases inorgánicos, pero evitando la precipitación de la sustancia problema.

PROCEDIMIENTO*Preparación del medio orgánico para su introducción*

28. Hay que asegurarse de que todos los recipientes del afluente y del efluente, así como los tubos que los unen, se limpian a fondo para eliminar la eventual proliferación microbiana, tanto al principio como a lo largo del ensayo.
29. Prepárese el agua residual sintética (punto 23) cada día de nuevo, bien a partir de los sólidos o bien a partir de la solución madre concentrada mediante la dilución adecuada con agua del grifo. Mídase la cantidad necesaria con una probeta y añádase a un recipiente de afluente limpio. También, cuando sea necesario, añádase al agua residual sintética, antes de la dilución, la cantidad necesaria de solución madre de la sustancia problema o de la sustancia de referencia. Si es más conveniente o necesario para evitar pérdidas de la sustancia problema, prepárese una solución diluida aparte de la sustancia problema en un depósito aparte y añádase a los tubos inclinados mediante una bomba dosificadora diferente.
30. Otra posibilidad, preferible, es utilizar agua residual doméstica decantada (punto 24), recogida de nuevo cada día, cuando sea posible.

Funcionamiento de los reactores tubulares giratorios

31. Para la evaluación de una sola sustancia problema, hacen falta dos reactores tubulares idénticos montados en una sala de temperatura constante, normalmente a 22 ± 2 °C.
32. Ajústense las bombas peristálticas para que lleven un caudal de 250 ± 25 ml/h de medio orgánico (sin la sustancia problema) a los tubos inclinados, que giran a 18 ± 2 rpm. Aplíquese el lubricante (punto 25) a los tubos de la bomba al inicio y periódicamente a lo largo del ensayo, para conseguir un funcionamiento adecuado y prolongar la vida de los tubos.
33. Ajústese el ángulo de inclinación de los tubos respecto a la horizontal para conseguir un tiempo de residencia de $125 \pm 12,5$ s de la alimentación en un tubo limpio. Estímese el tiempo de retención añadiendo a la alimentación un marcador no biológico (por ejemplo, NaCl, un colorante inerte): se acepta que el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima en el efluente es el tiempo medio de retención (cuando la película es máxima, el tiempo de retención puede aumentar hasta unos 30 min).
34. Se ha comprobado que estas tasas, velocidades y tiempos proporcionan retiradas adecuadas (> 80 %) del COD (o de la DQO) y producen efluentes nitrificados. La velocidad de flujo debe modificarse si la eliminación es insuficiente o si ha de simularse el comportamiento de una depuradora particular. En este último caso, ajústese la proporción de medio orgánico introducido hasta que el comportamiento del reactor se alinee con el de la depuradora.

Inoculación

35. La inoculación aérea puede ser suficiente para iniciar el crecimiento de los microorganismos cuando se utiliza agua residual sintética; en caso contrario, añádase a la alimentación durante 3 días 1 ml/l de agua residual decantada.

Mediciones

36. A intervalos periódicos, compruébese que las dosis de introducción de material y velocidades de giro se ajustan a los límites requeridos. Asimismo, mídase el pH del efluente, especialmente si se espera que haya nitrificación.

Muestreo y análisis

37. El método, la pauta y la frecuencia del muestreo deben elegirse de manera que se ajusten al propósito del ensayo. Por ejemplo, tómense muestras instantáneas de afluente y de efluente, o bien recójanse muestras a lo largo de un período más largo (por ejemplo, de 3 a 6 h). En el primer período, sin sustancia problema, tómense muestras dos veces por semana. Filtrense las muestras por membrana o centrífuguese a alrededor de 40 000 m/s² durante unos 15 min (punto 18). Puede ser necesario sedimentar las muestras y/o pasarlas por un filtro grueso antes de proceder a la filtración por membrana. Determíñese el COD (o la DQO) al menos por duplicado y, en caso necesario, la DBO y el contenido de amonio y de nitrato/nitrito.
38. Todos los análisis deben efectuarse lo antes posible tras la recogida y preparación de las muestras. Si resulta necesario retrasar un análisis, las muestras deben conservarse a unos 4°C a oscuras, en frascos llenos y bien cerrados. Si es necesario almacenar las muestras durante más de 48 h, hay que conservarlas por congelación, por acidificación o por adición de una sustancia tóxica adecuada [por ejemplo, 20 ml/l de una solución de cloruro de mercurio (II) de 10 g/l]. Hay que verificar que la técnica de conservación no altera los resultados de los análisis.

Período de rodaje

39. En este período, la biopelícula superficial crece hasta alcanzar un espesor óptimo, lo que generalmente necesita unas 2 semanas y no debe superar las 6 semanas. La eliminación de COD (o de DQO) (punto 44) va aumentando hasta alcanzar un valor de meseta. Una vez alcanzada la meseta con un valor similar en ambos tubos, se selecciona uno de ellos como control para el resto del ensayo, durante el cual su comportamiento debe mantenerse constante.

Introducción de la sustancia problema

40. Añádase en este momento la sustancia problema al otro reactor, a la concentración requerida, generalmente de 10 a 20 mg C/l. El control sigue recibiendo solamente el medio orgánico.

Período de aclimatación

41. Continúese haciendo los análisis del COD (o de la DQO) dos veces por semana y, si hay que evaluar la biodegradabilidad primaria, mídase también la concentración de la sustancia problema mediante un análisis específico. Déjese de 1 a 6 semanas (o incluso más en condiciones especiales) una vez añadida por primera vez la sustancia problema, para permitir que se dé la aclimatación. Cuando el porcentaje de eliminación (puntos 43 a 45) alcance el valor máximo, obténganse de 12 a 15 valores válidos en la fase de meseta a lo largo de unas 3 semanas, para evaluar el porcentaje medio de eliminación. Se considera que el ensayo está completado si se alcanza un nivel suficientemente elevado de eliminación. Normalmente, no debe llegarse a una duración del ensayo superior a 12 semanas tras la primera adición de la sustancia problema.

Arranque de la película

42. A intervalos relativamente periódicos, se produce la brusca eliminación de grandes cantidades del excedente de película de los tubos, o "arranque". Para garantizar que esto no afecta a la comparabilidad de los resultados, permítase que los ensayos abarquen al menos dos ciclos completos de crecimiento y de arranque.

DATOS E INFORME**Tratamiento de los resultados**

43. Calcúlese el porcentaje de eliminación de la sustancia problema en términos de COD (o de DQO) respecto a cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_0)]/C_s \%$$

donde:

D_t = porcentaje de eliminación del COD (o de la DQO) al tiempo t ,

C_s = concentración de COD (o DQO) en el afluente debida a la sustancia problema, de preferencia estimada a partir de la concentración en la solución madre y del volumen añadido de esta (mg/l),

E = valores de COD (o DQO) medidos en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l),

E_0 = valores de COD (o DQO) medidos en el efluente de control al tiempo t (mg/l).

Repítase el cálculo con la eventual sustancia de referencia utilizada.

Comportamiento del reactor de control

44. El grado de eliminación del COD (o de la DQO) (D_B) del medio orgánico en los reactores de control es un dato útil para evaluar la actividad de biodegradación de la biopelícula durante el ensayo. Calcúlese el porcentaje de eliminación con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_B = 100 (1 - E_0/C_m) \%$$

donde:

C_m = valores de COD (o de DQO) del medio orgánico en el afluente de control (mg/l).

45. Calcúlese la eliminación (D_{ST}) de la sustancia problema si se mide con un método analítico específico en cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$DST = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

donde:

S_i = concentración medida o, de preferencia, estimada de la sustancia problema en el afluente de ensayo (mg/l),

S_e = concentración medida de la sustancia problema en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l).

Si el método analítico da un valor positivo en el agua residual no modificada equivalente a S_c mg/l, calcúlese el porcentaje de eliminación (D_{SC}) con ayuda de la fórmula siguiente:

$$DSC = 100 (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c) \%$$

Expresión de los resultados del ensayo

46. Represéntese el porcentaje de eliminación D_t y D_{ST} (o D_{SC}), si está disponible, frente al tiempo (véase el apéndice 2 del capítulo C.10 A). Tómese la media (redondeada al número entero más próximo) y la desviación típica de los 12-15 valores de D_T (y de D_{ST} , si se dispone de ellos) obtenidos en la fase de meseta como porcentaje de eliminación de la sustancia problema. De la forma de la curva de eliminación pueden deducirse ciertas conclusiones sobre los procesos de eliminación.

Adsorción

47. Si al inicio del ensayo se observa una elevada eliminación del COD de la sustancia problema, es probable que esta se elimine por adsorción a la biopelícula. Quizá sea posible comprobar este extremo determinando la sustancia problema adsorbida a los sólidos arrancados de la película. No es normal que la eliminación del COD de sustancias adsorbibles se mantenga elevada durante todo el ensayo; normalmente la eliminación es intensa al principio y después va cayendo gradualmente hasta alcanzar un valor de equilibrio. Si, no obstante, la sustancia problema adsorbida pudiera causar de alguna forma la aclimatación de la población microbiana, la eliminación del COD de la sustancia problema aumentaría posteriormente y alcanzaría un elevado nivel de meseta.

Tiempo de latencia

48. Como en los ensayos exploratorios estáticos, muchas sustancias problema requieren una fase de latencia antes de que se produzca la biodegradación plena. En esta fase de latencia, tiene lugar la aclimatación o adaptación de las bacterias competentes, sin que haya apenas eliminación de la sustancia problema; después empieza el crecimiento de estas bacterias. Esta fase termina y se acepta arbitrariamente que comienza la fase de degradación cuando se ha eliminado alrededor del 10 % de la cantidad inicial de sustancia problema (después de tener en cuenta la adsorción, en su caso). La fase de latencia suele ser muy variable y poco reproducible.

Fase de meseta

49. La fase de meseta de una curva de eliminación en un ensayo continuo se define como la fase en que se produce el máximo de degradación. Esta fase debe durar al menos 3 semanas y permitir la medición de unos 12-15 valores válidos.

Grado medio de eliminación de la sustancia problema

50. Calcúlese la media de los valores de eliminación D_t (y D_{st} , cuando se disponga de ellos) de la sustancia problema en la fase de meseta. Redondeado al entero más próximo (1 %), es el grado de eliminación de la sustancia problema. Se recomienda calcular asimismo el intervalo de confianza del 95 % para la media. De forma análoga, calcúlese el grado medio (D_B) de eliminación del medio orgánico en el recipiente de control.

Indicación de la biodegradación

51. Si la sustancia problema no se adsorbe significativamente a la biopelícula y la curva de eliminación tiene la forma típica de una curva de biodegradación con fases de latencia, de degradación y de meseta (puntos 48 y 49), la eliminación medida puede atribuirse con seguridad a la biodegradación. Si ha tenido lugar una eliminación inicial importante, el ensayo de simulación no puede diferenciar entre el proceso de eliminación biológico y el abiótico. En tales casos, y en otros en que haya alguna duda sobre la biodegradación (por ejemplo, si se produce eliminación), se deben analizar en muestras de la película las sustancias problema adsorbidas o efectuar ensayos adicionales estáticos (exploratorios) de la biodegradación, en relación con parámetros que indiquen claramente si se trata de procesos biológicos. Tales ensayos son los métodos de consumo de oxígeno (capítulo C.4-D, E y F del presente anexo) (9) o un ensayo con medición de la producción de CO_2 (capítulo C.4-C del presente anexo) o el método del espacio de cabeza (10); debe utilizarse como inóculo biopelícula preexpuesta del reactor adecuado.
52. Si se han medido tanto la eliminación del COD como la eliminación específica de la sustancia, una diferencia significativa (siendo la primera más baja que la segunda) entre los porcentajes de eliminación indica la presencia en los efluentes de productos orgánicos intermedios que pueden ser más difíciles de degradar; habrá que investigar tales productos.

Validez de los resultados del ensayo

53. Se considera que el ensayo es válido si el grado de eliminación (D_B) del COD (o de la DQO) en las unidades de control es > 80 % tras dos semanas y no se han observado fenómenos inusuales.
54. Si se ha sometido a ensayo una sustancia (de referencia) fácilmente biodegradable, el grado de biodegradación debe ser > 90 % y la diferencia entre los valores de los duplicados no debe superar el 5 %. Si no se cumplen estos dos criterios, revisense los procedimientos experimentales u obténgase agua residual doméstica de otra fuente.
55. Análogamente, las diferencias entre los valores de la biodegradación de unidades duplicadas (en su caso) en que se trate una sustancia problema no deben superar el 5 %. Si no se cumple este criterio pero las eliminaciones son altas, continúese el análisis durante otras tres semanas. Si la eliminación es baja, investigúense los efectos inhibidores de la sustancia problema si no se conocen, y repítase el ensayo con una concentración menor de la sustancia problema, cuando sea posible.

Informe del ensayo

56. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

- Datos de identificación.
- Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas.

Condiciones de ensayo:

- Eventuales modificaciones del sistema de ensayo, especialmente si se han estudiado sustancias insolubles o volátiles.
- Tipo de medio orgánico.
- Proporción y naturaleza de los residuos industriales presentes en las aguas residuales, si se utilizan y conocen.
- Método de inoculación.
- Solución madre de sustancia problema: contenido en COD (carbono orgánico disuelto) y COT (carbono orgánico total), forma de preparación si se trata de una suspensión, concentración o concentraciones usadas y justificación si están fuera de la banda de 10 a 20 mg/l de COD, método de adición, fecha de la primera adición, cambios eventuales en la concentración.

- Tiempo medio de retención hidráulica (sin crecimiento), velocidad de giro del tubo, ángulo aproximado de inclinación, si es posible.
- Detalles del arranque, tiempo e intensidad.
- Temperatura del ensayo y banda.
- Técnicas analíticas empleadas.

Resultados del ensayo:

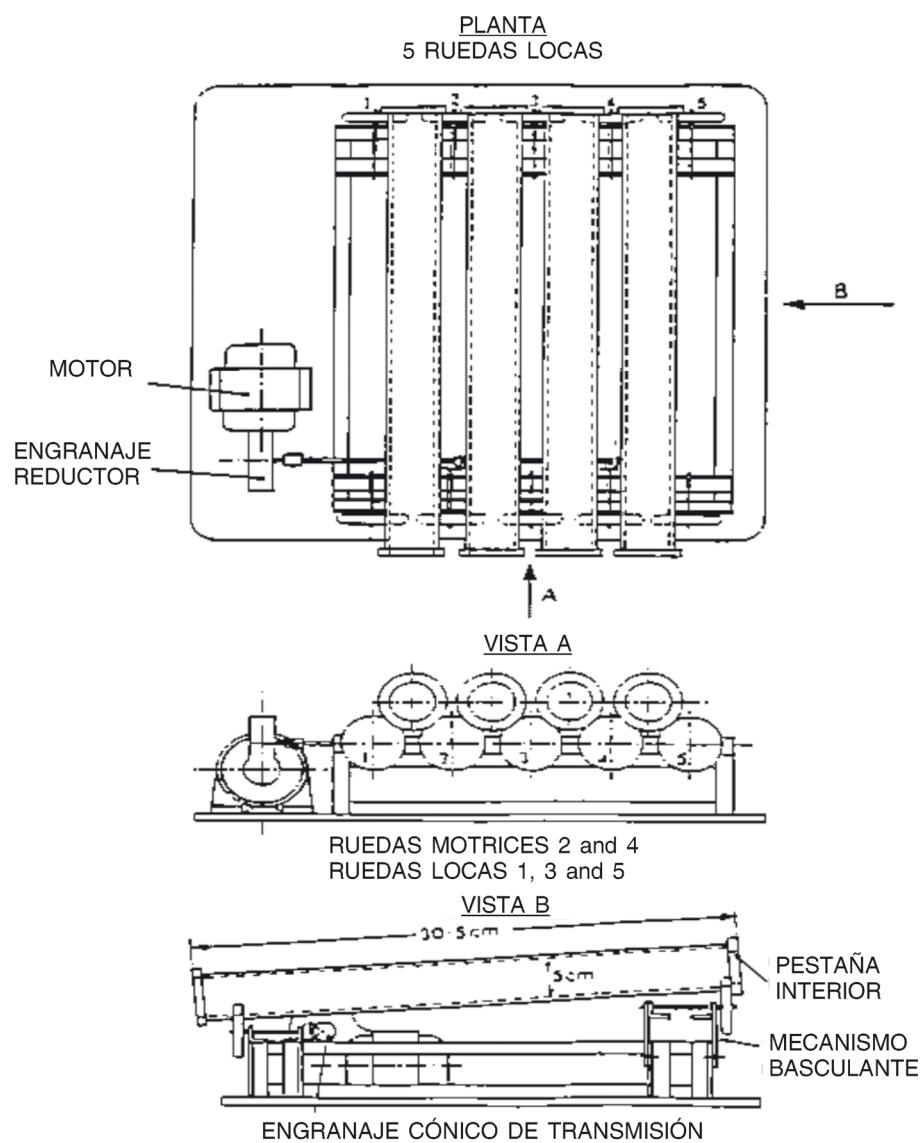
- Todos los datos medidos: COD, DQO, análisis específicos, pH, temperatura, sustancias nitrogenadas (cuando sea pertinente).
- Todos los valores calculados de D_t (o D_{t0}), D_B , D_S obtenidos en formato tabular y las curvas de eliminación.
- Información sobre las fases de latencia y de meseta, duración del ensayo, grado de eliminación de la sustancia problema, de la sustancia de referencia (si se utiliza) y del medio orgánico (en la unidad de control), junto con información estadística y declaraciones sobre la biodegradabilidad y la validez del ensayo.
- Discusión de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753-758.
- (2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441-444.
- (3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.
- (4) Gloyne EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.
- (5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCS* 43: 92-94.
- (6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865-881.
- (7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.
- (8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.
- (9) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil" A-F.
- (10) ISO 14593 (1998). Calidad del agua-Evaluación de la biodegradabilidad final de las sustancias orgánicas en medio acuoso. Método de análisis del carbono inorgánico liberado en recipientes cerrados.

Apéndice 8

Figura 1
Tubos giratorios



Glosario:

Planta

Vista A/B

Ruedas motrices

Ruedas locas

Motor

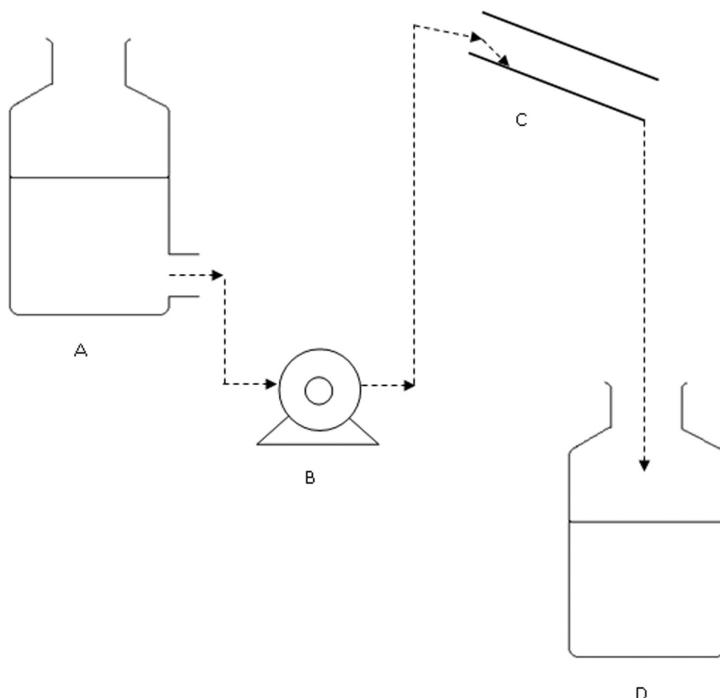
Engranaje reductor

Pestaña interior

Mecanismo basculante

Engranaje cónico de transmisión

Figura 2
Diagrama de flujo



A: Tanque de alimentación

B: Bomba peristáltica

C: Tubo giratorio

D: Recipiente de recogida del efluente

DEFINICIONES:

- a. Sustancia problema: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.
- b. Sustancias: Ha de señalarse que en los acuerdos de la CNUMAD y en los documentos subsiguientes se usa el término "producto químico" para referirse a sustancias, productos, mezclas, preparados, o cualesquiera otras denominaciones utilizadas en los sistemas actuales para describir los productos químicos en cuestión. En el presente documento se utiliza el término "sustancia" en este mismo sentido amplio.»

10) Se añaden los capítulos C.27, C.28, C.29 y C.30 siguientes:

«C.27. ENSAYO DE TOXICIDAD PARA QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTO-AGUA CON SEDIMENTO ENRIQUECIDO

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 218 (2004). Está diseñado para evaluar los efectos de la exposición prolongada de sustancias sobre las larvas del díptero de agua dulce *Chironomus* sp., que viven en los sedimentos. Se basa en los actuales protocolos de ensayo de toxicidad para *Chironomus riparius* y *Chironomus tentans* que se han elaborado en Europa (1) (2) (3) y en América del Norte (4) (5) (6) (7) (8) y se han sometido a ensayos interlaboratorios (1) (6) (9). Pueden utilizarse asimismo otras especies de quironómidos bien documentadas como, por ejemplo, *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. La situación de exposición aplicada en el presente método de ensayo es el enriquecimiento del sedimento con la sustancia problema. La selección de la situación de exposición adecuada depende de la aplicación que se prevea para el ensayo. La situación de enriquecimiento del sedimento tiene el objetivo de simular niveles acumulados de sustancias que permanecen en el sedimento. Este sistema de exposición implica el enriquecimiento del sedimento de un sistema de ensayo sedimento-agua.
3. Las sustancias que tienen que someterse a ensayo respecto a organismos que viven en los sedimentos suelen permanecer en este compartimento durante largos períodos. Los organismos que viven en los sedimentos pueden estar expuestos a través de varias vías de exposición. La importancia relativa de cada vía de exposición, y el tiempo que tarda cada una de ellas en contribuir a los efectos tóxicos generales, dependen de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia correspondiente. En el caso de las sustancias que se adsorben fuertemente (por ejemplo, con $\log K_{ow} > 5$) o en el de las sustancias que se unen covalentemente con el sedimento, la ingestión

de alimentos contaminados puede constituir una vía de exposición significativa. A fin de no subestimar la toxicidad de sustancias muy lipofílicas, puede considerarse la adición de alimentos al sedimento antes de aplicar la sustancia problema. Para tener en cuenta todas las vías potenciales de exposición, el presente método de ensayo insiste en la exposición a largo plazo. La duración del ensayo está en la banda de 20 a 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui*, y de 28 a 65 días en el de *C. tentans*. Si se necesitan datos a un plazo más corto con algún fin específico como, por ejemplo, investigar los efectos de una sustancia inestable, es posible retirar réplicas adicionales tras un plazo de diez días.

4. Los parámetros medidos son el número total de adultos que aparecen y el tiempo transcurrido hasta su aparición. Se recomienda que las mediciones de supervivencia y crecimiento de las larvas no se hagan hasta que hayan pasado diez días si se necesitan datos adicionales a corto plazo, utilizando réplicas adicionales cuando convenga.
5. Se recomienda el uso de sedimentos artificiales, que presentan diversas ventajas sobre los sedimentos naturales:
 - se reduce la variabilidad experimental porque se constituye una "matriz normalizada" reproducible y desaparece la necesidad de conseguir fuentes de sedimentos limpios y no contaminados,
 - pueden iniciarse los ensayos en cualquier momento sin problemas de variabilidad estacional del sedimento en cuestión, y no es necesario aplicar ningún tratamiento previo al sedimento para eliminar la fauna endógena; el uso de un sedimento artificial reduce también el coste asociado con la recogida de campo de cantidades suficientes de sedimentos para los ensayos sistemáticos,
 - el uso de sedimento artificial permite comparar la toxicidad de las sustancias y clasificarlas en consecuencia.
6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Se exponen quironómidos de primer estadio larvario a una serie de concentraciones de la sustancia problema en sistemas sedimento-agua. La sustancia problema se introduce en el sedimento y a continuación se toman larvas del primer estadio y se ponen en vasos donde se han estabilizado diferentes concentraciones de sedimento y agua. Al final del ensayo se mide la tasa de aparición de adultos y de desarrollo de quironómidos. También es posible medir la supervivencia y el peso de las larvas a los 10 días en caso necesario, utilizando réplicas adicionales cuando proceda. Estos datos se analizan o bien usando un modelo de regresión para estimar la concentración que provocaría una reducción del x % en la aparición de adultos o en la supervivencia o el crecimiento de las larvas (por ejemplo, EC₁₅, EC₅₀, etc.), o bien realizando contrastes estadísticos de hipótesis para determinar la NOEC/LOEC. Esta última posibilidad exige la comparación de valores de efectos con valores que tienen control, utilizando pruebas estadísticas.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

8. Deben conocerse la hidrosolubilidad de la sustancia problema, su presión de vapor, su reparto medido o calculado en el sedimento y su estabilidad en el agua y en el sedimento. Para cuantificar la sustancia problema presente en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, debe disponerse de un método analítico fiable, cuya precisión y límite de detección sean conocidos y se indiquen. Entre la información útil se incluyen la fórmula estructural y la pureza de la sustancia problema. También es útil la información sobre el destino químico de la sustancia problema (por ejemplo, disipación, degradación abiótica y biótica, etc.). En la referencia 12 se ofrece más orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan la realización del ensayo.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

9. Puede realizarse periódicamente un ensayo con sustancias de referencia, para asegurarse de la fiabilidad del protocolo y de las condiciones del ensayo. Las siguientes sustancias son ejemplos de tóxicos de referencia utilizados con éxito en estudios interlaboratorios y de validación: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloruro de cadmio y cloruro de potasio (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDEZ DEL ENSAYO

10. Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:
 - la aparición de adultos en los controles no ha de ser inferior al 70 % al final del ensayo (1) (6),
 - la aparición de adultos de *C. riparius* y *C. yoshimatsui* en los recipientes de control debe producirse cuando hayan transcurrido entre 12 y 23 días desde su introducción en los recipientes; en el caso de *C. tentans* es necesario un plazo de entre 20 y 65 días,

- al final del ensayo deben medirse en cada recipiente el pH y la concentración de oxígeno disuelto; la concentración de oxígeno debe ser al menos el 60 % del valor de saturación en el aire a la temperatura aplicada, y el pH del agua sobrenadante debe estar en el rango de 6 a 9 en todos los recipientes de ensayo,
- la temperatura del agua no debe variar en más de $\pm 1,0$ °C; la temperatura del agua podría controlarse mediante un espacio isotérmico y, en tal caso, debería confirmarse la temperatura ambiente de ese espacio a intervalos apropiados.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Recipientes de ensayo

11. El estudio se lleva a cabo en vasos de vidrio de 600 ml de capacidad y 8 cm de diámetro. Pueden utilizarse otros recipientes que garanticen una altura adecuada de sedimento y de agua sobrenadante. La superficie del sedimento debe ser suficiente para que correspondan de 2 a 3 cm² por larva. La proporción de la altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua sobrenadante debe ser de 1:4. Los recipientes de ensayo y demás instrumentos que hayan de entrar en contacto con el sistema de ensayo serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte como, por ejemplo, teflón.

Selección de la especie

12. La especie que debe usarse preferentemente en el ensayo es *Chironomus riparius*. También es adecuada la especie *Chironomus tentans*, pero resulta más difícil de manejar y requiere un período de ensayo más largo. Asimismo es posible utilizar *Chironomus yoshimatsui*. En el apéndice 2 se da información sobre los métodos de cultivo de *Chironomus riparius*. También se dispone de información sobre las condiciones de cultivo de otras especies, como *Chironomus tentans* (4) y *Chironomus yoshimatsui* (11). Hay que confirmar la identificación de la especie antes de realizar los ensayos, pero no es necesario hacerlo antes de cada ensayo si los organismos proceden de un cultivo del propio laboratorio.

Sedimento

13. Es preferible utilizar un sedimento artificial (también denominado formulado, reconstituido o sintético). Sin embargo, si se utiliza sedimento natural, deben determinarse sus características (al menos, el pH y el contenido de carbono, pero es recomendable incluir otros parámetros, como la relación C/N y la granulometría), y debe estar exento de toda contaminación y de otros organismos que pudieran competir con los quirónómidos o consumirlos. También se recomienda que el sedimento natural, antes de emplearse en un ensayo de toxicidad para quirónómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo. Se recomienda utilizar en este ensayo (1) (15) (16) el siguiente sedimento artificial, basado en el suelo artificial empleado en el método de ensayo C.8 (14):

- a) 4-5 % de turba (peso seco), de pH lo más próximo posible a la banda 5,5-6,0; es importante utilizar turba en forma de polvo, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada solo al aire;
- b) 20 % de caolín (peso seco), con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;
- c) 75-76 % de arena de cuarzo (peso seco); debe predominar la arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm ;
- d) agua desionizada añadida para obtener un contenido de humedad en la mezcla final el rango de 30 a 50 %;
- e) carbonato de calcio de calidad químicamente pura (CaCO_3) añadido para ajustar el pH de la mezcla final del sedimento a $7,0 \pm 0,5$; el contenido de carbono orgánico de la mezcla final debe ser del 2 % ($\pm 0,5$ %), ajustado mediante el empleo de cantidades adecuadas de turba y arena, según las letras a) y c).

14. Debe conocerse el origen de la turba, del caolín y de la arena. Hay que comprobar que los componentes del sedimento no presentan contaminación química (por ejemplo, con metales pesados, compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, etc.). En el apéndice 3 se describe un ejemplo de preparación del sedimento artificial. Puede aceptarse también la mezcla de componentes secos si se demuestra que, tras la adición de agua sobrenadante, no se produce separación de los componentes del sedimento (por ejemplo, flotación de partículas de turba), y que la turba o el sedimento están suficientemente acondicionados.

Agua

15. Es adecuada como agua de ensayo cualquier agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable según se indica en los apéndices 2 y 4. Puede utilizarse como agua de cultivo y agua de ensayo cualquier agua adecuada, agua natural (superficial o subterránea), agua reconstituida (véase el apéndice 2) o agua del grifo desclorada, siempre que los quirónómidos sobrevivan en ella durante las fases de cultivo y ensayo sin mostrar signos de presión. Al inicio del ensayo, el pH del agua de ensayo debe estar entre 6 y 9 y la

dureza total no debe superar el valor de 400 mg/l en CaCO₃. Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt). Debe usarse el mismo tipo de agua a lo largo de todo el estudio. Las características de calidad del agua recogidas en el apéndice 4 deben medirse al menos dos veces al año o cuando se sospeche que pueden haber cambiado de forma significativa.

Soluciones madre — sedimentos enriquecidos

16. Los sedimentos enriquecidos a la concentración elegida se preparan por lo general añadiendo una solución de la sustancia problema directamente al sedimento. La solución madre de la sustancia problema preparada con agua desionizada se mezcla con el sedimento artificial mediante molino de rodillos, mezcladora de piensos o a mano. Si la sustancia problema es poco soluble en agua, puede disolverse en el mínimo volumen posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, hexano, acetona o cloroformo). Esta solución se mezcla a continuación con 10 g de arena de cuarzo fina para un solo recipiente de ensayo. Se deja que se evapore el disolvente, que tiene que desaparecer totalmente de la arena; después se mezcla la arena con la cantidad adecuada de sedimento para un vaso de ensayo. Para solubilizar, dispersar o emulsionar la sustancia problema solo pueden utilizarse agentes que se volatilicen rápidamente. No ha de olvidarse que la arena aportada por la mezcla de sustancia problema y arena tiene que tenerse en cuenta a la hora de preparar el sedimento (es decir, el sedimento debe prepararse entonces con menos arena). Debe velarse por que la sustancia problema añadida al sedimento se distribuya de forma total y homogénea por el sedimento. En caso necesario, deben analizarse submuestras para determinar el grado de homogeneidad.

DISEÑO DEL ENSAYO

17. El diseño del ensayo se refiere a la selección del número de concentraciones de ensayo y al intervalo entre las mismas, al número de recipientes por concentración y al número de larvas por recipiente. Se describen los diseños para la estimación puntual de la EC y de la NOEC, así como para realizar un ensayo límite.

Diseño para análisis de regresión

18. La concentración con efecto (por ejemplo, EC₁₅, EC₅₀) y el rango de concentraciones en la que resulta interesante el efecto de la sustancia problema, tienen que estar abarcadas entre las concentraciones incluidas en el ensayo. En general, la exactitud y, sobre todo, la validez con la que pueden hacerse las estimaciones de las concentraciones con efecto (EC_x) mejoran cuando la concentración con efecto se encuentra dentro del rango de concentraciones ensayadas. Debe evitarse extrapolar muy por debajo de la menor concentración positiva o por encima de la concentración máxima. Es conveniente efectuar previamente un ensayo para seleccionar el rango de concentraciones que se deba utilizar (véase el punto 27).
19. Si ha de estimarse la EC_x, deben someterse a ensayo al menos cinco concentraciones y tres réplicas por cada concentración. En cualquier caso, es recomendable utilizar suficientes concentraciones de ensayo para poder hacer una buena estimación del modelo. El factor entre concentraciones no debe ser mayor que dos (puede permitirse una excepción en los casos en que la pendiente de la curva dosis-respuesta sea poco pronunciada). El número de réplicas de cada tratamiento puede reducirse si aumenta el número de concentraciones de ensayo con diferentes respuestas. El aumento del número de réplicas o la reducción del tamaño del intervalo entre concentraciones de ensayo tiende a estrechar los intervalos de confianza del ensayo. Si se han de estimar la supervivencia y el crecimiento de las larvas a los 10 días, es necesario emplear réplicas adicionales.

Diseño para estimar una NOEC/LOEC

20. Si hay que estimar la LOEC y/o la NOEC, se deben emplear cinco concentraciones de ensayo con un mínimo de cuatro réplicas y el factor entre concentraciones no debe exceder de dos. El número de réplicas debe ser suficiente para garantizar una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % (p = 0,05). Respecto a la tasa de desarrollo, suele ser adecuado un análisis de la varianza (ANOVA), como el ensayo de Dunnett o el de Williams (17) (18) (19) (20). Para la tasa de aparición, pueden emplearse el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (con la corrección de Bonferroni), o el método de Mantel-Haenszel.

Ensayo límite

21. Puede llevarse a cabo un ensayo límite (una sola concentración de ensayo y un control) si no se han observado efectos en el ensayo previamente efectuado para seleccionar el rango de concentraciones. La finalidad del ensayo límite es someter a ensayo una concentración suficientemente elevada como para permitir a los responsables excluir cualquier efecto tóxico de la sustancia problema, y el límite se establece a una concentración que no se espera encontrar en la realidad en ninguna situación. Se recomienda la concentración de 1 000 mg/kg (peso seco). Generalmente hacen falta al menos seis réplicas tanto de las unidades de tratamiento como de las de control. Debe demostrarse una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % (p = 0,05). Con una respuesta métrica (tasa de desarrollo y peso), la prueba t es un método estadístico adecuado si los datos cumplen los requisitos de esta prueba (normalidad, varianzas homogéneas). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse la prueba t de varianzas desiguales o una prueba no paramétrica, tal como la de Wilcoxon-Mann-Whitney. En relación con la tasa de aparición de adultos es adecuada la prueba exacta de Fisher.

PROCEDIMIENTO

Condiciones de exposición

Preparación del sistema sedimento enriquecido-agua

22. El procedimiento de enriquecimiento descrito en el método de ensayo C.8. Toxicidad para gusanos de tierra es el recomendado para su aplicación a la sustancia problema (14). Los sedimentos enriquecidos se colocan en los recipientes y se añade agua sobrenadante para conseguir una relación de volumen sedimento-agua de 1:4 (véanse los puntos 11 y 15). La altura de la capa de sedimento debe estar entre 1,5 y 3 cm. Para evitar que se separen los ingredientes del sedimento y se resuspendan las partículas finas durante la adición del agua de ensayo a la columna de agua, puede cubrirse el sedimento con un disco de plástico mientras se vierte el agua encima, y retirar el disco inmediatamente a continuación. Puede ser adecuado también utilizar otros dispositivos.
23. Los recipientes de ensayo tienen que estar cubiertos (por ejemplo, con placas de vidrio). Cuando sea necesario, manténgase durante el estudio el volumen de agua inicial añadiendo agua para compensar la evaporación de esta. Para esta operación debe utilizarse agua destilada o desionizada a fin de evitar la formación de sales.

Estabilización

24. Una vez preparado el sedimento enriquecido con el agua sobrenadante, es conveniente dejar que la sustancia problema se reparta pasando de la fase acuosa al sedimento (3) (4) (6) (13). Esto debe efectuarse de preferencia en las mismas condiciones de temperatura y aireación que el ensayo. El tiempo adecuado para el equilibrado depende de la sustancia y del sedimento, y puede ser del orden de horas o de días, aunque en ciertos casos raros puede llegar a ser de varias semanas (4 o 5 semanas). Como esto daría ocasión para la degradación de muchas sustancias, no se espera hasta alcanzar el equilibrio completo, sino que se recomienda un período de equilibrado de 48 h. Al final de este período de equilibrado, debe medirse la concentración de la sustancia problema en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, al menos a la concentración más elevada y a una inferior (véase el punto 38). Estas determinaciones analíticas de la sustancia problema permiten el cálculo del balance de masas y la expresión de los resultados sobre la base de las concentraciones medidas.

Adición de los organismos de ensayo

25. Cuatro o cinco días antes de añadir los organismos de ensayo a los recipientes de ensayo, deben tomarse de los cultivos masas de huevos y ponerlos en recipientes pequeños con medio de cultivo. Puede utilizarse medio viejo del cultivo madre o medio recién preparado. Si se utiliza este último, debe añadirse una pequeña cantidad de alimento como, por ejemplo, algas verdes o unas gotitas de filtrado de una suspensión finamente molida de alimento para peces en copos (véase el apéndice 2). Solo deben utilizarse masas de huevos recién puestas. Normalmente, las larvas empiezan a salir de los huevos un par de días después de la puesta (de 2 a 3 días en el caso de *Chironomus riparius* a 20 °C y de 1 a 4 días en el de *Chironomus tentans* a 23 °C y en el de *Chironomus yoshimatsui* a 25 °C) y el crecimiento de las larvas tiene lugar en cuatro fases, cada una de entre 4 y 8 días de duración. En el ensayo deben utilizarse larvas de primera fase (2-3 o 1-4 días tras la eclosión). La fase de los animales puede comprobarse midiendo la anchura de la cápsulacefálica (6).
26. Se asignan aleatoriamente veinte larvas de primera fase a cada recipiente de ensayo que contenga el sedimento enriquecido y el agua, utilizando una pipeta de punta romana. Es necesario detener la aireación del agua mientras se ponen las larvas en los recipientes de ensayo y mantener la situación durante otras 24 horas tras la adición de las larvas (véanse los puntos 25 y 32). Según el diseño de ensayo empleado (véanse los puntos 19 y 20), el número de larvas utilizadas por concentración es de al menos 60 para la estimación puntual de la ECx y de 80 para la determinación de la NOEC.

Concentraciones de ensayo

27. Puede ser útil efectuar un ensayo preliminar para determinar el rango de concentraciones adecuadas para el ensayo definitivo. Con este fin se utiliza una serie de concentraciones de la sustancia problema, muy diferentes entre sí. A fin de proporcionar la misma densidad superficial por quirónómido que se vaya a emplear para el ensayo definitivo, se exponen los quirónómidos a cada concentración de la sustancia problema durante un plazo que permita la estimación de las concentraciones de ensayo adecuadas, y no hace falta utilizar réplicas.
28. Las concentraciones de ensayo para el ensayo definitivo se deciden sobre la base del resultado del ensayo de determinación del rango de concentraciones. Deben utilizarse al menos cinco concentraciones y seleccionarse como se describe en los puntos 18 a 20.

Controles

29. Deben incluirse en el ensayo, con el número adecuado de réplicas, recipientes de control sin sustancia problema pero con sedimento (véanse los puntos 19-20). Si se ha utilizado algún disolvente para aplicar la sustancia problema (véase el punto 16), debe añadirse un control del disolvente en el sedimento.

Sistema de ensayo

30. Se emplean sistemas estáticos. Pueden utilizarse en casos excepcionales sistemas semiestáticos o dinámicos con renovación intermitente o continua del agua sobrenadante, como, por ejemplo, si las especificaciones de calidad del agua se hacen inadecuadas para el organismo de ensayo o afectan al equilibrio químico (por ejemplo, cuando los niveles de oxígeno disuelto caen demasiado, la concentración de excrementos se eleva demasiado, o se lixivian minerales del sedimento con modificación del pH y/o de la dureza del agua). Sin embargo, normalmente será suficiente y preferible emplear otros métodos de mejora de la calidad del agua sobrenadante, como la aireación.

Alimentación

31. Es necesario alimentar a las larvas, de preferencia una vez al día o, al menos, tres veces por semana. Parece adecuada una ración diaria de comida para peces (suspensión en agua o comida finamente molida como, por ejemplo, Tetra-Min o Tetra-Phyll; véanse detalles en el apéndice 2), de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg para *C. yoshimatsui*) por larva durante los 10 primeros días. Las larvas de más edad pueden necesitar algo más de comida: entre 0,5 y 1 mg por larva al día debería ser suficiente durante el resto del ensayo. La ración alimentaria debe reducirse en todos los tratamientos y controles si se observa crecimiento de hongos o si se aprecia mortalidad en los controles. Si no puede detenerse el desarrollo fúngico, hay que repetir el ensayo. Cuando se someten a ensayo sustancias muy adsorbentes (por ejemplo, con $\log K_{ow} > 5$), o hay sustancias que se unen covalentemente al sedimento, es posible añadir al sedimento artificial, antes del período de estabilización, la cantidad de comida necesaria para garantizar la supervivencia y el crecimiento natural de los organismos. Con este objetivo, debe utilizarse material vegetal en lugar de la comida para peces, por ejemplo, adición de 0,5 % (peso seco) de hojas finamente molidas de ortiga mayor (*Urtica dioica*), morera (*Morus alba*), trébol blanco (*Trifolium repens*), espinaca (*Spinacia oleracea*) u otro material vegetal (*Cerophyl* o alfa-celulosa).

Condiciones de incubación

32. Se aporta aireación suave al agua sobrenadante de los recipientes de ensayo, preferentemente a las 24 h de la adición de las larvas, y se continúa a lo largo de todo el ensayo (debe tenerse cuidado para que la concentración de oxígeno disuelto no caiga por debajo del 60 % del valor de saturación en el aire). La aireación se aporta mediante una pipeta Pasteur de vidrio fijada a 2-3 cm por encima del nivel del sedimento, con el ritmo de una o unas pocas burbujas por segundo. Cuando se sometan a ensayo sustancias volátiles, debe considerarse el no airear el sistema sedimento-agua.
33. El ensayo se efectúa a la temperatura constante de 20 °C (± 2 °C). En el caso de *C. tentans* y de *C. yoshimatsui*, las temperaturas recomendadas son de 23 °C y 25 °C (± 2 °C), respectivamente. Se usa un fotoperíodo de 16 h, con una intensidad luminosa de 500 a 1 000 lux.

Duración de la exposición

34. La exposición comienza con la adición de larvas a los recipientes con sedimento enriquecido y a los de control. La duración máxima del ensayo es de 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui*, y de 65 días en el de *C. tentans*. Si los dípteros aparecen antes, es posible terminar el ensayo tras un mínimo de cinco días desde la aparición del último adulto en los recipientes de control.

Observaciones

Aparición de adultos

35. Se determinan el tiempo de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras que aparecen completamente. Los machos se identifican fácilmente por sus antenas plumosas.
36. Hay que observar los recipientes de ensayo al menos tres veces por semana para hacer una evaluación visual de los eventuales comportamientos anormales (por ejemplo, dejar el sedimento, nadar de forma inusual) respecto al control. Durante el tiempo en que se prevea que ha de ocurrir la aparición es necesario efectuar un recuento diario de los dípteros aparecidos. Se registran cada día el sexo y el número de los dípteros aparecidos completamente. Tras su identificación, se sacan los dípteros de los recipientes. Las eventuales masas de huevos puestas antes de la terminación del ensayo deben anotarse y después retirarse para evitar la reintroducción de larvas en el sedimento. También debe registrarse el número de pupas visibles de las que no han llegado a aparecer adultos. En el apéndice 5 se dan orientaciones sobre la medición de la aparición de los dípteros.

Crecimiento y supervivencia

37. Si han de proporcionarse datos sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas a los 10 días, deben incluirse desde el principio recipientes de ensayo adicionales, de forma que puedan utilizarse después. El sedimento de estos recipientes adicionales se filtra a través de un tamiz de 250 µm para retener las larvas. Los criterios para determinar la muerte son la inmovilidad o la ausencia de reacción ante un estímulo mecánico. Las larvas no recuperadas deben contarse asimismo como muertas (las larvas que hayan muerto al inicio del ensayo pueden haber sido degradadas por los microbios). Se determina el peso seco (libre de cenizas) de las larvas supervivientes por recipiente de ensayo y se calcula el peso seco individual medio por recipiente. Es útil determinar a qué fase pertenecen las larvas supervivientes; para obtener este dato puede utilizarse la medición de la anchura de la cápsula cefálica de cada individuo.

Mediciones analíticas

Concentración de la sustancia problema

38. Antes de iniciar el ensayo (es decir, la adición de las larvas), se toman muestras de sedimento de al menos un recipiente por tratamiento para la determinación analítica de la concentración de la sustancia problema en el sedimento. Se recomienda que, como mínimo, se analicen muestras del agua sobrenadante, del agua intersticial y del sedimento al inicio (véase el punto 24) y al final del ensayo, a la concentración máxima y a una inferior. Estas determinaciones de la concentración de la sustancia problema informan sobre el comportamiento y el reparto de la sustancia problema en el sistema agua-sedimento.
39. Cuando se hagan mediciones intermedias (por ejemplo, el día nº 7) y si los análisis necesitan grandes muestras que no puedan tomarse de los recipientes de ensayo sin influir en el sistema de ensayo, las determinaciones analíticas deben llevarse a cabo con muestras de recipientes de ensayo adicionales tratados de la misma manera (incluida la presencia de los organismos de ensayo) pero que no se utilizan para las observaciones biológicas.
40. El procedimiento recomendado para aislar el agua intersticial es la centrifugación, por ejemplo a 10 000 g y 4 °C durante 30 min. Sin embargo, si se demuestra que la sustancia problema no se adsorbe a los filtros, también puede aceptarse la filtración. En algunos casos puede resultar imposible analizar las concentraciones en el agua intersticial debido a que el tamaño de la muestra es demasiado pequeño.

Parámetros fisicoquímicos

41. Deben medirse de la manera adecuada el pH y la temperatura de los recipientes de ensayo (véase el punto 10). Hay que medir la dureza y el amoníaco en los controles y en un recipiente de ensayo a la concentración máxima, al inicio y al final del ensayo.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

42. El objetivo de este ensayo es determinar el efecto de la sustancia completamente sobre la tasa de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras totalmente aparecidos o, en el caso de los efectos del ensayo de 10 días, sobre la supervivencia y el peso de las larvas. Si no hay ninguna señal de sensibilidades estadísticamente diferentes según los sexos, a efectos de análisis estadísticos pueden agruparse los resultados de machos y de hembras. Las diferencias de sensibilidad entre los sexos pueden evaluarse estadísticamente mediante, por ejemplo, una prueba de tabla de contingencia de χ^2 -r × 2. Cuando así se requiera, habrá que determinar la supervivencia de las larvas y su peso seco individual medio por recipiente al cabo de 10 días.
43. Las concentraciones que tienen efecto, expresadas en peso seco y sobre la base de este, se calculan preferentemente a partir de las concentraciones medidas en el sedimento al inicio del ensayo (véase el punto 38).
44. A efectos de computar una estimación puntual para la EC₅₀ o cualquier otra EC_x, las estadísticas por recipiente pueden utilizarse como réplicas verdaderas. Al calcular el intervalo de confianza para cualquier EC_x, debe tenerse en cuenta la variabilidad entre recipientes, o bien hay que mostrar que esta variabilidad es tan pequeña que puede despreciarse. Cuando el modelo sigue el método de los mínimos cuadrados, debe aplicarse una transformación estadística por cada recipiente a fin de mejorar la homogeneidad de la varianza. Sin embargo, los valores de EC_x deben calcularse después de haber vuelto a transformar la respuesta al valor original.
45. Cuando el análisis estadístico se dirige a determinar la NOEC/LOEC mediante contrastes de hipótesis, es necesario tener en cuenta la variabilidad entre recipientes, por ejemplo mediante un análisis de varianza anidado. También puede ser adecuado realizar ensayos más robustos (21) en situaciones en que no se cumplen las hipótesis de los análisis de varianza usuales.

Tasa de aparición

46. Las tasas de aparición son datos cuantales y pueden ser analizados por el método de Cochran-Armitage aplicado con ajuste secuencial de residuos cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y estos datos son coherentes con dicha previsión. En caso contrario, puede utilizarse una prueba exacta de Fisher o el método de Mantel-Haenszel con los valores p ajustados según Bonferroni-Holm. Si hay pruebas de que la variabilidad entre réplicas dentro de la misma concentración es mayor de lo que indicaría una distribución binomial (lo que se señala generalmente como variación "extrabinomial"), hay que utilizar un método de Cochran-Armitage o una prueba exacta de Fisher robustos (como se propone en el punto 21).

Se determina la suma de dípteros aparecidos por recipiente, n_e, y se divide por el número de larvas introducidas, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

donde:

ER = tasa de aparición

n_e = número de dípteros aparecidos por recipiente

n_a = número de larvas introducidas por recipiente

47. Otra posibilidad más adecuada para las muestras de gran tamaño, cuando hay variación extrabinomial, consiste en tratar la tasa de aparición como una respuesta continua y emplear procedimientos tales como la prueba de Williams cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y es coherente con estos datos de tasa de aparición. La prueba de Dunnett sería apropiada si no se mantuviera la monotonía. Se define aquí como muestra de gran tamaño la que corresponde a la situación en que tanto el número de dípteros emergidos como el número de no emergidos es superior a cinco, por réplica (recipiente).
48. Para aplicar los métodos de análisis de la varianza, hay que transformar primero los valores de tasa de aparición mediante la transformación arcoseno de la raíz cuadrada o la transformación de Freeman-Tukey para obtener una distribución normal aproximada y uniformizar las varianzas. Cuando se usan las frecuencias absolutas es posible aplicar el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (Bonferroni), o el método de Mantel-Haenszel. La transformación arcoseno de la raíz cuadrada se aplica tomando el arcoseno (sen^{-1}) de la raíz cuadrada de la tasa de aparición.
49. Respecto a las tasas de aparición, los valores de EC_x se calculan mediante análisis de regresión [o, por ejemplo, probit (22), logit, Weibull, programas comerciales apropiados, etc.]. Si no sirve el análisis de regresión (por ejemplo, cuando hay menos de dos respuestas parciales), se utilizan otros métodos no paramétricos, tales como la media móvil o la interpolación simple).

Tasa de desarrollo

50. El tiempo de desarrollo medio corresponde al intervalo medio de tiempo entre la introducción de las larvas (día 0 del ensayo) y la aparición de la cohorte experimental de dípteros (para el cálculo del tiempo de desarrollo verdadero debe tenerse en cuenta la edad de las larvas en el momento de su introducción). La tasa de desarrollo es la inversa del tiempo de desarrollo (unidades: 1/día) y corresponde a la porción de desarrollo larvario que se produce en un día. Es preferible utilizar la tasa de desarrollo para evaluar estos estudios de toxicidad en los sedimentos, ya que su varianza es menor y es más homogénea y próxima a la distribución normal que el tiempo de desarrollo. Por tanto, pueden usarse procedimientos de ensayos paramétricos más potentes con la tasa de desarrollo que con el tiempo de desarrollo. Considerando a la tasa de desarrollo como respuesta continua, es posible estimar valores de EC_x mediante análisis de regresión [por ejemplo, (23), (24)].
51. En relación con las siguientes pruebas estadísticas, se supone que el número de dípteros observados en el día de inspección x ha aparecido a la media del intervalo de tiempo entre el día x y el día $x - 1$ (l = longitud del intervalo de inspección, que es normalmente de 1 día). La tasa de desarrollo media por recipiente (\bar{x}) se calcula con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

donde:

\bar{x} : tasa de desarrollo media por recipiente,

i : índice del intervalo de inspección,

m : número máximo de intervalos de inspección,

f_i : número de dípteros aparecidos en el intervalo de inspección i ,

n_e : número total de dípteros aparecidos al final del experimento ($= \sum f_i$),

x_i : tasa de desarrollo de los dípteros aparecidos en el intervalo i ,

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)}$$

donde:

day_i : día de inspección (días desde la aplicación),

l_i : longitud del intervalo de inspección i (en días, generalmente 1 día).

Informe del ensayo

52. El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

Sustancia problema:

- Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (hidrosolubilidad, presión de vapor, coeficiente de reparto en el suelo (o en el sedimento, si se conoce), estabilidad en el agua, etc.).
- Datos de identificación química (nombre común, nombre químico, fórmula estructural, número CAS, etc.), incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia problema.

Especie de ensayo:

- Animales utilizados en el ensayo: especie, nombre científico, origen de los organismos y condiciones de cría.
- Información sobre la manipulación de las masas de huevos y de las larvas.
- Edad de los animales de ensayo cuando se introducen en los recipientes de ensayo.

Condiciones de ensayo:

- Sedimento utilizado, es decir, si es natural o artificial.
- En el caso del sedimento natural, ubicación y descripción del lugar de muestreo del sedimento, incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación; características: pH, contenido de carbono orgánico, relación C/N y granulometría (cuando sea apropiado).
- Preparación del sedimento artificial: ingredientes y características (contenido de carbono orgánico, pH, humedad, etc., al inicio del ensayo).
- Preparación del agua de ensayo (si se utiliza agua reconstituida) y características (concentración de oxígeno, pH, conductividad, dureza, etc., al inicio del ensayo).
- Altura del sedimento y del agua sobrenadante.
- Volumen del agua sobrenadante y del agua intersticial, peso del sedimento húmedo con y sin agua intersticial.
- Recipientes de ensayo (material y tamaño).
- Método para enriquecer el sedimento: concentraciones de ensayo utilizadas, número de réplicas y empleo eventual de disolvente.
- Fase de estabilización (equilibrado) del sistema sedimento enriquecido – agua: duración y condiciones.
- Condiciones de incubación: temperatura, intensidad y ciclo de luz, aireación (frecuencia e intensidad).
- Información detallada sobre la alimentación de los animales, incluidos el tipo de alimento, la preparación, la cantidad y el régimen alimentario.

Resultados:

- Concentraciones de ensayo nominales, concentraciones de ensayo medidas y resultados de todos los análisis efectuados para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo.
- Calidad del agua de los recipientes de ensayo, es decir, pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza y amoníaco.
- Sustitución del agua de ensayo evaporada, en su caso.
- Número de dípteros machos y hembras aparecidos por recipiente y por día.
- Número de larvas que no han aparecido como dípteros por recipiente.
- Peso seco individual medio de las larvas por recipiente, y por fase, en caso apropiado.
- Porcentaje de apariciones por réplica y concentración de ensayo (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).

- Tasa de desarrollo media de los dípteros aparecidos completamente por réplica y tasa de tratamiento (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).
- Estimación de los parámetros de toxicidad como, por ejemplo, EC_x (con intervalos de confianza asociados), NOEC y/o LOEC, y métodos estadísticos empleados para su determinación.
- Discusión de los resultados del ensayo, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Strelake and H.Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp. 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Método de ensayo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.
- (15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

-
- (17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statis. Assoc.*, 50: 1096-1121.
 - (18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20: 482-491.
 - (19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics*, 27: 103-117.
 - (20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28: 510-531.
 - (21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48: 577-585.
 - (22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
 - (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11: 1485-1494.
 - (24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.
-

Apéndice 1

DEFINICIONES

A efectos del presente método de ensayo, aplicarán las siguientes definiciones:

Sedimento artificial (o sedimento reconstituido, formulado o sintético): una mezcla de materiales empleada para imitar los componentes físicos de un sedimento natural.

Agua sobrenadante: el agua situada sobre el sedimento en el recipiente de ensayo.

Agua intersticial: el agua que ocupa el espacio entre el sedimento y las partículas del suelo.

Sedimento enriquecido: el sedimento al que se ha añadido sustancia problema.

Sustancia problema: toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

Apéndice 2

Recomendaciones para el cultivo de *Chironomus riparius*

1. Las larvas de *Chironomus* pueden criarse en cristalizadores o en recipientes más grandes. Sobre el fondo del recipiente se extiende arena de cuarzo fina, en una capa delgada de unos 5 a 10 mm de espesor. Se ha comprobado que la tierra de diatomeas (por ejemplo, Merck, Art 8117) también constituye un sustrato adecuado (es suficiente una capa más fina, de muy pocos milímetros). A continuación se añade agua adecuada hasta una altura de varios centímetros. Los niveles deben mantenerse llenando con agua en la medida necesaria para compensar las pérdidas por evaporación y evitar la desecación. En caso necesario, es posible sustituir el agua. Debe aportarse una aireación suave. Los recipientes de cría de las larvas deben mantenerse en una jaula adecuada para evitar que se escapen los adultos que aparezcan. La jaula debe ser lo suficientemente grande como para permitir el enjambrado de los adultos aparecidos, ya que en caso contrario puede que no haya copulación (las dimensiones mínimas son de unos 30 × 30 × 30 cm).
2. Las jaulas deben mantenerse a temperatura ambiente o en una zona de ambiente constante a 20 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz (de intensidad alrededor de 1 000 lux) y 8 horas de oscuridad. Se ha comunicado que una humedad relativa del aire de menos del 60 % puede impedir la reproducción.

Agua de dilución

3. Puede emplearse cualquier agua natural o sintética que sea adecuada. Se suelen utilizar agua de pozo, agua del grifo descolorada y medios artificiales (como, por ejemplo, medio M4 o M7 de Elendt, véase más abajo). Es necesario airear el agua antes de emplearla. En caso necesario, el agua de cultivo puede renovarse sacando cuidadosamente, por vertido o con sifón, el agua usada de los recipientes de cultivo, sin destruir los tubos de las larvas.

Alimentación de las larvas

4. Las larvas de *Chironomus* deben alimentarse con comida para peces en copos (Tetra Min®, Tetra Phyll® u otra marca similar de comida comercial para peces), al ritmo de aproximadamente 250 mg por recipiente al día. Puede administrarse como polvo molido seco o como suspensión en agua: se añade 1,0 g de comida en copos a 20 ml de agua de dilución y se mezcla para obtener un resultado homogéneo. Esta preparación puede administrarse al ritmo de unos 5 ml por recipiente al día y ha de agitarse antes de usarse. Las larvas más viejas pueden recibir más cantidad.
5. La alimentación se ajusta según la calidad del agua. Si el medio de cultivo se pone turbio, hay que reducir la alimentación. Es necesario supervisar cuidadosamente la adición de comida. Si la comida es demasiado escasa, se provocará la emigración de las larvas hacia la columna de agua, mientras que si es excesiva aumentará la actividad microbiana y se reducirá la concentración de oxígeno. Ambas situaciones pueden producir un descenso de la tasa de crecimiento.
6. Es posible añadir también algunas células de algas verdes (como, por ejemplo, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) cuando se establecen recipientes de cultivo nuevos.

Alimentación de los adultos aparecidos

7. Algunos experimentadores han sugerido que un disco de algodón empapado en una solución saturada de sacarosa puede servir de alimento para los adultos aparecidos.

Aparición de adultos

8. A 20 ± 2 °C, los adultos empiezan a aparecer en los recipientes de cría de larvas a los 13-15 días aproximadamente. Los machos se distinguen fácilmente porque tienen antenas plumosas.

Masas de huevos

9. Una vez haya adultos en la jaula de cría, deben supervisarse todos los recipientes de cría de larvas tres veces por semana para observar la puesta de masas gelatinosas de huevos. Cuando se encuentren, las masas de huevos deben retirarse cuidadosamente y transferirse a una pequeña placa que contenga una muestra del agua de cría. Las masas de huevos se emplean para iniciar un nuevo recipiente de cultivo (por ejemplo, 2-4 masas de huevos por recipiente) o para los ensayos de toxicidad.
10. Las larvas en primer estadio deben salir de los huevos al cabo de 2 – 3 días.

Establecimiento de nuevos recipientes de cultivo

11. Cuando se hayan establecido los cultivos, debe ser posible establecer un nuevo recipiente de cultivo de larvas cada semana o con menos frecuencia, según los requisitos de cultivo, eliminando los recipientes más viejos una vez han aparecido los dípteros adultos. Con este sistema, se obtendrá un suministro regular de adultos, con una gestión mínima.

Preparación de las soluciones de ensayo M4 y M7

12. Elendt (1990) describió el medio M4. El M7 se prepara como el medio M4, salvo en lo relativo a las sustancias indicadas en el cuadro 1, cuyas concentraciones son cuatro veces más bajas en el medio M7 que en el M4. Se está preparando una publicación sobre el medio M7 (Elendt, comunicación personal). La solución de ensayo no debe prepararse siguiendo a Elendt y Bias (1990), ya que no son adecuadas las concentraciones de $\text{NaSiO}_3 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 y K_2HPO_4 dadas para la preparación de las soluciones madre.

Preparación del medio M7

13. Las soluciones madre (I) se preparan por separado cada una y a partir de ellas se prepara una solución madre combinada (II) (véase el cuadro 1). Se toman 50 ml de la solución madre combinada (II) junto con las cantidades de solución madre de cada macronutriente que se dan en el cuadro 2 y se llevan a 1 litro con agua desionizada para preparar el medio M7. Se prepara una solución madre de vitaminas añadiendo tres vitaminas a agua desionizada como se indica en el cuadro 3, y se añaden al medio M7 final 0,1 ml de la solución madre de vitaminas combinadas, poco antes de su empleo (la solución madre de vitaminas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas). El medio se aísla y se estabiliza.

BIBLIOGRAFÍA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Strelöke and H. Köpp. Berlin 1995.

Cuadro 1

Soluciones madre de oligoelementos para los medios M4 y M7

Soluciones madre (I)	Cantidad (mg) enrasada a 1 litro con agua desionizada	Para preparar la solución madre combinada (II): mezclar las siguientes cantidades (ml) de soluciones madre (I) y enrasar a 1 litro con agua desionizada		Concentraciones finales en las soluciones de ensayo (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Estas sustancias difieren en M4 y M7, como se indica más arriba.

(2) Estas soluciones se preparan por separado y después se juntan y se pasan por el autoclave inmediatamente.

Cuadro 2

Soluciones madre de macronutrientes para los medios M4 y M7

	Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg)	Cantidad de soluciones madre de macronutrientes añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l)	Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Cuadro 3

Solución madre de vitaminas para los medios M4 y M7. Las tres soluciones de vitaminas se combinan para formar una única solución madre de vitaminas

	Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg)	Cantidad de solución madre de vitaminas añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l)	Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l)
Clorhidrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFÍA:

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

Apéndice 3

PREPARACIÓN DEL SEDIMENTO ARTIFICIAL

Composición del sedimento

La composición del sedimento artificial debe ser la siguiente:

Componente	Características	% de sedimento en peso seco
Turba	Turba esfágnea, de pH lo más próximo posible a 5,5-6,0, sin restos vegetales visibles, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada al aire	4 - 5
Arena de cuarzo	Granulometría: > 50 % de las partículas deben encontrarse en la banda de 50-200 μm	75 - 76
Caolín	Contenido en caolinita ≥ 30 %	20
Carbono orgánico	Ajustado mediante adición de turba y arena	2 ($\pm 0,5$)
Carbonato de calcio	CaCO_3 , pulverizado, químicamente puro	0,05 - 0,1
Agua	Conductividad $\leq 10 \mu\text{S/cm}$	30 - 50

Preparación

La turba se seca al aire y se tritura hasta convertirse en un polvo fino. Se prepara en agua desionizada una suspensión de la cantidad necesaria de polvo de turba, utilizando un dispositivo de homogeneización de prestaciones elevadas. El pH de esta suspensión se ajusta a $5,5 \pm 0,5$ con CaCO_3 . La suspensión se deja durante al menos dos días con agitación suave a 20 ± 2 °C, para estabilizar el pH e implantar un componente microbiano estable. Se vuelve a medir el pH, que debe quedar a $6,0 \pm 0,5$. A continuación se mezcla la suspensión de turba con los demás componentes (arena y caolín) y con agua desionizada para obtener un sedimento homogéneo con un contenido de agua del 30-50 % del peso seco del sedimento. Se vuelve a medir el pH de la mezcla final y se ajusta a $6,5-7,5$ con CaCO_3 en caso necesario. Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el contenido en carbono orgánico. Se recomienda a continuación que el sedimento artificial, antes de emplearse en el ensayo de toxicidad para quirónomidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo.

Almacenamiento

Los componentes secos utilizados para preparar el sedimento artificial pueden almacenarse en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente. El sedimento (húmedo) ya preparado no debe almacenarse antes de su empleo en el ensayo. Debe utilizarse inmediatamente tras el tiempo de acondicionamiento de 7 días con que termina su preparación.

BIBLIOGRAFÍA:

Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

Apéndice 4

Características químicas aceptables del agua de dilución

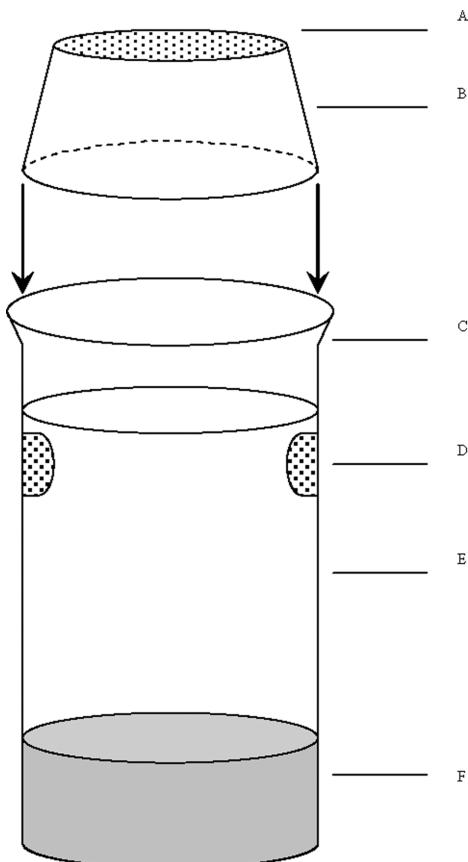
Sustancia	Concentraciones
Materia en partículas	< 20 mg/l
Carbono orgánico total	< 2 mg/l
Amoníaco no ionizado	< 1 µg/l
Dureza expresada en CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Plaguicidas organofosforados totales	< 50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgánico total	< 25 ng/l

(*) Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt).

Apéndice 5

Orientaciones para el seguimiento de la aparición de las larvas de quironómidos

Se ponen trampas de aparición en los vasos del ensayo. Estas trampas tienen que mantenerse desde el día 20 hasta el final del ensayo. A continuación figura el esquema de un ejemplo de trampa:



A: tamiz de nailon

D: accesos con tamiz para intercambio de agua

B: tazas de plástico invertidas

E: agua

C: vaso de exposición sin pico

F: sedimento

C. 28. ENSAYO DE TOXICIDAD PARA QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTOS-AGUA CON AGUA ENRIQUECIDA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 219 (2004). El presente método de ensayo está diseñado para evaluar los efectos de la exposición prolongada de sustancias sobre las larvas del díptero de agua dulce *Chironomus* sp., que viven en los sedimentos. Se basa principalmente en las directrices del BBA, que utiliza un sistema de ensayo sedimento-agua con suelo artificial, y una situación de exposición en la columna de agua (1). También tiene en cuenta los actuales protocolos de ensayo de toxicidad para *Chironomus riparius* y *Chironomus tentans* que se han elaborado en Europa y en América del Norte (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) y se han sometido a ensayos interlaboratorios (1) (6) (9). Pueden utilizarse asimismo otras especies de quironómidos bien documentadas como, por ejemplo, *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).
2. La situación de exposición empleada en el presente método de ensayo es el enriquecimiento del agua. La selección de la situación de exposición adecuada depende de la aplicación que se prevea para el ensayo. La situación de exposición en agua, que implica el enriquecimiento de la columna de agua, pretende simular un caso de aerosol errático de un plaguicida y comprende el pico inicial de concentraciones en el agua intersticial. También es útil para otros tipos de exposición (incluidos los vertidos de sustancias), salvo los procesos de acumulación que duren más que el período de ensayo.

3. Las sustancias que tienen que someterse a ensayo respecto a organismos que viven en los sedimentos suelen permanecer en este compartimento durante largos plazos. Los organismos que viven en los sedimentos pueden estar expuestos a través de varias vías de exposición. La importancia relativa de cada vía de exposición, y el tiempo que tarda cada una de ellas en contribuir a los efectos tóxicos generales, dependen de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia correspondiente. En el caso de las sustancias que se adsorben fuertemente (por ejemplo, con $\log K_{ow} > 5$) o en el de las sustancias que se unen covalentemente con el sedimento, la ingestión de alimentos contaminados puede constituir una vía de exposición significativa. A fin de no subestimar la toxicidad de sustancias muy lipofílicas, puede considerarse la adición de alimentos al sedimento antes de aplicar la sustancia problema. Para tener en cuenta todas las vías potenciales de exposición, el presente método de ensayo insiste en la exposición a largo plazo. La duración del ensayo está en la banda de 20 a 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui*, y de 28 a 65 días en el de *C. tentans*. Si se necesitan datos a un plazo más corto con algún fin específico como, por ejemplo, para investigar los efectos de sustancias inestables, es posible retirar réplicas paralelas adicionales tras un plazo de diez días.
4. Los parámetros medidos son el número total de adultos que aparecen y el tiempo transcurrido hasta la aparición. Se recomienda que las mediciones de supervivencia y crecimiento de las larvas no se hagan hasta que hayan pasado diez días si se necesitan datos adicionales a corto plazo, utilizando réplicas adicionales cuando convenga.
5. Se recomienda el uso de sedimentos artificiales, que presentan diversas ventajas sobre los sedimentos naturales:
 - se reduce la variabilidad experimental porque se constituye una "matriz normalizada" reproducible y desaparece la necesidad de conseguir fuentes de sedimentos limpios y no contaminados,
 - pueden iniciarse los ensayos en cualquier momento sin problemas de variabilidad estacional del sedimento en cuestión, y no es necesario aplicar ningún tratamiento previo al sedimento para eliminar la fauna endógena; el uso de un sedimento artificial reduce también el coste asociado con la recogida de campo de cantidades suficientes de sedimentos para los ensayos sistemáticos,
 - el uso de sedimento artificial permite comparar la toxicidad de las sustancias y clasificarlas en consecuencia: son comparables los datos de toxicidad obtenidos de ensayos realizados con sedimentos naturales y artificiales en relación con diversas sustancias (2).
6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Se exponen quironómidos de la primera fase del estado larvario a una serie de concentraciones de la sustancia problema en sistemas sedimento-agua. El ensayo se inicia poniendo larvas de primer estadio en vasos de ensayo que contienen el sistema sedimento-agua y a continuación se añade al agua la sustancia problema. Al final del ensayo se mide la tasa de aparición y de desarrollo de quironómidos. También es posible medir la supervivencia y el peso de las larvas a los 10 días en caso necesario, utilizando réplicas adicionales cuando proceda. Estos datos se analizan o bien usando un modelo de regresión para estimar la concentración que provocaría una reducción del x % en la aparición o en la supervivencia o el crecimiento de las larvas (por ejemplo, EC₁₅, EC₅₀, etc.), o bien realizando contrastes estadísticos de hipótesis para determinar la NOEC/LOEC. Esta última posibilidad exige la comparación de valores que tienen efectos con valores de control, utilizando pruebas estadísticas.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

8. Deben conocerse la hidrosolubilidad de la sustancia problema, su presión de vapor, su reparto medido o calculado en el sedimento y su estabilidad en el agua y en el sedimento. Para cuantificar la sustancia problema presente en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, debe disponerse de un método analítico fiable, cuya precisión y límite de detección sean conocidos y se indiquen. Entre la información útil se incluyen la fórmula estructural y la pureza de la sustancia problema. También es útil la información sobre el destino químico de la sustancia problema (por ejemplo, disipación, degradación abiótica y biótica, etc.). En la referencia 12 se ofrece más orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan la realización del ensayo.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

9. Puede realizarse periódicamente un ensayo con sustancias de referencia, para asegurarse de la fiabilidad del protocolo y de las condiciones del ensayo. Las siguientes sustancias son ejemplos de tóxicos de referencia utilizados con éxito en estudios interlaboratorios y de validación: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloruro de cadmio y cloruro de potasio (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDEZ DEL ENSAYO

10. Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

- la aparición de adultos en los controles no ha de ser inferior al 70 % al final del ensayo (1) (6),

- la aparición de adultos de *C. riparius* y *C. yoshimatsui* en los recipientes de control debe producirse cuando hayan transcurrido entre 12 y 23 días desde su introducción en los recipientes; en el caso de *C. tentans* es necesario un plazo de entre 20 y 65 días,
- al final del ensayo deben medirse en cada recipiente el pH y la concentración de oxígeno disuelto; la concentración de oxígeno debe ser al menos el 60 % del valor de saturación en el aire a la temperatura aplicada, y el pH del agua sobrenadante debe estar en el rango de 6 a 9 en todos los recipientes de ensayo,
- la temperatura del agua no debe variar en más de $\pm 1,0$ °C; la temperatura del agua podría controlarse mediante un espacio isotérmico y, en tal caso, debería confirmarse la temperatura ambiente de ese espacio a intervalos apropiados.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Recipientes de ensayo

11. El estudio se lleva a cabo en vasos de vidrio de 600 ml de capacidad y 8 cm de diámetro. Pueden utilizarse otros recipientes que garanticen una altura adecuada de sedimento y de agua sobrenadante. La superficie del sedimento debe ser suficiente para que correspondan de 2 a 3 cm² por larva. La proporción de la altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua sobrenadante debe ser de 1:4. Los recipientes de ensayo y demás instrumentos que hayan de entrar en contacto con el sistema de ensayo serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte como, por ejemplo, teflón.

Selección de las especies

12. La especie que debe usarse preferentemente en el ensayo es *Chironomus riparius*. También es adecuada la especie *Chironomus tentans*, pero resulta más difícil de manejar y requiere un período de ensayo más largo. Asimismo es posible utilizar *Chironomus yohimatsui*. En el apéndice 2 se da información sobre los métodos de cultivo de *Chironomus riparius*. También se dispone de información sobre las condiciones de cultivo de otras especies, como *Chironomus tentans* (4) y *Chironomus yohimatsui* (11). Hay que confirmar la identificación de la especie antes de realizar los ensayos, pero no es necesario hacerlo antes de cada ensayo si los organismos proceden de un cultivo del propio laboratorio.

Sedimento

13. Es preferible utilizar un sedimento artificial (también denominado formulado, reconstituido o sintético). Sin embargo, si se utiliza sedimento natural, deben determinarse sus características (al menos, el pH y el contenido de carbono, pero es recomendable incluir otros parámetros, como la relación C/N y la granulometría), y debe estar exento de toda contaminación y de otros organismos que pudieran competir con los quironómidos o consumirlos. También se recomienda que el sedimento natural, antes de emplearse en un ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo. Se recomienda utilizar en este ensayo (1) (15) (16) el siguiente sedimento artificial, basado en el suelo artificial empleado en el método de ensayo C.8 (14):

- a) 4-5 % de turba (peso seco): de pH lo más próximo posible a la banda 5,5-6,0; es importante utilizar turba en forma de polvo, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada solo al aire;
- b) 20 % de caolín (peso seco), con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;
- c) 75-76 % de arena de cuarzo (peso seco); debe predominar la arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm ;
- d) agua desionizada para obtener un contenido de humedad en la mezcla final en el rango de 30 a 50 %;
- e) carbonato de calcio de calidad químicamente pura (CaCO_3) añadido para ajustar el pH de la mezcla final del sedimento a $7,0 \pm 0,5$;
- f) el contenido de carbono orgánico de la mezcla final debe ser del 2 % ($\pm 0,5$ %), ajustado mediante el empleo de cantidades adecuadas de turba y arena, según las letras a) y c).

14. Debe conocerse el origen de la turba, del caolín y de la arena. Hay que comprobar que los componentes del sedimento no presentan contaminación química (por ejemplo, con metales pesados, compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, etc.). En el apéndice 3 se describe un ejemplo de preparación del sedimento artificial. Puede aceptarse también la mezcla de componentes secos si se demuestra que, tras la adición de agua sobrenadante, no se produce separación de los componentes del sedimento (por ejemplo, flotación de partículas de turba), y que la turba o el sedimento están suficientemente acondicionados.

Agua

15. Es adecuada como agua para el ensayo cualquier agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable según se indica en los apéndices 2 y 4. Puede utilizarse como agua de cultivo y agua de ensayo cualquier agua adecuada, agua natural (superficial o subterránea), agua reconstituida (véase el apéndice 2) o agua del grifo desclorada, siempre que los quirónómidos sobrevivan en ella durante las fases de cultivo y ensayo sin mostrar signos de presión. Al inicio del ensayo, el pH del agua de ensayo debe estar entre 6 y 9 y la dureza total no debe superar el valor de 400 mg/l en CaCO₃. Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt). Debe usarse el mismo tipo de agua a lo largo de todo el estudio. Las características de calidad del agua recogidas en el apéndice 4 deben medirse al menos dos veces al año o cuando se sospeche que pueden haber cambiado de forma significativa.

Soluciones madre — agua enriquecida

16. Las concentraciones de ensayo se calculan a partir de las concentraciones en la columna de agua, es decir, en el agua sobrenadante, que recubre al sedimento. Las soluciones de ensayo de las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución madre. A ser posible, estas soluciones madre deben prepararse disolviendo la sustancia en medio de ensayo. En algunos casos puede ser necesario utilizar disolventes o dispersantes para obtener una solución madre a la concentración deseada. Como ejemplos de disolventes adecuados pueden darse los siguientes: etanol, metanol, éter monometílico de etilenglicol, éter dimetílico de etilenglicol, dimetilformamida y trietilenglicol. Los dispersantes utilizables son Cremaphor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % y HCO-40. La concentración del agente solubilizante en el medio de ensayo final debe ser mínima (es decir, ≤ 0,1 ml/l) y la misma en todos los tratamientos. Si se emplea un agente solubilizante, no debe actuar de forma significativa sobre la supervivencia ni producir efectos nocivos visibles sobre las larvas de quirónómidos, lo cual ha de demostrarse en un lote de control que solo lleve disolvente. No obstante, debe hacerse todo lo posible por evitar el uso de dichas sustancias.

DISEÑO DEL ENSAYO

17. El diseño del ensayo se refiere a la selección del número de concentraciones de ensayo y al intervalo entre las mismas, al número de recipientes por concentración y al número de larvas por recipiente. Se describen los diseños para la estimación puntual de la EC y de la NOEC, así como para realizar un ensayo límite. Es preferible el análisis de regresión antes que el planteamiento de contrastes de hipótesis.

Diseño para análisis de regresión

18. La concentración con efecto (por ejemplo, EC₁₅, EC₅₀) y el rango de concentraciones en la que resulta interesante el efecto de la sustancia problema, tienen que estar abarcadas entre las concentraciones incluidas en el ensayo. En general, la exactitud y, sobre todo, la validez con la que pueden hacerse las estimaciones de las concentraciones con efecto (EC_x) mejoran cuando la concentración con efecto se encuentra dentro del rango de concentraciones ensayadas. Debe evitarse extrapolar muy por debajo de la menor concentración positiva o por encima de la concentración máxima. Es conveniente efectuar previamente un ensayo para seleccionar el rango de concentraciones que se deba utilizar (véase el punto 27).
19. Si ha de estimarse la EC_x, deben someterse a ensayo al menos cinco concentraciones y tres réplicas por cada concentración. En cualquier caso, es recomendable utilizar suficientes concentraciones de ensayo para poder hacer una buena estimación del modelo. El factor entre concentraciones no debe ser mayor que dos (puede permitirse una excepción en los casos en que la pendiente de la curva dosis-respuesta sea poco pronunciada). El número de réplicas de cada tratamiento puede reducirse si aumenta el número de concentraciones de ensayo con diferentes respuestas. El aumento del número de réplicas o la reducción del tamaño del intervalo entre concentraciones de ensayo tiende a estrechar los intervalos de confianza del ensayo. Si se han de estimar la supervivencia y el crecimiento de las larvas a los 10 días, es necesario emplear réplicas adicionales.

Diseño para estimar una NOEC/LOEC

20. Si hay que estimar la LOEC y/o la NOEC, se deben emplear cinco concentraciones de ensayo con un mínimo de cuatro réplicas y el factor entre concentraciones no debe exceder de dos. El número de réplicas debe ser suficiente para garantizar una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % (p = 0,05). Respecto a la tasa de desarrollo, suele ser adecuado un análisis de la varianza (ANOVA), como el ensayo de Dunnett o el de Williams (17) (18) (19) (20). Para la tasa de aparición, pueden emplearse el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (con la corrección de Bonferroni), o el método de Mantel-Haenszel.

Ensayo límite

21. Puede llevarse a cabo un ensayo límite (una sola concentración de ensayo y un control) si no se han observado efectos en el ensayo previamente efectuado para seleccionar la banda de concentraciones. El objetivo del ensayo límite es indicar que el valor tóxico de la sustancia problema es superior a la concentración límite estudiada. No es posible formular en el presente método de ensayo ninguna sugerencia de concentración recomendada; queda al criterio de las autoridades reguladoras. Generalmente hacen falta al menos seis réplicas tanto de las unidades de tratamiento como de las de control. Debe demostrarse una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % (p = 0,05). Con una respuesta métrica (tasa de desarrollo y peso), la prueba t es un método estadístico adecuado si los datos cumplen los requisitos de esta prueba (normalidad, varianzas homogéneas). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse la prueba t de varianzas desiguales o una prueba no paramétrica, tal como la de Wilcoxon-Mann-Whitney. En relación con la tasa de aparición de adultos es adecuada la prueba exacta de Fisher.

PROCEDIMIENTO

Condiciones de exposición

Preparación del sistema agua enriquecida-sedimento

22. Se añaden a los recipientes de ensayo cantidades adecuadas del sedimento artificial (véanse los puntos 13-14 y el apéndice 3) para formar una capa de al menos 1,5 cm. Se añade agua hasta una altura de 6 cm (véase el punto 15). La proporción de la altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua no debe ser mayor que 1:4, y la capa de sedimento no debe tener una altura mayor que 3 cm. El sistema sedimento-agua debe dejarse con aireación suave durante siete días antes de que se añadan los organismos de ensayo (véanse el punto 14 y el apéndice 3). Para evitar que se separen los ingredientes del sedimento y se resuspendan las partículas finas durante la adición del agua de ensayo a la columna de agua, puede cubrirse el sedimento con un disco de plástico mientras se vierte el agua encima, y retirar el disco inmediatamente a continuación. Puede ser adecuado también utilizar otros dispositivos.
23. Los recipientes de ensayo tienen que estar cubiertos (por ejemplo, con placas de vidrio). Cuando sea necesario, manténgase durante el estudio el volumen de agua inicial añadiendo agua para compensar la evaporación de esta. Para esta operación debe utilizarse agua destilada o desionizada para evitar la formación de sales.

Adición de los organismos de ensayo

24. Cuatro o cinco días antes de añadir los organismos de ensayo a los recipientes de ensayo, deben tomarse de los cultivos masas de huevos y ponerlas en recipientes pequeños con medio de cultivo. Puede utilizarse medio viejo del cultivo madre o medio recién preparado. Si se utiliza este último, debe añadirse una pequeña cantidad de alimento como, por ejemplo, algas verdes o unas gotitas de filtrado de una suspensión finamente molida de alimento para peces en copos (véase el apéndice 2). Solo deben utilizarse masas de huevos recién puestas. Normalmente, las larvas empiezan a salir de los huevos un par de días después de la puesta (de 2 a 3 días en el caso de *Chironomus riparius* a 20 °C y de 1 a 4 días en el de *Chironomus tentans* a 23 °C y en el de *Chironomus yoshimatsui* a 25 °C) y el crecimiento de las larvas tiene lugar en cuatro fases, cada una de entre 4 y 8 días de duración. En el ensayo deben utilizarse larvas de la primera fase (2-3 o 1-4 días tras la eclosión). La fase de los animales puede comprobarse midiendo la anchura de la cápsula cefálica (6).
25. Se asignan aleatoriamente veinte larvas de primera fase a cada recipiente de ensayo que contenga el sedimento enriquecido y el agua, utilizando una pipeta de punta romana. Es necesario detener la aireación del agua mientras se ponen las larvas en los recipientes de ensayo y mantener la situación durante otras 24 horas tras la adición de las larvas (véanse los puntos 24 y 32). Según el diseño de ensayo empleado (véanse los puntos 19 y 20), el número de larvas utilizadas por concentración es de al menos 60 para la estimación puntual de la EC y de 80 para la determinación de la NOEC.
26. A las veinticuatro horas de haber añadido las larvas, se pone la sustancia problema en la columna de agua sobrenadante, y se vuelve a aportar aireación leve. Utilizando una pipeta, se aplican pequeños volúmenes de las soluciones de la sustancia problema por debajo de la superficie del agua. A continuación debe mezclarse el agua sobrenadante, con cuidado de no alterar el sedimento.

Concentraciones de ensayo

27. Puede ser útil efectuar un ensayo preliminar para determinar el rango de concentraciones adecuadas para el ensayo definitivo. Con este fin se utiliza una serie de concentraciones de la sustancia problema, muy diferentes entre sí. A fin de proporcionar la misma densidad superficial por quirónomido que se vaya a emplear para el ensayo definitivo, se exponen los quirónomidos a cada concentración de la sustancia problema durante un plazo que permita la estimación de las concentraciones de ensayo adecuadas, y no hace falta utilizar réplicas.
28. Las concentraciones de ensayo para el ensayo definitivo se deciden sobre la base del resultado del ensayo de determinación del rango de concentraciones. Deben utilizarse al menos cinco concentraciones y seleccionarse como se describe en los puntos 18 a 20.

Controles

29. Deben incluirse en el ensayo, con el número adecuado de réplicas, recipientes de control sin sustancia problema pero con sedimento (véanse los puntos 19-20). Si se ha utilizado algún disolvente para aplicar la sustancia problema (véase el punto 16), debe añadirse un control del disolvente en el sedimento.

Sistema de ensayo

30. Se emplean sistemas estáticos. Pueden utilizarse en casos excepcionales sistemas semiestáticos o dinámicos con renovación intermitente o continua del agua sobrenadante, como, por ejemplo, si las especificaciones de calidad del agua se hacen inadecuadas para el organismo de ensayo o afectan al equilibrio químico (por ejemplo, cuando los niveles de oxígeno disuelto caen demasiado, la concentración de excrementos se eleva demasiado, o se lixivian minerales del sedimento con modificación del pH y/o de la dureza del agua). Sin embargo, normalmente será suficiente y preferible emplear otros métodos de mejora de la calidad del agua sobrenadante, como la aireación.

Alimentación

31. Es necesario alimentar a las larvas, de preferencia una vez al día o, al menos, tres veces por semana. Parece adecuada una ración diaria de comida para peces (suspensión en agua o comida finamente molida como, por ejemplo, Tetra-Min o Tetra-Phyll; véanse detalles en el apéndice 2), de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg para *C. yoshimatsui*) por larva durante los 10 primeros días. Las larvas de más edad pueden necesitar algo más de comida: entre 0,5 y 1 mg por larva al día debería ser suficiente durante el resto del ensayo. La ración alimentaria debe reducirse en todos los tratamientos y controlarse si se observa crecimiento de hongos o si se aprecia mortalidad en los controles. Si no puede detenerse el desarrollo fúngico, hay que repetir el ensayo. Cuando se someten a ensayo sustancias muy adsorbentes (por ejemplo, con $\log K_{ow} > 5$), o hay sustancias que se unen covalentemente al sedimento, es posible añadir al sedimento artificial, antes del período de estabilización, la cantidad de comida necesaria para garantizar la supervivencia y el crecimiento natural de los organismos. Con este objetivo, debe utilizarse material vegetal en lugar de la comida para peces, por ejemplo, adición de 0,5 % (peso seco) de hojas finamente molidas de ortiga mayor (*Urtica dioica*), morera (*Morus alba*), trébol blanco (*Trifolium repens*), espinaca (*Spinacia oleracea*) u otro material vegetal (*Cerophyl* o alfa-celulosa).

Condiciones de incubación

32. Se aporta aireación suave al agua sobrenadante de los recipientes de ensayo, preferentemente a las 24 h de la adición de las larvas, y se continúa a lo largo de todo el ensayo (debe tenerse cuidado para que la concentración de oxígeno disuelto no caiga por debajo del 60 % del valor de saturación en el aire). La aireación se aporta mediante una pipeta Pasteur de vidrio fijada a 2-3 cm por encima del nivel del sedimento, con el ritmo de una o unas pocas burbujas por segundo. Cuando se someten a ensayo sustancias volátiles, debe considerarse el no airear el sistema sedimento-agua.
33. El ensayo se efectúa a la temperatura constante de 20 °C (± 2 °C). En el caso de *C. tentans* y de *C. yoshimatsui*, las temperaturas recomendadas son de 23 °C y 25 °C (± 2 °C), respectivamente. Se usa un fotoperíodo de 16 h, con una intensidad luminosa de 500 a 1 000 lux.

Duración de la exposición

34. La exposición comienza con la adición de larvas a los recipientes enriquecidos y a los de control. La duración máxima del ensayo es de 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui*, y de 65 días en el de *C. tentans*. Si los dípteros aparecen antes, es posible terminar el ensayo tras un mínimo de cinco días desde la aparición del último adulto en los recipientes de control.

OBSERVACIONES

Aparición de adultos

35. Se determinan el tiempo de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras que aparecen completamente. Los machos se identifican fácilmente por sus antenas plumosas.
36. Hay que observar los recipientes de ensayo al menos tres veces por semana para hacer una evaluación visual de los eventuales comportamientos anormales (por ejemplo, dejar el sedimento, nadar de forma inusual) respecto al control. Durante el tiempo en que se prevea que ha de ocurrir la aparición es necesario efectuar un recuento diario de los dípteros aparecidos. Se registran cada día el sexo y el número de los dípteros aparecidos completamente. Tras su identificación, se sacan los dípteros de los recipientes. Las eventuales masas de huevos puestas antes de la terminación del ensayo deben anotarse y después retirarse para evitar la reintroducción de larvas en el sedimento. También debe registrarse el número de pupas visibles de las que no han llegado a aparecer adultos. En el apéndice 5 se dan orientaciones sobre la medición de la aparición de los dípteros.

Crecimiento y supervivencia

37. Si han de proporcionarse datos sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas a los 10 días, deben incluirse desde el principio recipientes de ensayo adicionales, de forma que puedan utilizarse después. El sedimento de estos recipientes adicionales se filtra a través de un tamiz de 250 µm para retener las larvas. Los criterios para determinar la muerte son la inmovilidad o la ausencia de reacción ante un estímulo mecánico. Las larvas no recuperadas deben contarse asimismo como muertas (las larvas que hayan muerto al inicio del ensayo pueden haber sido degradadas por los microbios). Se determina el peso seco (libre de cenizas) de las larvas supervivientes por recipiente de ensayo y se calcula el peso seco individual medio por recipiente. Es útil determinar a qué fase pertenecen las larvas supervivientes; para obtener este dato puede utilizarse la medición de la anchura de la cápsula céfálica de cada individuo.

Mediciones analíticas

Concentración de la sustancia problema

38. Como mínimo, deben analizarse muestras del agua sobrenadante, del agua intersticial y del sedimento al inicio (preferentemente una hora tras la aplicación de la sustancia problema) y al final del ensayo, a la concentración máxima y a una inferior. Estas determinaciones de la concentración de la sustancia problema informan sobre el comportamiento y el reparto de la sustancia problema en el sistema agua-sedimento. La toma de muestras del sedimento al inicio del ensayo puede influir en el sistema de ensayo (por ejemplo, eliminando larvas

del ensayo), por lo que deberían emplearse recipientes de ensayo adicionales para realizar las determinaciones analíticas al inicio y durante el ensayo cuando sea apropiado (véase el punto 39). Puede no ser necesario efectuar mediciones en el sedimento si se ha determinado claramente el reparto de la sustancia problema entre el agua y el sedimento en un estudio agua/sedimento en condiciones comparables (por ejemplo, proporción entre sedimento y agua, tipo de aplicación, contenido en carbono orgánico del sedimento).

39. Cuando se hagan mediciones intermedias (por ejemplo, el día nº 7) y si los análisis necesitan grandes muestras que no puedan tomarse de los recipientes de ensayo sin influir en el sistema de ensayo, las determinaciones analíticas deben llevarse a cabo con muestras de recipientes de ensayo adicionales tratados de la misma manera (incluida la presencia de los organismos de ensayo) pero que no se utilizan para las observaciones biológicas.
40. El procedimiento recomendado para aislar el agua intersticial es la centrifugación, por ejemplo a 10 000 g y 4 °C durante 30 min. Sin embargo, si se demuestra que la sustancia problema no se adsorbe a los filtros, también puede aceptarse la filtración. En algunos casos puede resultar imposible analizar las concentraciones en el agua intersticial debido a que el tamaño de la muestra es demasiado pequeño.

Parámetros fisicoquímicos

41. Deben medirse de la manera adecuada el pH, el oxígeno disuelto en el agua de ensayo y la temperatura de los recipientes de ensayo (véase el punto 10). Hay que medir la dureza y el amoníaco en los controles y en un recipiente de ensayo a la concentración máxima, al inicio y al final del ensayo.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

42. El objetivo de este ensayo es determinar el efecto de la sustancia problema sobre la tasa de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras completamente aparecidos o, en el caso de los efectos del ensayo de 10 días, sobre la supervivencia y el peso de las larvas. Si no hay ninguna señal de sensibilidades estadísticamente diferentes según los sexos, pueden agruparse los resultados de machos y de hembras a efectos de análisis estadísticos. Las diferencias de sensibilidad entre los sexos pueden evaluarse estadísticamente mediante, por ejemplo, una prueba de tabla de contingencia de χ^2 -r × 2 cuadro. Cuando así se requiera, habrá que determinar la supervivencia de las larvas y su peso seco individual medio por recipiente al cabo de 10 días.
43. Las concentraciones que tienen efecto, expresadas como concentraciones en el agua sobrenadante, se calculan preferentemente a partir de las concentraciones medidas al inicio del ensayo (véase el punto 38).
44. A efectos de computar una estimación puntual para la EC₅₀ o cualquier otra EC_x, las estadísticas por recipiente pueden utilizarse como réplicas verdaderas. Al calcular el intervalo de confianza para cualquier EC_x, debe tenerse en cuenta la variabilidad entre recipientes, o bien hay que mostrar que esta variabilidad es tan pequeña que puede despreciarse. Cuando el modelo sigue el método de los mínimos cuadrados, debe aplicarse una transformación estadística por cada recipiente a fin de mejorar la homogeneidad de la varianza. Sin embargo, los valores de EC_x deben calcularse después de haber vuelto a transformar la respuesta al valor original.
45. Cuando el análisis estadístico se dirige a determinar la NOEC/LOEC mediante contrastes de hipótesis, es necesario tener en cuenta la variabilidad entre recipientes, por ejemplo mediante un análisis de varianza anidado. También puede ser adecuado realizar ensayos más robustos (21) en situaciones en que no se cumplen las hipótesis de los análisis de varianza usuales.

Tasa de aparición

46. Las tasas de aparición son datos cuantales y pueden ser analizados por el método de Cochran-Armitage aplicado con ajuste secuencial de residuos cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y estos datos son coherentes con dicha previsión. En caso contrario, puede utilizarse una prueba exacta de Fisher o el método de Mantel-Haenszel con los valores p ajustados según Bonferroni-Holm. Si hay pruebas de que la variabilidad entre réplicas dentro de la misma concentración es mayor de lo que indicaría una distribución binomial (lo que se señala generalmente como variación "extrabinomial"), hay que utilizar un método de Cochran-Armitage o una prueba exacta de Fisher robustos (como se propone en el punto 21).
47. Se determina la suma de dípteros aparecidos por recipiente, n_e, y se divide por el número de larvas introducidas, n_a:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

donde:

ER = tasa de aparición

n_e = número de dípteros aparecidos por recipiente

n_a = número de larvas introducidas por recipiente

48. Otra posibilidad más adecuada para las muestras de gran tamaño, cuando hay variación extrabinomial, consiste en tratar la tasa de aparición como una respuesta continua y emplear procedimientos tales como la prueba de Williams cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y es coherente con estos datos de tasa de aparición. La prueba de Dunnnett sería apropiada si no se mantuviera la monotonía. Se define aquí como muestra de gran tamaño la que corresponde a la situación en que tanto el número de dípteros emergidos como el número de no emergidos es superior a cinco, por réplica (recipiente).
49. Para aplicar los métodos de análisis de la varianza, hay que transformar primero los valores de la tasa de aparición mediante la transformación arcoseno de la raíz cuadrada o la transformación de Freeman-Tukey para obtener una distribución normal aproximada y uniformizar las varianzas. Cuando se usan las frecuencias absolutas es posible aplicar el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (Bonferroni) o el método de Mantel-Haenszel. La transformación arcoseno de la raíz cuadrada se aplica tomando el arcoseno (sen^{-1}) de la raíz cuadrada de la tasa de aparición.
50. Respecto a las tasas de aparición, los valores de EC_x se calculan mediante análisis de regresión (o, por ejemplo, probit (22), logit, Weibull, programas comerciales apropiados, etc.). Si no sirve el análisis de regresión (por ejemplo, cuando hay menos de dos respuestas parciales), se utilizan otros métodos no paramétricos, tales como la media móvil o la interpolación simple).

Tasa de desarrollo

51. El tiempo medio de desarrollo corresponde al intervalo medio de tiempo entre la introducción de las larvas (día 0 del ensayo) y la aparición de la cohorte experimental de dípteros (para el cálculo del tiempo de desarrollo verdadero debe tenerse en cuenta la edad de las larvas en el momento de su introducción). La tasa de desarrollo es la inversa del tiempo de desarrollo (unidades: 1/día) y corresponde a la porción de desarrollo larvario que se produce en un día. Es preferible utilizar la tasa de desarrollo para evaluar estos estudios de toxicidad en los sedimentos, ya que su varianza es menor y es más homogénea y próxima a la distribución normal que el tiempo de desarrollo. Por tanto, pueden usarse procedimientos de ensayos paramétricos potentes más con la tasa de desarrollo que con el tiempo de desarrollo. Considerando la tasa de desarrollo como respuesta continua, es posible estimar valores de EC_x mediante análisis de regresión [por ejemplo, (23) (24)].
52. En relación con las siguientes pruebas estadísticas, se supone que el número de dípteros observados en el día de inspección x ha aparecido a la media del intervalo de tiempo entre el día x y el día $x - 1$ (l = longitud del intervalo de inspección, que es normalmente de 1 día). La tasa de desarrollo media por recipiente (\bar{x}) se calcula con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

donde:

- \bar{x} : tasa de desarrollo media por recipiente,
- i : índice del intervalo de inspección,
- m : número máximo de intervalos de inspección,
- f_i : número de dípteros aparecidos en el intervalo de inspección i ,
- n_e : número total de dípteros aparecidos al final del experimento ($= \sum f_i$),
- x_i : tasa de desarrollo de los dípteros aparecidos en el intervalo i ,

$$x_i = 1 / \left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

donde:

- day_i : día de inspección (días desde la aplicación),
- l_i : longitud del intervalo de inspección i (en días, generalmente 1 día).

Informe del ensayo

53. El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

Sustancia problema:

- Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (hidrosolubilidad, presión de vapor, coeficiente de reparto en el suelo (o en el sedimento, si se conoce), estabilidad en el agua, etc.).
- Datos de identificación química (nombre común, nombre químico, fórmula estructural, número CAS, etc.), incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia problema.

Especie de ensayo:

- Animales utilizados en el ensayo: especie, nombre científico, origen de los organismos y condiciones de cría.
- Información sobre la manipulación de las masas de huevos y de las larvas.
- Edad de los animales de ensayo cuando se introducen en los recipientes de ensayo.

Condiciones de ensayo:

- Sedimento utilizado, es decir, si es natural o artificial.
- En el caso del sedimento natural, ubicación y descripción del lugar de muestreo del sedimento, incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación; características: pH, contenido de carbono orgánico, relación C/N y granulometría (cuando sea apropiado).
- Preparación del sedimento artificial: ingredientes y características (contenido de carbono orgánico, pH, humedad, etc., al inicio del ensayo).
- Preparación del agua de ensayo (si se utiliza agua reconstituida) y características (concentración de oxígeno, pH, conductividad, dureza, etc., al inicio del ensayo).
- Altura del sedimento y del agua sobrenadante.
- Volumen del agua sobrenadante y del agua intersticial, peso del sedimento húmedo con y sin agua intersticial.
- Recipientes de ensayo (material y tamaño).
- Método de preparación de soluciones madre y concentraciones de ensayo.
- Aplicación de la sustancia problema: concentraciones de ensayo utilizadas, número de réplicas y empleo eventual de disolvente.
- Condiciones de incubación: temperatura, intensidad y ciclo de luz, aireación (frecuencia e intensidad).
- Información detallada sobre la alimentación de los animales, incluidos el tipo de alimento, la preparación, la cantidad y el régimen alimentario.

Resultados:

- Concentraciones de ensayo nominales, concentraciones de ensayo medidas y resultados de todos los análisis efectuados para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo.
- Calidad del agua de los recipientes de ensayo, es decir, pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza y amoníaco.
- Sustitución del agua de ensayo evaporada, en su caso.
- Número de dípteros machos y hembras aparecidos por recipiente y por día.
- Número de larvas que no han aparecido como dípteros por recipiente.
- Peso seco individual medio de las larvas por recipiente, y por fase, en caso apropiado.
- Porcentaje de apariciones por réplica y concentración de ensayo (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).
- Tasa de desarrollo media de los dípteros aparecidos completamente por réplica y tasa de tratamiento (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).
- Estimación de los parámetros de toxicidad como, por ejemplo, EC_x (con intervalos de confianza asociados), NOEC y/o LOEC, y métodos estadísticos empleados para su determinación.
- Discusión de los resultados del ensayo, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Strelöke and H. Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- (3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- (4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp. 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- (5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- (6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- (7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- (8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- (9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- (10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.
- (11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.
- (12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.
- (13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.
- (14) Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.
- (15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.
- (16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.
- (17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121.

-
- (18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20: 482-491.
- (19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27: 103-117.
- (20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28: 510-531.
- (21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. *Biometrics* 48:577-585.
- (22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. *Water Research* 18: 213-221.
- (23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11:1485-1494.
- (24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. *Toxicol. Sci.* 66: 298-312.

Apéndice 1

DEFINICIONES

A efectos del presente método, se aplicarán las siguientes definiciones por:

Sedimento artificial (o sedimento reconstituido, formulado o sintético): mezcla de materiales empleada para imitar los componentes físicos de un sedimento natural.

Agua sobrenadante: el agua situada sobre el sedimento en el recipiente de ensayo.

Agua intersticial: el agua que ocupa el espacio entre el sedimento y las partículas del suelo.

Agua enriquecida: el agua a la que se ha añadido sustancia problema.

Sustancia problema: toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

Apéndice 2

Recomendaciones para el cultivo de *Chironomus riparius*

1. Las larvas de *Chironomus* pueden criarse en cristalizadores o en recipientes más grandes. Sobre el fondo del recipiente se extiende arena de cuarzo fina, en una capa delgada de unos 5 a 10 mm de espesor. Se ha comprobado que la tierra de diatomeas (por ejemplo, Merck, Art 8117) también constituye un sustrato adecuado (es suficiente una capa más fina, de muy pocos milímetros). A continuación se añade agua adecuada hasta una altura de varios centímetros. Los niveles deben mantenerse rellenando con agua en la medida necesaria para compensar las pérdidas por evaporación y evitar la desecación. En caso necesario, es posible sustituir el agua. Debe aportarse una aireación suave. Los recipientes de cría de las larvas deben mantenerse en una jaula adecuada para evitar que se escapen los adultos. La jaula debe ser lo suficientemente grande como para permitir el enjambrado de los adultos aparecidos, ya que en caso contrario puede que no haya copulación (las dimensiones mínimas son de unos 30 × 30 × 30 cm).
2. Las jaulas deben mantenerse a temperatura ambiente o en una zona de ambiente constante a 20 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz (de intensidad alrededor de 1 000 lux) y 8 horas de oscuridad. Se ha comunicado que una humedad relativa del aire de menos del 60 % puede impedir la reproducción.

Agua de dilución

3. Puede emplearse cualquier agua natural o sintética que sea adecuada. Se suelen utilizar agua de pozo, agua del grifo desclorada y medios artificiales (como, por ejemplo, medio M4 o M7 de Elendt, véase más abajo). Es necesario airear el agua antes de emplearla. En caso necesario, el agua de cultivo puede renovarse sacando cuidadosamente, por vertido o con sifón, el agua usada de los recipientes de cultivo, sin destruir los tubos de las larvas.

Alimentación de las larvas

4. Las larvas de *Chironomus* deben alimentarse con comida para peces en copos (Tetra Min®, Tetra Phyll® u otra marca similar de comida comercial para peces), al ritmo de aproximadamente 250 mg por recipiente al día. Puede administrarse como polvo molido seco o como suspensión en agua: se añade 1,0 g de comida en copos a 20 ml de agua de dilución y se mezcla para obtener un resultado homogéneo. Esta preparación puede administrarse al ritmo de unos 5 ml por recipiente al día y ha de agitarse antes de usarse. Las larvas más viejas pueden recibir más cantidad.
5. La alimentación se ajusta según la calidad del agua. Si el medio de cultivo se pone turbio, hay que reducir la alimentación. Es necesario supervisar cuidadosamente la adición de comida. Si la comida es demasiado escasa, se provocará la emigración de las larvas hacia la columna de agua, mientras que si es excesiva aumentará la actividad microbiana y se reducirá la concentración de oxígeno. Ambas situaciones pueden producir un descenso de la tasa de crecimiento.
6. Es posible añadir también algunas células de algas verdes (como, por ejemplo, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) cuando se establecen recipientes de cultivo nuevos.

Alimentación de los adultos aparecidos

7. Algunos experimentadores han sugerido que un disco de algodón empapado en una solución saturada de sacarosa puede servir de alimento para los adultos aparecidos.

Aparición de adultos

8. A 20 ± 2 °C, los adultos empiezan a aparecer en los recipientes de cría de larvas a los 13-15 días aproximadamente. Los machos se distinguen fácilmente porque tienen antenas plumosas.

Masas de huevos

9. Una vez haya adultos en la jaula de cría, deben supervisarse todos los recipientes de cría de larvas tres veces por semana para observar la puesta de masas gelatinosas de huevos. Cuando se encuentren, las masas de huevos deben retirarse cuidadosamente y transferirse a una pequeña placa que contenga una muestra del agua de cría. Las masas de huevos se emplean para iniciar un nuevo recipiente de cultivo (por ejemplo, 2-4 masas de huevos por recipiente) o para los ensayos de toxicidad.
10. Las larvas en primer estadio deben salir de los huevos al cabo de 2 – 3 días.

Establecimiento de nuevos recipientes de cultivo

11. Cuando se hayan establecido los cultivos, debe ser posible establecer un nuevo recipiente de cultivo de larvas cada semana o con menos frecuencia, según los requisitos de cultivo, eliminando los recipientes más viejos una vez han aparecido los dípteros adultos. Con este sistema, se obtendrá un suministro regular de adultos, con una gestión mínima.

Preparación de las soluciones de ensayo M4 y M7

12. Elendt (1990) describió el medio M4. El M7 se prepara como el medio M4, salvo en lo relativo a las sustancias indicadas en el cuadro 1, cuyas concentraciones son cuatro veces más bajas en el medio M7 que en el M4. Se está preparando una publicación sobre el medio M7 (Elendt, comunicación personal). La solución de ensayo no debe prepararse siguiendo a Elendt y Bias (1990), ya que no son adecuadas las concentraciones de $\text{NaSiO}_3 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 y K_2HPO_4 dadas para la preparación de las soluciones madre.

Preparación del medio M7

13. Las soluciones madre (I) se preparan por separado cada una y a partir de ellas se prepara una solución madre combinada (II) (véase el cuadro 1). Se toman 50 ml de la solución madre combinada (II) junto con las cantidades de solución madre de cada macronutriente que se dan en el cuadro 2 y se enrasa a 1 litro con agua desionizada para preparar el medio M7. Se prepara una solución madre de vitaminas añadiendo tres vitaminas a agua desionizada como se indica en el cuadro 3, y se añaden al medio M7 final 0,1 ml de la solución madre de vitaminas combinadas, poco antes de su empleo (la solución madre de vitaminas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas). El medio se aísla y se estabiliza.

Cuadro 1

Soluciones madre de oligoelementos para los medios M4 y M7

Soluciones madre (I)	Cantidad (mg) enrasada a 1 litro con agua desionizada	Para preparar la solución madre combinada (II): mezclar las siguientes cantidades (ml) de soluciones madre (I) y enrasar a 1 litro con agua desionizada		Concentraciones finales en las soluciones de ensayo (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Estas sustancias difieren en M4 y M7, como se indica más arriba.

(2) Estas soluciones se preparan por separado y después se juntan y se pasan por el autoclave inmediatamente.

Cuadro 2

Soluciones madre de macronutrientes para los medios M4 y M7

	Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg)	Cantidad de soluciones madre de macronutrientes añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l)	Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3

	Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg)	Cantidad de soluciones madre de macronutrientes añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l)	Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l)
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

Cuadro 3

Solución madre de vitaminas para los medios M4 y M7

Las tres soluciones de vitaminas se combinan para formar una única solución madre de vitaminas.

	Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg)	Cantidad de solución madre de vitaminas añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l)	Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l)
Clorhidrato de tiamina	750	0,1	0,075
Cianocobalamina (B12)	10	0,1	0,0010
Biotina	7,5	0,1	0,00075

BIBLIOGRAFÍA:

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Strelöke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157-1167.

Apéndice 3

PREPARACIÓN DEL SEDIMENTO ARTIFICIAL

Composición del sedimento

La composición del sedimento artificial debe ser la siguiente:

Componente	Características	% de sedimento en peso seco
Turba	Turba esfágnea, de pH lo más próximo posible a 5,5-6,0, sin restos vegetales visibles, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada al aire	4-5
Arena de cuarzo	Granulometría: > 50 % de las partículas deben encontrarse en la banda de 50-200 μm	75-76
Caolín	Contenido en caolinita ≥ 30 %	20
Carbono orgánico	Ajustado mediante adición de turba y arena	2 ($\pm 0,5$)
Carbonato de calcio	CaCO_3 , pulverizado, químicamente puro	0,05 - 0,1
Agua	Conductividad $\leq 10 \mu\text{S/cm}$	30 - 50

Preparación

La turba se seca al aire y se tritura hasta convertirse en un polvo fino. Se prepara en agua desionizada una suspensión de la cantidad necesaria de polvo de turba, utilizando un dispositivo de homogeneización de prestaciones elevadas. El pH de esta suspensión se ajusta a $5,5 \pm 0,5$ con CaCO_3 . La suspensión se deja durante al menos dos días con agitación suave a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, para estabilizar el pH e implantar un componente microbiano estable. Se vuelve a medir el pH, que debe quedar a $6,0 \pm 0,5$. A continuación se mezcla la suspensión de turba con los demás componentes (arena y caolín) y con agua desionizada para obtener un sedimento homogéneo con un contenido de agua del 30-50 % del peso seco del sedimento. Se vuelve a medir el pH de la mezcla final y se ajusta a $6,5-7,5$ con CaCO_3 en caso necesario. Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el contenido en carbono orgánico. Se recomienda a continuación que el sedimento artificial, antes de emplearse en el ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo.

Almacenamiento

Los componentes secos utilizados para preparar el sedimento artificial pueden almacenarse en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente. El sedimento (húmedo) ya preparado no debe almacenarse antes de su empleo en el ensayo. Debe utilizarse inmediatamente tras el tiempo de acondicionamiento de 7 días con que termina su preparación.

BIBLIOGRAFÍA:

Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

Apéndice 4

Características químicas aceptables del agua de dilución

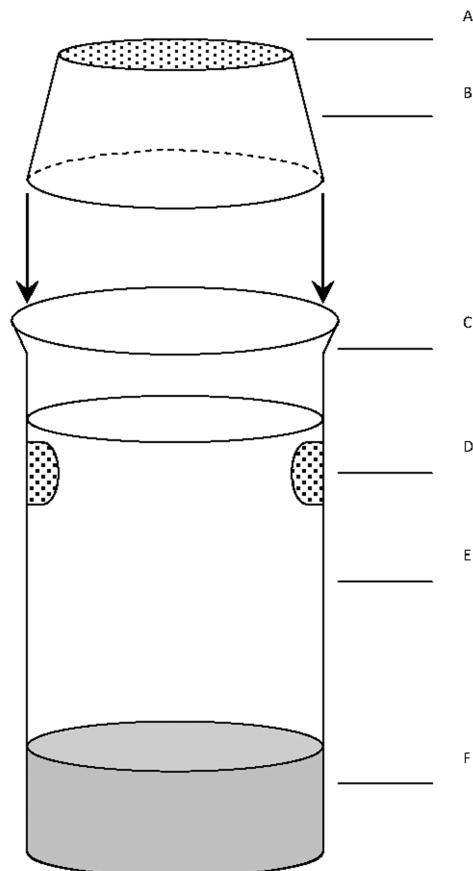
Sustancia	Concentraciones
Materia en partículas	< 20 mg/l
Carbono orgánico total	< 2 mg/l
Amoníaco no ionizado	< 1 µg/l
Dureza expresada en CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Cloro residual	< 10 µg/l
Plaguicidas organofosforados totales	< 50 ng/l
Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados	< 50 ng/l
Cloro orgánico total	< 25 ng/l

(*) Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt).

Apéndice 5

Orientaciones para el seguimiento de la aparición de las larvas de quironómidos

Se ponen trampas de aparición en los vasos del ensayo. Estas trampas tienen que mantenerse desde el día 20 hasta el final del ensayo. A continuación figura el esquema de un ejemplo de trampa:



A: tamiz de nailon
 B: tazas de plástico invertidas
 C: vaso de exposición sin pico

D: mirilla de tamiz para intercambio de agua
 E: agua
 F: sedimento

C.29. BIODEGRADABILIDAD FÁCIL—CO₂ EN RECIPIENTES SELLADOS (ENSAYO DEL ESPACIO DE CABEZA)

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 310 (2006). El presente método de ensayo es un método exploratorio para la evaluación de la biodegradabilidad fácil de las sustancias y aporta información similar a los seis métodos de ensayo descritos en el capítulo C.4-A a F del presente anexo. Por tanto, una sustancia que tenga resultados positivos con el presente método de ensayo puede considerarse fácilmente biodegradable y, en consecuencia, rápidamente degradable en el medio ambiente.
2. Normalmente, la primera opción para someter a ensayo las sustancias poco solubles y las que se adsorben mucho ha sido el reconocido método del dióxido de carbono (CO₂) (1), basado en el ensayo original de Sturm (2) para evaluar la biodegradabilidad de las sustancias orgánicas, mediante la medición del dióxido de carbono producido por la acción microbiana. También se ha elegido para sustancias solubles (pero no volátiles), ya que el desprendimiento de dióxido de carbono es ampliamente considerado como la única prueba inequívoca de actividad microbiana. La eliminación del carbono orgánico disuelto puede verse afectada por procesos fisico-químicos, como la adsorción, la volatilización, la precipitación o la hidrólisis, así como por la actividad microbiana, y son muchas las reacciones no biológicas que consumen oxígeno, mientras que es raro que se produzca CO₂ a partir de sustancias orgánicas de forma abiotípica. En el ensayo de Sturm, tanto original como

modificado (1) (2), el CO₂ pasa de la fase líquida a los recipientes absorbentes por arrastre (es decir, burbujeando aire tratado a través del medio líquido para eliminar el CO₂), mientras que en la versión de Larson (3) (4) el CO₂ se transfiere desde el recipiente de reacción a los absorbentes pasando aire exento de CO₂ a través del espacio de cabeza y, de forma adicional, sacudiendo continuamente el recipiente de ensayo. El recipiente de reacción se sacude solo en la modificación de Larson; la agitación se especifica solo para sustancias insolubles en la norma ISO 9439 (5) y en la versión original de EE. UU. (6), y en estas dos normas se especifica el arrastre en lugar de la sustitución del espacio de cabeza. En otro método oficial de la EPA norteamericana (7), basado en el método de Gledhill (8), el recipiente de reacción sacudido está cerrado a la atmósfera y el CO₂ producido se recoge en una trampa alcalina interna directamente desde la fase gaseosa, como en los frascos del respirómetro clásico de Warburg/Barcroft.

3. Sin embargo, se ha demostrado que se acumula carbono inorgánico (CI) en el medio durante la aplicación del ensayo de Sturm normal y modificado a una serie de sustancias (9). Durante la degradación de 20 mg C/l de anilina se encontró una concentración de CI de hasta 8 mg/l. Así pues, la recogida de CO₂ en las trampas alcalinas no refleja fielmente la cantidad de CO₂ producida por los microorganismos en fases intermedias de la degradación. Como resultado, la especificación de que > 60 % de la producción máxima teórica de CO₂ (CO₂T) debe recogerse dentro de un período de observación de 10 días (los 10 días inmediatamente siguientes a la consecución del 10 % de la biodegradación) para que una sustancia problema se clasifique como fácilmente biodegradable, no se cumplirá en el caso de ciertas sustancias que sí se clasificarían en esa categoría si se utilizara el método de la eliminación del carbono orgánico disuelto (COD).
4. Cuando el porcentaje de degradación es menor que el valor previsto, es posible que se acumule CI en la solución de ensayo. En tales casos, la degradabilidad puede evaluarse con los otros ensayos de biodegradabilidad fácil.
5. Otros inconvenientes de la metodología de Sturm (que es engorrosa, exige mucho tiempo, se presta más al error experimental y no es aplicable a las sustancias volátiles) ya antes habían incitado a buscar una técnica de recipiente cerrado, distinta de la Geldhill, en lugar del burbujeo de gas (10) (11). Boatman *et al* (12) revisaron los métodos anteriores y adoptaron un sistema de espacio de cabeza cerrado en el que se desprendía el CO₂ a ese espacio al final de la incubación, al acidificar el medio. El CO₂ se midió analizando el carbono inorgánico mediante cromatografía de gases (GC) en muestras tomadas de forma automática en el espacio de cabeza, pero sin tener en cuenta el carbono inorgánico disuelto (CID) en la fase líquida. Además, los recipientes empleados eran muy pequeños (20 ml), con tan solo 10 ml de medio, lo que provocaba problemas, por ejemplo cuando se añadían las cantidades necesariamente muy pequeñas de sustancias problema insolubles, o en el medio inoculado podía no haber microorganismos competentes (o no haberlos en número suficiente) para degradar las sustancias problema.
6. Estas dificultades se han vencido mediante los estudios independientes de Struijs y Stoltenkamp (13) y de Birch y Fletcher (14), el último de los cuales se inspiró en su experiencia con los aparatos utilizados en el ensayo de degradación anaeróbica (15). En el primer método (13) se mide el CO₂ en el espacio de cabeza tras acidificación y equilibrado, mientras que en el segundo (14) el CID se mide tanto en la fase gaseosa como en la líquida, sin tratamiento; más del 90 % del CI formado se encontraba en la fase líquida. Ambos métodos aportan al ensayo de Sturm en el sentido de que su sistema de ensayo es más compacto y manejable, es posible utilizarlos con sustancias químicas y evitan la posibilidad de retrasos en la medición del CO₂ producido.
7. Los dos enfoques se combinaron en la norma ISO sobre el CO₂ en el espacio de cabeza (16), que se sometió a un estudio interlaboratorios (17), y es esta norma la que forma la base del presente método de ensayo. De forma similar, los dos enfoques se han utilizado en el método de la EPA de EE. UU. (18). Se han recomendado dos métodos de medición del CO₂, a saber, el CO₂ en el espacio de cabeza previa acidificación (13) y el CI en la fase líquida tras la adición de un exceso de álcali. Este último método fue introducido por Peterson durante el ensayo interlaboratorios CONCAWE (19) de este método de espacio de cabeza modificado para medir la biodegradabilidad intrínseca. Los cambios efectuados en la revisión de 1992 (20) de los métodos del capítulo C.4 del presente anexo para estudiar la biodegradabilidad fácil se han incorporado al presente método de ensayo, de forma que, por lo demás, las condiciones (medio, duración, etc.) son las mismas que en el ensayo revisado de Sturm (20). Birch y Fletcher (14) han señalado que con este ensayo de espacio de cabeza se obtenían resultados muy similares a los obtenidos con las mismas sustancias en el ensayo interlaboratorios de la OCDE (21) de los métodos de ensayo revisados.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

8. La sustancia problema, normalmente a la concentración de 20 mg C/l, como única fuente presente de carbono y de energía, se incuba en un medio amortiguador de sales minerales que se ha inoculado con una población mixta de microorganismos. El ensayo se lleva a cabo en frascos cerrados con un espacio de cabeza lleno de aire, que aporta una reserva de oxígeno para la biodegradación aerobia. El desprendimiento de CO₂ derivado de la degradación aerobia final de la sustancia problema se determina midiendo el CI producido en los frascos de ensayo en exceso respecto al producido en los recipientes en blanco que contienen solamente medio inoculado. El grado de biodegradación se expresa en porcentaje de la producción máxima teórica de CI (CITe), sobre la base de la cantidad de sustancia problema (en carbono orgánico) añadida inicialmente.
9. También puede medirse la eliminación del COD y/o el grado de biodegradación primaria de la sustancia problema (20).

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

10. Es preciso conocer el contenido de carbono orgánico (% p/p) de la sustancia problema, bien por su estructura química o bien por medición, de forma que sea posible calcular el porcentaje de degradación. En el caso de las sustancias problema volátiles, es útil disponer de la constante de la ley de Henry, medida o calculada, para determinar una relación adecuada entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido. También es conveniente disponer de información sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos a la hora de seleccionar una concentración de ensayo adecuada y para interpretar los resultados que indiquen escasa biodegradabilidad: se recomienda incluir un control de la inhibición salvo que se sepa que la sustancia problema no es inhibidora de la actividad microbiana (véase el punto 24).

APLICABILIDAD DEL MÉTODO

11. El ensayo es aplicable a las sustancias problema hidrosolubles e insolubles, aunque debe velarse por conseguir una buena dispersión de la sustancia problema. Utilizando la relación recomendada entre volumen del espacio de cabeza y volumen del líquido de 1:2, las sustancias volátiles con una constante de la ley de Henry de hasta 50 Pa.m³.mol⁻¹ pueden someterse a ensayo, ya que la proporción de la sustancia problema en el espacio de cabeza no superará el valor del 1 % (13). Puede utilizarse un volumen menor del espacio de cabeza cuando se estudien sustancias que sean más volátiles pero cuya biodisponibilidad pueda ser limitante, en particular si son poco solubles en agua. Sin embargo, los usuarios deben velar por que la relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido y la concentración de la sustancia problema sean tales que se disponga de suficiente oxígeno para que pueda darse una biodegradación aerobia completa (es decir, evitar el uso de una concentración elevada de sustrato y un pequeño volumen del espacio de cabeza). Pueden encontrarse orientaciones sobre esta cuestión en las referencias 13 y 23.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

12. Para comprobar el procedimiento del ensayo, debe someterse al mismo, en paralelo, una sustancia de referencia de biodegradabilidad conocida. A estos efectos, pueden utilizarse anilina, benzoato de sodio o etilenglicol para el ensayo de sustancias problema hidrosolubles, y 1-octanol para el de sustancias problema poco solubles (13). La biodegradación de estas sustancias debe llegar a > 60 % del CITe en el plazo de 14 días.

REPRODUCIBILIDAD

13. En el ensayo interlaboratorios del método (17), se obtuvieron los siguientes resultados aplicando las condiciones recomendadas, incluida la concentración de 20 mg C de sustancia problema por litro.

Sustancia problema	Porcentaje medio de biodegradación (28 d)	Coeficiente de variación (%)	Número de laboratorios
Anilina	90	16	17
1-Octanol	85	12	14

La variabilidad dentro del ensayo (reproducibilidad), utilizando anilina, era baja, con coeficientes de variabilidad no superiores al 5 % en casi todas las tandas de ensayos. En los dos casos en que la reproducibilidad era peor, la mayor variabilidad se debía probablemente a la alta producción de CI en las pruebas en blanco. La reproducibilidad era peor con el 1-octanol, pero aún así era menor del 10 % en el 79 % de las tandas de ensayos. Esta mayor variabilidad dentro del ensayo puede haberse debido a errores en la dosificación, ya que es necesario inyectar pequeños volúmenes (de 3 a 4 µl) de 1-octanol en frascos de ensayo sellados. Se encuentran mayores coeficientes de variación cuando se emplean concentraciones menores de sustancia problema, especialmente concentraciones inferiores a 10 mg C/l. Esto puede superarse parcialmente reduciendo la concentración de carbono inorgánico total (CIT) en el inóculo.

14. En un ensayo interlaboratorios de la UE (24) de cinco agentes tensioactivos a la concentración de 10 mg de C/l se obtuvieron los siguientes resultados:

Sustancia problema	Porcentaje medio de biodegradación (28 d)	Coeficiente de variación (%)	Número de laboratorios
Tetrapropileno-benceno-sulfonato	17	45	10
Di-iso-octilsulfo-succinato (aniónico)	72	22	9
Cloruro de hexadecil-trimetilamonio (*) (catiónico)	75	13	10

Sustancia problema	Porcentaje medio de biodegradación (28 d)	Coeficiente de variación (%)	Número de laboratorios
Iso-nonilfenol - (etoxilato) ₉ (no iónico)	41	32	10
Coco-amida-propil dimetilhidroxi sulfobetaína (anfótera)	60	23	11

(*) Se añade SiO₂ para neutralizar la toxicidad.

Los resultados indican que, en general, la variabilidad era mayor con los agentes tensioactivos menos degradados. La variabilidad dentro del ensayo era inferior al 15 % en más del 90 % de los casos, y los valores máximos llegaban al 30-40 %.

NOTA: La mayoría de los agentes tensioactivos no son especies moleculares únicas sino mezclas de isómeros, homólogos, etc., que se degradan tras períodos de latencia característicos diferentes y con tasas cinéticas diferentes, lo que se plasma en curvas atenuadas, "borradas", de forma que el valor de corte del 60 % puede no ser alcanzado dentro del período de observación de 10 días, incluso aunque cada especie molecular individual superara ese valor en el plazo de 10 días si se ensayara sola. Esto puede observarse también con otras mezclas complejas.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Equipo

15. Equipo normal de laboratorio, además de lo siguiente:

- Frascos de suero de vidrio, cerrados con tapones de caucho butílico y cápsulas de aluminio. El tamaño recomendado es de "125 ml", con un volumen total de unos 160 ml (en este caso, es necesario saber que el volumen de cada frasco es de 160 ± 1 ml). Puede emplearse un tamaño menor de recipiente cuando los resultados cumplen las condiciones descritas en los puntos 66 y 67.
- Analizador de carbono u otro instrumento (por ejemplo, cromatógrafo de gases) para medir el carbono inorgánico.
- Jeringas de alta precisión para tomar muestras gaseosas y líquidas.
- Agitador orbital en un ambiente de temperatura controlada.
- Apporte de aire exento de CO₂, puede prepararse haciendo pasar aire a través de gránulos de cal sodada o utilizando una mezcla gaseosa con 80 % N₂/20 % O₂ (opcional) (véase el punto 28).
- Dispositivo de filtración por membrana de 0,20-0,45 µm de porosidad (opcional).
- Analizador de carbono orgánico (opcional).

Reactivos

16. Deben utilizarse siempre reactivos de pureza analítica.

Agua

17. Debe utilizarse agua destilada o desionizada, con ≤ 1 mg/l de carbono orgánico total. Esto corresponde a ≤ 5 % del contenido de carbono orgánico inicial introducido por la dosis recomendada de la sustancia problema.

Soluciones madre para el medio de sales minerales

18. Las soluciones madre y el medio de sales minerales son similares a los de los ensayos de la norma ISO 14593 (16) y del capítulo C.4 "biodegradabilidad fácil" (20). El uso de una concentración superior de cloruro de amonio (2,0 g/l en lugar de 0,5 g/l) debe ser necesario solo en casos muy excepcionales como, por ejemplo, cuando la concentración de la sustancia problema es > 40 mg C/l. Las soluciones madre deben conservarse refrigeradas y se eliminarán al cabo de seis meses, o antes si aparecen signos de precipitación o de crecimiento microbiano. Deben prepararse los seis frascos siguientes:

a) Fosfato de dihidrógeno y potasio (KH_2PO_4) 8,50 g

Fosfato de hidrógeno y dipotasio (K_2HPO_4) 21,75 g

Fosfato de hidrógeno y disodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33,40 g

Cloruro de amonio (NH_4Cl) 0,50 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro. El pH de esta solución debe ser 7,4 ($\pm 0,2$). Si no es así, debe prepararse una solución nueva.

b) Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36,40 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro.

c) Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22,50 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro.

d) Cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,25 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro; añadir una gota de HCl concentrado.

Preparación del medio mineral

19. Se mezclan 10 ml de la solución a) con unos 800 ml de agua (véase el punto 17), se añade a continuación 1 ml de las soluciones b), c) y d) y se enrasa a 1 litro con agua (punto 17).

Otros reactivos

20. Ácido ortofosfórico concentrado (H_3PO_4) ($> 85\%$, peso en volumen).

Solución de hidróxido de sodio 7M

21. Se disuelven 280 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 1 litro de agua (punto 17). Se determina la concentración de CID de esta solución y se tiene en cuenta este valor cuando se calcule el resultado del ensayo (véanse los puntos 55 y 61), especialmente en función del criterio de validez del punto 66 b). Si la concentración de CID es demasiado elevada, debe prepararse una solución nueva.

Sustancia problema

22. Preparar una solución madre de una sustancia problema suficientemente hidrosoluble, en agua (punto 17) o en el medio de ensayo (punto 19), a una concentración preferiblemente 100 veces mayor que la concentración final que se vaya a emplear en el ensayo; puede ser necesario ajustar el pH de la solución madre. La solución madre debe añadirse al medio mineral para conseguir una concentración final de carbono orgánico entre 2 y 40 mg C/l, preferiblemente 20 mg C/l. Si se utilizan concentraciones menores que estas, la precisión obtenida puede verse afectada. Las sustancias líquidas solubles e insolubles pueden añadirse a los recipientes directamente mediante jeringas de precisión. Puede ser necesario aplicar un tratamiento especial a las sustancias problema poco solubles o insolubles (25). Las opciones son las siguientes:

a) adición directa de cantidades pesadas conocidas;

b) dispersión con ultrasonidos antes de la adición;

c) dispersión con ayuda de agentes emulgentes, de los que se determinará si tienen algún efecto inhibidor o estimulante de la actividad microbiana antes de añadir la sustancia problema;

d) adsorción de sustancias problema líquidas, o de una solución en un disolvente volátil adecuado, a un medio o soporte inerte (por ejemplo, filtro de fibras de vidrio), seguida de evaporación del disolvente eventualmente empleado, y adición directa de cantidades conocidas;

e) adición de un volumen conocido de una solución de la sustancia problema en un disolvente muy volátil a un recipiente de ensayo vacío, seguido de evaporación del disolvente.

Hay que someter a ensayo los agentes o disolventes utilizados en las letras c), d) y e) para comprobar si tienen efecto estimulante o inhibidor sobre la actividad microbiana [véase el punto 42 b)].

Sustancia de referencia

23. Preparar una solución madre de la sustancia de referencia (soluble) en agua (punto 17), a una concentración de preferencia 100 veces mayor que la concentración final que se vaya a emplear en el ensayo (20 mg C/l).

Comprobación de la inhibición

24. Es frecuente que las sustancias problema no muestren degradación significativa en las condiciones aplicadas en las evaluaciones de la biodegradación fácil. Una de las posibles causas es que la sustancia problema sea inhibidora para el inóculo a la concentración a la que se aplica en el ensayo. Puede incluirse en el diseño del ensayo una comprobación de la inhibición para facilitar la identificación (*a posteriori*) de la inhibición como posible causa o factor contribuyente. Por el contrario, la comprobación de la inhibición puede excluir tales interferencias y mostrar que la degradación nula o escasa debe atribuirse solo a que los microorganismos no son capaces de atacar la sustancia en las condiciones del ensayo. A fin de obtener información sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos (aerobios), preparar una solución del medio de ensayo con la sustancia problema y la sustancia de referencia (punto 19), cada una a las mismas concentraciones que se añaden en el ensayo en sí (véanse los puntos 22 y 23).

Inóculo

25. El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, efluente de aguas residuales (no cloradas), aguas superficiales y suelos, o de una mezcla de estas (20). La actividad biodegradante de la fuente debe comprobarse utilizando una sustancia de referencia. Independientemente de la fuente, no deben utilizarse microorganismos que se hayan expuesto anteriormente a la sustancia problema, si se quiere emplear el procedimiento como ensayo de la biodegradabilidad fácil.

Advertencia: Hay que manejar con cuidado el lodo activado, las aguas residuales y los efluentes de aguas residuales, debido a su contenido en organismos patógenos.

26. Según la experiencia, el volumen óptimo del inóculo es aquel que:

- resulta suficiente para dar una actividad de biodegradación adecuada,
- degrada la sustancia de referencia en el porcentaje estipulado (véase el punto 66),
- da entre 10^2 y 10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro en la mezcla final,
- da normalmente una concentración de 4 mg/l de sólidos en suspensión en la mezcla final cuando se utiliza lodo activado; es posible emplear concentraciones de hasta 30 mg/l, pero pueden aumentar significativamente la producción de CO₂ de los blancos (26),
- contribuye con menos del 10 % de la concentración inicial de carbono orgánico introducido por la sustancia problema,
- se encuentra generalmente en la banda de 1 a 10 ml de inóculo por litro de solución de ensayo.

Lodo activado

27. Se recoge, justo antes del proceso, lodo activado del depósito de aireación de una depuradora de aguas residuales o de una instalación de laboratorio que trate predominantemente aguas residuales domésticas. En caso necesario, deben retirarse las partículas gruesas por tamizado (por ejemplo, con un tamiz de 1 mm² de malla) y el lodo ha de mantenerse en condiciones aerobias hasta el momento de su utilización.
28. También, después de eliminar las eventuales partículas gruesas, puede dejarse sedimentar o centrifugarse (por ejemplo, 1 100 × g durante 10 min). Se desecha el sobrenadante. El lodo puede lavarse en la solución de minerales. Se suspende el lodo concentrado en medio mineral para obtener una concentración de 3 a 5 g de sólidos en suspensión/l y después se somete a aireación hasta que se utilice.
29. El lodo debería obtenerse de una depuradora convencional que trabaje adecuadamente. Si el lodo tiene que obtenerse de una depuradora de elevado rendimiento o se piensa que contiene inhibidores, debería lavarse. El lodo resuspendido se mezcla bien y a continuación se deja sedimentar o se centrifuga, se desecha el sobrenadante y se vuelve a suspender el lodo lavado en otro volumen de medio mineral. Este procedimiento se repite hasta que se considere que el lodo queda exento de un exceso de sustrato o de inhibidor.
30. Despues de conseguir la resuspensión completa, o con el lodo sin tratar, se toma una muestra justo antes de su utilización para determinar el peso seco de los sólidos en suspensión.

31. Otra posibilidad diferente es homogeneizar lodo activado (de 3 a 5 g de sólidos suspendidos/l). Se trata el lodo en un mezclador Waring durante 2 minutos a velocidad media. El lodo mezclado se deja sedimentar durante 30 minutos, o más en caso necesario, y se decanta el líquido para utilizarlo como inóculo en la proporción de unos 10 mg/l de medio mineral.
32. Puede conseguirse una reducción aún mayor del desprendimiento de CO₂ en el blanco aireando el lodo hasta el día siguiente con aire exento de CO₂. Utilizar como concentración del inóculo en este ensayo 4 mg/l de sólidos del lodo activado (13).

Efluente secundario de aguas residuales

33. El inóculo puede obtenerse también a partir del efluente secundario de una depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Mantener la muestra en condiciones aerobias y utilizarla el día de la toma, o acondicionarla previamente en caso necesario. El efluente debe filtrarse por un filtro grueso para eliminar las partículas gruesas y se mide el valor del pH.
34. Para reducir su contenido de Cl, se hace pasar por el filtrado aire exento de CO₂ (punto 15, letra e) durante 1 h, manteniendo el pH a 6,5 mediante el uso de ácido ortofosfórico (punto 20). El valor del pH se restaura a su valor original con hidróxio de sodio (punto 21) y, después de dejar sedimentar durante 1 h aproximadamente, se toma un volumen adecuado del sobrenadante para la inoculación. Este procedimiento de arrastre reduce el contenido de Cl del inóculo. Por ejemplo, cuando se utilizaba como inóculo el volumen recomendado máximo de efluente sometido al arrastre y filtrado (100 ml) por litro, la cantidad de Cl presente en los recipientes de control en blanco estaba en la banda de 0,4-1,3 mg/l (14), lo que correspondía a entre el 2 y el 6,5 % del C de la sustancia problema a 20 mg C/l y entre el 4 y el 13 % a 10 mg C/l.

Aguas superficiales

35. Se toma una muestra de un agua superficial adecuada. Debe mantenerse en condiciones aerobias y utilizarse el mismo día de la toma. En caso necesario, la muestra debe concentrarse por filtración o centrifugación. El volumen de inóculo que se vaya a utilizar en cada recipiente de ensayo debe cumplir los criterios del punto 26.

Suelos

36. Se toma una muestra de un suelo adecuado, recogida a una profundidad de hasta 20 cm por debajo de la superficie del suelo. Hay que retirar las piedras, restos vegetales e invertebrados de la muestra de suelo antes de pasarlal por un tamiz de 2 mm de malla (si la muestra está demasiado húmeda para tamizarla inmediatamente, se deja secar parcialmente al aire para facilitar el tamizado). Debe mantenerse en condiciones aerobias y utilizarse el mismo día de la toma; si la muestra se transporta en una bolsa de polietileno negra sin cerrar completamente, puede conservarse en la bolsa hasta un mes a una temperatura de entre 2 y 4 °C.

Preacondicionamiento del inóculo

37. Los inóculos pueden estar preacondicionados a las condiciones experimentales, pero no preadaptados a la sustancia problema. El preacondicionamiento puede reducir el desprendimiento de CO₂ del blanco. El preacondicionamiento consiste en airear el lodo activado, tras diluirlo en el medio de ensayo hasta una concentración de 30 mg/l, con aire húmedo exento de CO₂ durante un máximo de 5 o 7 días a la temperatura del ensayo.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Número de frascos

38. El número de frascos [punto 15, letra a)] necesarios para un ensayo dependerá de la frecuencia de los análisis y de la duración del ensayo.
39. Se recomienda analizar frascos por triplicado tras un número suficiente de intervalos de tiempo, de forma que pueda señalarse el período de observación de 10 días. También se analizan al final del ensayo al menos cinco frascos de ensayo [punto 15, letra a)] de los conjuntos a), b) y c) (véase el punto 42), para permitir el cálculo de los intervalos de confianza del 95 % del valor medio del porcentaje de biodegradación.

Medio inoculado

40. El inóculo se emplea a la concentración de 4 mg/l de sólidos secos del lodo activado. Preparar inmediatamente antes del uso una cantidad suficiente de medio inoculado añadiendo, por ejemplo, 2 ml de lodo activado tratado de forma adecuada (puntos 27 a 32) a la concentración de 2 000 mg/l a 1 litro de medio de sales minerales (punto 19). Cuando deba utilizarse efluente secundario de aguas residuales, añadir hasta 100 ml de efluente (punto 33) a 900 ml de medio de sales minerales (punto 19) y enrasar a 1 litro con medio.

Preparación de los frascos

41. Se ponen en frascos replicados alícuotas de medio inoculado para obtener una relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido de 1:2 (por ejemplo, añadir 107 ml a frascos de 160 ml de capacidad). Es posible utilizar otras proporciones, pero téngase en cuenta la advertencia del punto 11. Independientemente del tipo de inóculo utilizado, ha de ponerse atención para que el medio inoculado se mezcle adecuadamente a fin de garantizar que se distribuye de manera uniforme en los frascos de ensayo.
 42. Se preparan conjuntos de frascos [punto 15, letra a)] que contengan lo siguiente:
 - a) recipientes de ensayo (denominados F_T) que contengan la sustancia problema;
 - b) controles en blanco (denominados F_B) que contengan el medio de ensayo más el inóculo; deben añadirse también las eventuales sustancias, disolventes, agentes o filtros de fibra de vidrio que se utilicen para introducir la sustancia problema en los recipientes de ensayo;
 - c) recipientes (denominados F_C) para comprobar el procedimiento que contengan la sustancia de referencia;
 - d) en caso necesario, recipientes (denominados F_I) para comprobar un posible efecto inhibidor de la sustancia problema que contengan tanto la sustancia problema como la sustancia de referencia a las mismas concentraciones (punto 24) que se encuentran en los frascos F_T y F_C , respectivamente;
 - e) recipientes (denominados F_S) para comprobar una posible degradación abiotíca como en la letra a) más 50 mg/l $HgCl_2$ o esterilizados de alguna otra manera (por ejemplo, mediante autoclavado).
 43. Las sustancias problema y sustancias de referencia hidrosolubles se añaden como soluciones madre acuosas (puntos 22, 23 y 24) para dar una concentración de entre 10 y 20 mg C/l.
 44. Las sustancias problema y sustancias de referencia insolubles se añaden a los frascos de diversas formas [véase el punto 22, letras a) a e)] según la naturaleza de la sustancia problema, bien antes o bien después de la adición del medio inoculado, en función del método de tratamiento de la sustancia problema. Si se aplica uno de los procedimientos indicados en el punto 22, letras a) a e), los frascos en blanco F_B [punto 42, letra b)] deben tratarse de forma similar, pero excluyendo la sustancia problema o la sustancia de referencia.
 45. Las sustancias problema volátiles deben inyectarse en frascos sellados (punto 47) mediante una microjeringa. La dosis se calcula a partir del volumen inyectado y de la densidad de la sustancia problema.
 46. En caso necesario, se añade agua a los recipientes para obtener el mismo volumen de líquido en cada uno de ellos. Ha de velarse por que la relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido (normalmente, 1:2) y la concentración de la sustancia problema sean tales que se disponga de suficiente oxígeno en el espacio de cabeza para permitir una biodegradación completa.
 47. A continuación se sellan todos los frascos, por ejemplo con diafragmas de caucho butílico y cápsulas de aluminio. Las sustancias problema volátiles deben añadirse en esta fase (punto 45). Si ha de seguirse el descenso de la concentración de COD de la solución de ensayo y han de realizarse análisis a tiempo cero para determinar la concentración de CI inicial [controles estériles, punto 42, letra e)] u otros parámetros, tomar una muestra apropiada del recipiente de ensayo. Este recipiente y su contenido se desechan a continuación.
 48. Los frascos sellados se colocan en un agitador rotatorio [punto 15, letra d)], con una velocidad de agitación suficiente para mantener el contenido de los frascos bien mezclado y en suspensión (por ejemplo, de 150 a 200 rpm), y se incuban a oscuras y a 20 °C, con una precisión de ± 1 °C.
- Muestreo*
49. El patrón de muestreo dependerá del período de latencia y de la tasa cinética de biodegradación de la sustancia problema. Se toman frascos para analizarlos el mismo día del muestreo, que debe hacerse al menos una vez por semana o con más frecuencia (por ejemplo, dos veces por semana) si hace falta obtener la curva de degradación completa. Se toma del agitador el número necesario de frascos replicados, que correspondan a F_T , F_B y F_C y, cuando se utilicen, F_I y F_S (véase el punto 42). El ensayo dura normalmente 28 días. Si la curva de biodegradación indica que se alcanza una meseta antes del día 28, el ensayo puede darse por concluido sin llegar al día 28. Tomar muestras de los cinco frascos reservados para el día 28 del ensayo a fin de analizarlas y utilizar los resultados para calcular los límites de confianza o el coeficiente de variación del porcentaje de degradación. No es necesario tomar con tanta frecuencia como de los demás frascos muestras de los que correspondan a las comprobaciones de la inhibición y de la degradación abiotíca; es suficiente con los días 1 y 28.

Análisis de carbono inorgánico (CI)

50. La producción de CO₂ en los frascos se determina midiendo el aumento de la concentración de carbono inorgánico (CI) durante la incubación. Se dispone de dos métodos recomendados para medir la cantidad de CI producida en el ensayo, y se describen inmediatamente a continuación. Dado que los métodos pueden dar resultados ligeramente diferentes, en cada tanda de ensayos hay que utilizar uno solo.
51. Se recomienda el método a) si resulta probable que el medio contenga restos de, por ejemplo, un papel de filtro de vidrio o sustancia problema insoluble. Este análisis puede realizarse utilizando un cromatógrafo de gases si no se dispone de analizador de carbono. Es importante que los frascos estén a la temperatura del ensayo (o cerca de esta) cuando se analice el gas del espacio de cabeza. El método b) puede ser más fácil para los laboratorios que utilicen analizadores de carbono para medir el CI. Es importante que la solución de hidróxido de sodio (punto 21) utilizada para convertir el CO₂ en carbonato sea recién preparada o bien que se conozca su contenido en CI, de forma que este pueda tenerse en cuenta a la hora de calcular los resultados del ensayo [véase el punto 66, letra b)].

Método a): acidificación a pH < 3

52. Antes de cada lote de análisis, se calibra el analizador de CI utilizando un patrón adecuado de CI (por ejemplo, CO₂ al 1 % p/p en N₂). Se inyecta ácido ortofosfórico concentrado (punto 20) a través del diafragma de cada frasco de la muestra para reducir el pH del medio a<3 (por ejemplo, añadir 1 ml a 107 ml de medio de ensayo). Los frascos se vuelven a colocar en el agitador. Tras agitar durante una hora a la temperatura de ensayo, se sacan los frascos del agitador, se retiran alícuotas (por ejemplo, de 1 ml) de gas del espacio de cabeza de cada frasco y se inyectan en el analizador de CI. Las concentraciones medidas de CI se registran en mg C/l.
53. El principio del presente método consiste en que, tras la acidificación hasta un pH<3 y la estabilización a 20 °C, la constante de equilibrio para la distribución del CO₂ entre las fases líquida y gaseosa de los frascos de ensayo es de 1,0 cuando se mide en concentraciones (13). Es necesario demostrar al menos una vez que esto es así con el sistema de ensayo, de la manera siguiente:

Preparar frascos con 5 y 10 mg/l de CI utilizando una solución de carbonato de sodio anhídrico (Na₂CO₃) en agua exenta de CO₂, obtenida acidificando agua hasta llegar a un pH de 6,5 con ácido ortofosfórico concentrado (punto 20), burbujeando hasta el día siguiente aire exento de CO₂ y elevando el pH con álcali hasta llegar a la neutralidad. Asegurarse de que la relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido es la misma que en los ensayos (por ejemplo, de 1:2). Acidificar y equilibrar como se describe en el punto 52, y medir las concentraciones de CI tanto en la fase del espacio de cabeza como en la del líquido. Comprobar que las dos concentraciones son la misma, teniendo en cuenta el error experimental. En caso contrario, el operario debe revisar los procedimientos. No es necesario efectuar esta verificación de la distribución del CI entre las fases líquida y gaseosa cada vez que se realiza el ensayo; en principio puede hacerse durante la calibración.

54. Si se quiere medir la eliminación del COD (solo con sustancias problema hidrosolubles), hay que tomar muestras de la fase líquida de distintos frascos (no acidificados), filtrarlas por membrana e inyectarlas en el analizador de COD. Estos frascos pueden utilizarse en otros análisis en caso necesario, para medir la biodegradación primaria.

Método b): conversión del CO₂ en carbonato

55. Antes de cada lote de análisis, calibrar el analizador de CI utilizando un patrón adecuado como, por ejemplo, una solución de bicarbonato sódico (NaHCO₃) en agua exenta de CO₂ (véase el punto 53) en la banda de 0 a 20 mg/l de CI. Inyectar solución de hidróxido de sodio (7 M, punto 21) (por ejemplo, 1 ml en 107 ml de medio) a través del diafragma de cada frasco muestreado; agitar los frascos durante 1 h a la temperatura de ensayo. Usar la misma solución de NaOH en todos los frascos apartados un día determinado, pero no necesariamente en todos los muestreos efectuados a lo largo de un ensayo. Si se necesita conocer los valores absolutos de CI de los blancos en todos los muestreos, será necesario determinar el CI de la solución de NaOH cada vez que se utilice. Sacar los frascos del agitador y dejar reposar. Se retiran con jeringa volúmenes adecuados (por ejemplo, de 50 a 1 000 µl) de la fase líquida de cada recipiente. Las muestras se inyectan en el analizador de CI y se registran las concentraciones de CI. Hay que velar por que el analizador empleado esté equipado de forma adecuada para tratar las muestras alcalinas preparadas según este método.
56. El principio del presente método consiste en que, tras la adición de álcali y la agitación, se hace despreciable la concentración de CI en el espacio de cabeza. Es necesario demostrar al menos una vez que esto es así con el sistema de ensayo, utilizando patrones de CI, añadiendo álcali y dejando equilibrar, para medir a continuación la concentración de CI tanto en la fase del espacio de cabeza como en la líquida (véase el punto 53). La concentración en el espacio de cabeza debe aproximarse a cero. Esta comprobación de que la absorción de CO₂ es prácticamente total no resulta necesario hacerla cada vez que se realiza el ensayo.
57. Si se quiere medir la eliminación del COD (solo con sustancias problema hidrosolubles), hay que tomar muestras de la fase líquida de distintos frascos (a los que no se ha añadido álcali), filtrarlas por membrana e inyectarlas en el analizador de COD. Estos frascos pueden utilizarse en otros análisis en caso necesario, para medir la biodegradabilidad primaria.

DATOS E INFORME

Cálculo de los resultados

58. Suponiendo una mineralización del 100 % de la sustancia problema en CO₂, el CITe que supere el producido en los controles en blanco equivale al COT añadido a cada frasco de ensayo al inicio del ensayo; es decir:

$$\text{CITe} = \text{COT}$$

La masa total (mg) del carbono inorgánico (CIT) de cada frasco es:

$$\text{CIT} = (\text{mg C en el líquido} + \text{mg C en el espacio de cabeza}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{Ecuación [1]}$$

donde:

V_L = volumen de líquido en el frasco (litros);

C_L = concentración de Cl en el líquido (mg/l en carbono);

V_H = volumen del espacio de cabeza (litros);

C_H = concentración de Cl en el espacio de cabeza (mg/l en carbono).

Los cálculos del CIT de los dos métodos analíticos utilizados para medir el Cl en este ensayo se describen más adelante, en los puntos 60 y 61. El porcentaje de biodegradación (% D) en cada caso viene dado por la fórmula siguiente:

$$\%D = \frac{(\text{CIT}_t - \text{CIT}_b)}{\text{COT}} \times 100 \quad \text{Ecuación [2]}$$

donde:

CIT_t = mg CIT en el frasco de ensayo en el tiempo t;

CIT_b = mg CIT medio en los frascos en blanco en el tiempo t;

COT = mg COT añadidos inicialmente al recipiente de ensayo.

El porcentaje de biodegradación (% D) se calcula para los frascos de ensayo (F_T), de referencia (F_C) y, cuando se incluyan, de control del seguimiento de la inhibición (F_I) a partir de las respectivas cantidades de CIT producidas hasta cada tiempo de muestreo.

59. Si se observa un aumento significativo del contenido de CIT de los controles estériles (F_S) a lo largo del período de ensayo, puede concluirse que ha habido degradación abiotíca de la sustancia problema, y hay que tener esto en cuenta al calcular el valor de D en la ecuación [2].

Acidificación a pH < 3

60. Dado que la acidificación a pH < 3 y el equilibrado resulta en la igualación de la concentración de CIT en las fases líquida y gaseosa, solo debe medirse la concentración de Cl en la fase gaseosa. Así pues, de la ecuación [1] se desprende que CIT = (V_L + V_H) × C_H = V_B × C_H, donde V_B = volumen del frasco de suero.

Conversión del CO₂ en carbonato

61. En este método se realizan los cálculos como en la ecuación [1], pero se ignora la cantidad despreciable de CI presente en la fase gaseosa, es decir, $V_H \times C_H = 0$, y $CIT = V_L \times C_L$.

Expresión de los resultados

62. Se obtiene una curva de biodegradación representando el porcentaje de biodegradación, D, frente al tiempo de incubación y, si es posible, se indican las fases de latencia y de biodegradación y el período de observación de 10 días, así como la fase de meseta, es decir, la fase en que se ha alcanzado la degradación máxima y se ha aplanado la curva de biodegradación. Si se obtienen resultados comparables con los recipientes de ensayo paralelos F_T (< 20 % de diferencia), se representa una curva media (véase el apéndice 2, fig.1); en caso contrario, se representan las curvas de cada recipiente. Se determina el valor medio del porcentaje de biodegradación en la fase de meseta o se evalúa el valor máximo (por ejemplo, cuando la curva decrece en la fase de meseta), pero es importante evaluar que en este último caso el valor no es anómalo. Hay que indicar este nivel máximo de biodegradación en el informe de ensayo como "grado de biodegradación de la sustancia problema". Si el número de recipientes de ensayo es insuficiente para indicar la fase de meseta, se utilizan los valores medidos el último día del ensayo para calcular el valor medio. Este último valor, la media de cinco réplicas, sirve para indicar la precisión con que se ha determinado el porcentaje de biodegradación. Indíquese también el valor obtenido al final del período de observación de 10 días.
63. De la misma manera, se representa la curva para la sustancia de referencia, F_C , y, si están incluidos, para la comprobación de la eliminación abiótica, F_S y el control de la inhibición, F_I .
64. Se registran las cantidades de CIT presentes en los controles en blanco (F_B), así como las de los frascos F_S (comprobación abiótica), si se han incluido en el ensayo los recipientes correspondientes.
65. Calcular el valor de D correspondiente a los recipientes F_I , sobre la base del rendimiento de CI teórico previsto a partir de únicamente el componente de referencia de la mezcla. Si, al día 28, $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI}^{(2)})/D_{FC}] \times 100 > 25\%$, puede aceptarse que la sustancia problema ha inhibido la actividad del inóculo, y esto puede explicar la obtención de bajos valores de D_{FT} en las condiciones del ensayo. En este caso, el ensayo puede repetirse utilizando una concentración de ensayo menor y, de preferencia, reduciendo el CID en el inóculo y el CIT formado en los controles en blanco, ya que, si no, la menor concentración reduciría la precisión del método. También puede utilizarse otro inóculo. Si en el frasco F_S (abiótico) se observa un aumento significativo (> 10 %) en la cantidad de CIT, es posible que se hayan dado procesos de degradación abiótica.

Validez de los resultados

66. Se considera que un ensayo es válido si:

- a) el valor medio del porcentaje de degradación en los recipientes F_C que contienen la sustancia de referencia es > 60 % para el 14º día de incubación, y
- b) el valor medio del CIT presente en los controles en blanco F_B al final del ensayo es > 3 mg C/l.

Si no se respetan estos límites, hay que repetir el ensayo con un inóculo procedente de otra fuente o revisar los procedimientos aplicados. Por ejemplo, si la obtención de un contenido elevado de CI en los blancos es un problema, debe seguirse el procedimiento contemplado en los puntos 27 a 32.

67. Si la sustancia problema no alcanza el 60 % del CITE y se ha visto que no es inhibidora (punto 65), podría repetirse el ensayo con una concentración superior del inóculo (hasta 30 mg/l de lodo activado y 100 ml de efluente/l) o inóculo de otras fuentes, sobre todo si la degradación estaba en la banda del 20 al 60 %.

Interpretación de los resultados

68. Una biodegradación > 60 % del CITE en el plazo de observación de 10 días en este ensayo demuestra que la sustancia problema es fácilmente biodegradable en condiciones aerobias.
69. Si no se alcanza el umbral del 60 % del CITE, determinar el valor de pH en los medios de los frascos que no se han acidificado ni alcalinizado; un valor inferior a 6,5 podría indicar que se ha producido nitrificación. En tal caso, repítase el ensayo con una solución amortiguadora de mayor concentración.

(¹) Porcentaje de degradación en los recipientes F_C que contienen la sustancia de referencia.

(²) Porcentaje de degradación en los recipientes F_I .

Informe del ensayo

70. Elaborar una tabla con los valores del % D de cada uno de los frascos de ensayo (F_T), de referencia (F_C) y, si se han incluido, de control de la inhibición (F_I) correspondientes a cada día muestreado. Si se obtienen resultados comparables con los frascos replicados, trazar la curva del valor medio del % D frente al tiempo. Registrar la cantidad de CIT en los blancos (F_B) y en los controles estériles (F_S), así como el COD y otros parámetros, y su porcentaje de eliminación.
71. Determinar el valor medio del % D en la fase de meseta, o utilizar el valor máximo si la curva de biodegradación decrece en la fase de meseta, y comunicarlo como "grado de biodegradación de la sustancia problema". Es importante asegurarse de que en este último caso el valor máximo no es anómalo.
72. El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

- Nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural, y propiedades fisicoquímicas pertinentes.
- Pureza (impurezas) de la sustancia problema.

Condiciones de ensayo:

- Referencia al presente método de ensayo.
- Descripción del sistema de ensayo utilizado (por ejemplo, volumen del recipiente, relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido, método de agitación, etc.).
- Aplicación de la sustancia problema y de la sustancia de referencia al sistema de ensayo: concentración de ensayo utilizada y cantidad de carbono añadida a cada frasco de ensayo, eventual uso de disolventes.
- Datos del inóculo empleado, eventual tratamiento y acondicionamiento previos.
- Temperatura de incubación.
- Validación del principio del análisis del CI.
- Características principales del analizador de IC empleado (y de otros eventuales métodos analíticos aplicados).
- Número de réplicas.

Resultados:

- Datos en bruto y valores calculados de biodegradabilidad en forma tabular.
- Gráficas del porcentaje de degradación frente al tiempo correspondientes a la sustancia problema y a la sustancia de referencia, fase de latencia, fase de degradación, período de observación de 10 días y pendiente.
- Porcentaje de eliminación en la meseta, al final del ensayo y tras el período de observación de 10 días.
- Motivos del eventual rechazo de los resultados del ensayo.
- Cualquier otro dato que pueda ser pertinente sobre el procedimiento seguido.
- Discusión de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil". Ensayo de desprendimiento de CO₂ (método C.4-C)
- (2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A.Oil Chem Soc. 50: 159-167.
- (3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.
- (4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.
- (5) ISO 9439 (1990; revisada en 1999). Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia final de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método por valoración del dióxido de carbono producido (Sturm).
- (6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- (8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.
- (9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.
- (10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.
- (11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzocchi PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.
- (12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.
- (13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.
- (14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.
- (15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.
- (16) ISO 14593 (1999). Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia final de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método de análisis del carbono inorgánico en recipientes cerrados (ensayo del CO₂ en el espacio de cabeza).
- (17) Battersby NS (1997). The ISO headspace C02 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.
- (18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.
- (19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

- (20) Capítulo C.4 del presente anexo: Determinación de la biodegradabilidad "fácil".
- (21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.
- (22) Capítulo C.11 del presente anexo. Lodo activado: Prueba de inhibición de la respiración.
- (23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6: 319-327.
- (24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO₂ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
- (25) ISO 10634 (1996) Calidad del agua. Líneas directrices para la preparación y tratamiento de los compuestos orgánicos poco solubles en agua para la subsecuente evaluación de su biodegradabilidad en medio acuoso.
-

Apéndice 1

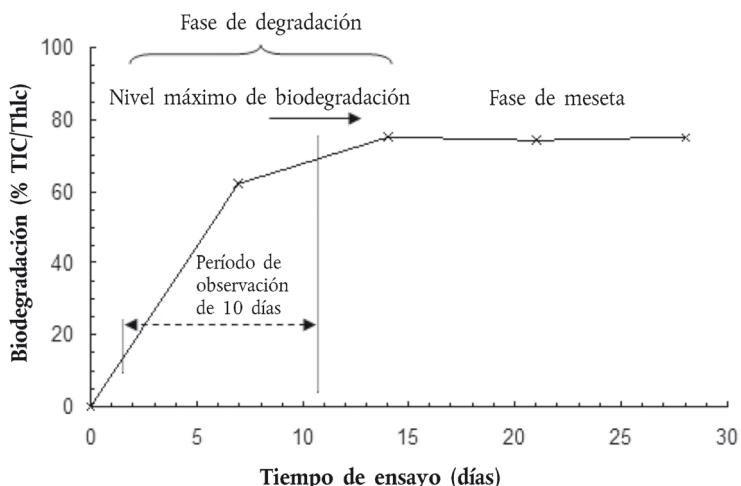
ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

CI: Carbono inorgánico.**CO₂Te:** Dióxido de carbono teórico (mg); es la cantidad de dióxido de carbono que se calcula que va a producirse a partir del contenido en carbono, conocido o medido, de la sustancia problema cuando se mineraliza completamente; se expresa también como mg de dióxido de carbono producido por mg de sustancia problema.**COD:** Carbono orgánico disuelto; es el carbono orgánico presente en solución o el que pasa a través de un filtro de 0,45 micrómetros o permanece en el sobrenadante tras centrifugación a aproximadamente 4 000 g ($\pm 40\,000\text{ m sec}^{-2}$) durante 15 minutos.**CID:** Carbono inorgánico disuelto.**CITe:** Carbono inorgánico teórico.**CIT:** Carbono inorgánico total.**Fácilmente biodegradable:** Categoría arbitraria de sustancias químicas que han pasado determinados ensayos exploratorios específicos en cuanto a la biodegradabilidad última; estos ensayos son tan estrictos que se acepta que estos compuestos se degradan rápida y completamente en los medios ambientales acuáticos en condiciones aerobias.**Período de observación de 10 días:** Son los 10 días que siguen inmediatamente al momento en que se alcanza el 10 % de degradación.**Biodegradabilidad intrínseca:** Categoría de sustancias químicas que presentan signos inequívocos de biodegradación (primaria o final) en algún ensayo de biodegradabilidad.**Biodegradación aerobia final:** Es el nivel de degradación al que llega la sustancia problema cuando es totalmente utilizada por microorganismos dando lugar a la producción de dióxido de carbono, agua, sales minerales y nuevos constituyentes celulares microbianos (biomasa).**Mineralización:** Degradación completa de una sustancia orgánica a CO₂ y H₂O en condiciones aerobias y a CH₄, CO₂ y H₂O en condiciones anaerobias.**Fase de latencia:** Tiempo comprendido desde el inicio de un ensayo hasta que se consigue la aclimatación o adaptación de los microorganismos de degradación y llega a un nivel detectable el grado de biodegradación de una sustancia o materia orgánica problema (por ejemplo, hasta el 10 % de la biodegradación teórica máxima, o menos, en función de la exactitud de la técnica de medición).**Fase de degradación:** Tiempo transcurrido desde el final de la fase de latencia hasta el momento en que se alcanza el 90 % del nivel máximo de degradación.**Fase de meseta:** Fase en la que se ha alcanzado la degradación máxima y se ha aplanado la curva de biodegradación.**Sustancia problema:** Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

Apéndice 2

Ejemplo de curva de biodegradación

Figura 1

Biodegradación del 1-octanol en el ensayo del espacio de cabeza de CO₂

Glosario:

Biodegradación

Fase de degradación

Nivel máximo de biodegradación

Fase de meseta

Período de observación de 10 días

Tiempo de ensayo (días)

C.30. BIOACUMULACIÓN EN OLIGOQUETOS TERRESTRES

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 317 (2010). Entre los métodos de ensayo relativos al destino en el medio ambiente, los denominados Bioconcentración — Ensayo dinámico con peces [capítulo C.13 del presente anexo (49)] y Bioacumulación en oligoquetos bentónicos que viven en los sedimentos (53) se publicaron respectivamente en 1996 y 2008, respectivamente. Extrapolar datos de bioacumulación acuática a los organismos terrestres, como los gusanos de tierra, resulta difícil, si no imposible. Actualmente se utilizan modelos de cálculo basados en la lipofilia de la sustancia problema [por ejemplo, (14) (37)] para la evaluación de la bioacumulación de sustancias en el suelo como, por ejemplo, en el documento de orientación técnica de la UE (19). Ya se ha establecido la necesidad de disponer de un método específico del comportamiento [por ejemplo, (55)]. Esto es especialmente importante para la evaluación del envenenamiento secundario en cadenas alimentarias terrestres (4). Varios métodos de ensayo nacionales se refieren a la cuestión de la bioacumulación en organismos diferentes de los peces, como, por ejemplo, (2) y (72). La American Society for Testing and Materials ha elaborado un método para medir la bioacumulación en gusanos de tierra (*Eisenia fetida*, Savigny) y gusanos terrestres del género *Enchytraeus* (3). Un método reconocido internacionalmente para la determinación de la bioacumulación en suelo enriquecido mejorará la evaluación del riesgo que plantean las sustancias para los ecosistemas terrestres [por ejemplo, (25) (29)].
2. Los invertebrados que ingieren suelo están expuestos a las sustancias unidas a este. Entre dichos animales, los oligoquetos terrestres desempeñan una papel importante para la estructura y la función de los suelos (15) (20). Los oligoquetos terrestres viven en el interior del suelo y parcialmente en su superficie (especialmente en la capa de materia orgánica en descomposición); suelen representar las especies más abundantes en términos de biomasa (54). Al remover la tierra y servir de presa estos animales pueden influir mucho en la biodisponibilidad de las sustancias para otros organismos, como predadores invertebrados [por ejemplo, ácaros y escarabajos predadores (64)] o vertebrados [por ejemplo, zorros y gaviotas (18) (62)]. En el apéndice 5 se describen algunas especies de oligoquetos terrestres que se utilizan actualmente en ensayos ecotoxicológicos.

3. La guía ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus* (3) proporciona muchos datos fundamentales y útiles para la realización del presente método de ensayo sobre bioacumulación en el suelo. También se hace referencia en el presente método de ensayo al capítulo C.13 del presente anexo (Bioconcentración — Ensayo dinámico con peces) (49) y a las directrices TG 315 de la OCDE (Bioacumulación en oligoquetos bentónicos que viven en los sedimentos) (53). Asimismo, constituyen fuentes principales de información para el presente método de ensayo la experiencia práctica con estudios de bioacumulación en el suelo y las publicaciones de la bibliografía, como, por ejemplo, (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).
4. El método de ensayo es sobre todo aplicable a las sustancias orgánicas neutras y estables, que tienden a adsorberse al suelo. Es posible que este método de ensayo pueda aplicarse en los ensayos de bioacumulación de compuestos organometálicos estables que se asocian al suelo. También es aplicable a los metales y otros oligoelementos.

REQUISITO PREVIO

5. Se han realizado ensayos para medir la bioacumulación en los oligoquetos terrestres en relación con metales pesados [véase por ejemplo (63)] y de sustancias orgánicas persistentes con un valor de $\log K_{ow}$ entre 3,0 y 6,0 [véase por ejemplo (40)]. Estos ensayos también son aplicables a:
 - las sustancias con un valor de $\log K_{ow}$ superior a 6,0 (sustancias superhidrofóbicas),
 - las sustancias que pertenecen a una clase de sustancias orgánicas de las que se sepa que tienen potencial para bioacumularse en organismos vivos como, por ejemplo, las sustancias tensioactivas o muy adsorbentes,
 - las sustancias cuyas características estructurales indican potencial de bioacumulación como, por ejemplo, los análogos de sustancias con potencial de bioacumulación conocido, y
 - los metales.
6. Antes de empezar el estudio ha de obtenerse información sobre la sustancia problema, como el nombre común, el nombre químico (de preferencia la denominación IUPAC), la fórmula estructural, el número de registro CAS, la pureza, las precauciones de seguridad, las condiciones adecuadas de conservación y los métodos analíticos. Además, deben conocerse los datos siguientes:
 - a) hidrosolubilidad;
 - b) coeficiente de reparto octanol/agua K_{ow} ;
 - c) coeficiente de reparto suelo/agua K_{oc} ;
 - d) presión de vapor;
 - e) degradabilidad (por ejemplo, en el suelo, en agua);
 - f) metabolitos conocidos.
7. Pueden utilizarse sustancias problema tanto con marcado radiactivo como sin él. Sin embargo, para facilitar el análisis se recomienda emplear sustancias problema con marcado radiactivo. La decisión dependerá de los límites de detección o de la necesidad de medir la sustancia problema inicial y sus metabolitos. Si se utiliza una sustancia problema con marcado radiactivo y se miden los residuos radiactivos totales, es importante caracterizar estos residuos tanto en el suelo como en los organismos de ensayo en cuanto a los porcentajes de sustancia problema inicial y de otras sustancias marcadas, por ejemplo en muestras tomadas en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción, para poder calcular un factor de bioacumulación (BAF) de la sustancia problema inicial y de sus metabolitos importantes presentes en el suelo (véase el punto 50). Es posible que se tenga que modificar el método aquí descrito como, por ejemplo, para conseguir biomasa suficiente o para medir sustancias problema orgánicas no marcadas radiactivamente o metales. Cuando se miden los residuos radiactivos totales (por recuento de centelleo líquido tras la extracción, combustión o disolución de los tejidos), el factor de bioacumulación se basará en la sustancia problema inicial y en sus metabolitos. El cálculo del BAF se basará preferentemente en la concentración de la sustancia problema inicial en los organismos y en los residuos radiactivos totales. Posteriormente, debe calcularse el factor de acumulación biota-suelo (BSAF), normalizado teniendo en cuenta el contenido de lípidos de los gusanos y el contenido de carbono orgánico (CO) del suelo, a partir del BAF, para permitir comparar los resultados obtenidos con diferentes ensayos de bioacumulación.

8. Debe conocerse la toxicidad de la sustancia problema para la especie utilizada en el ensayo, por ejemplo en forma de concentración con efecto (EC_x) o de concentración letal (LC_x) por la fase de absorción [por ejemplo, (19)]. Normalmente, la concentración seleccionada de la sustancia problema será aproximadamente del 1 % de su LC₅₀ aguda asintótica, y al menos diez veces superior a su límite de detección en el suelo por el método de análisis elegido. Cuando sea posible, se dará prioridad a los valores de toxicidad derivados de estudios a largo plazo con parámetros subletales (51) (52). Si no se dispone de tales datos, un ensayo de toxicidad aguda aportará información útil [véase, por ejemplo, (23)].
9. Debe disponerse de un método analítico adecuado, de exactitud, precisión y sensibilidad conocidas para la cuantificación de la sustancia en las soluciones de ensayo, en el suelo y en el material biológico, así como de datos sobre la preparación y la conservación de las muestras, junto con las fichas de datos de seguridad de los materiales. Es necesario también conocer el límite de detección analítica de la sustancia problema tanto en el suelo como en los tejidos de los gusanos. Si se utiliza una sustancia problema con marcado radiactivo, debe conocerse la radiactividad específica (es decir, en Bq mol⁻¹) y el porcentaje de radiactividad asociada con las impurezas. La radiactividad específica de la sustancia problema debe ser suficientemente elevada para facilitar el análisis, y las concentraciones de ensayo utilizadas no deben provocar efectos tóxicos.
10. El ensayo puede efectuarse con suelo artificial o con suelos naturales. Antes del inicio del ensayo debe disponerse de información sobre las características del suelo natural empleado como, por ejemplo, origen del suelo o sus componentes, pH, contenido de carbono orgánico, granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), y capacidad de retención de agua (WHC) (3) (48).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. Entre los parámetros que caracterizan la bioacumulación de una sustancia problema se cuentan el factor de bioacumulación (BAF), la constante de la velocidad de absorción (k_a) y la constante de la velocidad de eliminación (k_e). En el apéndice 1 se dan las definiciones pertinentes.
12. El ensayo se divide en dos fases: la de absorción (exposición) y la de eliminación (post-exposición). Durante la fase de absorción, se exponen al suelo, que se ha enriquecido con la sustancia problema, grupos de gusanos en paralelo (réplicas). Además de los animales de ensayo, se someten a las mismas condiciones pero sin la sustancia problema grupos de gusanos de control. Se miden el peso seco y el contenido de lípidos de los organismos de ensayo. Esto puede hacerse con gusanos del grupo de control. Pueden obtenerse valores analíticos de referencia (blanco) analizando muestras del suelo y de los gusanos de control. Para la fase de eliminación, los gusanos se pasan a un suelo libre de la sustancia problema. Siempre hay que hacer una fase de eliminación, salvo que la absorción de la sustancia problema durante la fase de exposición haya sido insignificante. La fase de eliminación aporta información sobre la velocidad a la que los organismos de ensayo excretan la sustancia problema [por ejemplo, (27)]. Si durante la fase de absorción no se ha llegado a un estado de equilibrio, es preferible que la determinación de los parámetros cinéticos (factor de bioacumulación cinético, BAF_k) y las constantes de velocidad de absorción y de eliminación se base en el ajuste simultáneo de los resultados de las fases de absorción y de eliminación. La concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de los gusanos es objeto de seguimiento a lo largo de ambas fases del ensayo.
13. Durante la fase de absorción, se efectúan mediciones a los tiempos de muestreo hasta 14 días (enquistreidos) o 21 días (gusanos de tierra) hasta que se alcance el estado de equilibrio (11) (12) (67). El estado de equilibrio se alcanza cuando una representación de la concentración en los gusanos frente al tiempo es paralela al eje del tiempo, y tres análisis sucesivos de la concentración efectuados con muestras tomadas a intervalos de al menos dos días no muestran una diferencias entre sí superiores al ± 20 % sobre la base de comparaciones estadísticas (por ejemplo, análisis de varianza, análisis de regresión).
14. La fase de eliminación consiste en transferir los organismos de ensayo a recipientes que contienen el mismo sustrato pero sin la sustancia problema. Durante la fase de eliminación, se llevan a cabo mediciones a los tiempos de muestreo durante 14 días (enquistreidos) o 21 días (gusanos de tierra) salvo que en alguna determinación analítica se ponga antes de manifiesto que se ha llegado a una reducción del 90 % de los residuos de la sustancia problema en los gusanos. La concentración de la sustancia problema en los gusanos al final de la fase de eliminación se registra como residuos no eliminados. El factor de bioacumulación en el estado de equilibrio (BAF_{ss}) se calcula de preferencia como la proporción de la concentración en gusanos (Ca) y en el suelo (Cs) en el estado de equilibrio aparente, y también como factor de bioacumulación cinético (BAF_k) que es la proporción entre la constante de la velocidad de absorción desde el suelo (k_a) y la constante de la velocidad de eliminación (k_e) (véanse las definiciones en el apéndice 1), aceptando que la cinética es de orden 1 (véanse los cálculos en el apéndice 2). En caso de que claramente no pueda aplicarse la cinética de primer orden, será necesario emplear otros modelos.
15. La constante de la velocidad de absorción, la constante de la velocidad de eliminación (o constantes, cuando participen otros modelos), el factor de bioacumulación cinético (BAF_k) y, cuando sea posible, los límites de confianza de cada uno de estos parámetros, se calculan a partir de ecuaciones modelo con ayuda de ordenador (véanse orientaciones en el apéndice 2). La adecuación del ajuste de cualquier modelo puede determinarse a partir de, por ejemplo, el coeficiente de correlación o del coeficiente de determinación (si los coeficientes están próximos a la unidad, es que la adecuación es buena) o con la prueba de ji cuadrado. También puede ser indicativo de la calidad del ajuste del modelo el orden del error típico o el límite de confianza alrededor de los parámetros estimados.
16. Para reducir la variabilidad de los resultados de los ensayos de sustancias problema con elevada lipofilia, los factores de bioacumulación deben expresarse en relación con el contenido de lípidos y el contenido de carbono orgánico (kg de carbono orgánico en el suelo/kg de contenido de lípidos en los gusanos). Este enfoque se basa

en el hecho de que, con algunos tipos de sustancias químicas, hay una clara relación entre el potencial de bioacumulación y la lipofilia; esto está bien demostrado en peces (47). Hay una relación entre el contenido en lípidos de los peces y la bioacumulación de tales sustancias. Se han encontrado correlaciones similares en los organismos bentónicos [véanse, por ejemplo, (30) (44)]. Análogamente se ha demostrado esta correlación en el caso de los oligoquetos terrestres [véanse por ejemplo (5) (6) (7) (14)]. Si se dispone de suficiente tejido de gusanos, puede determinarse el contenido en lípidos de los animales de ensayo con el mismo material biológico que se utilice para determinar la concentración de la sustancia problema. Otra posibilidad es utilizar los animales de control para medir el contenido en lípidos.

VALIDEZ DEL ENSAYO

17. Para que un ensayo sea válido, deben cumplir los siguientes criterios tanto los grupos de control como los de tratamiento:
- Al final del ensayo, la mortalidad general durante las fases de absorción y de eliminación no debe superar el 10 % (gusanos de tierra) o el 20 % (enquistados) del número total de gusanos introducidos.
 - Respecto a *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*, la pérdida media de masa medida al final de la fase de absorción y al final de la fase de eliminación no debe superar el 20 % respecto al peso fresco (pf) al inicio de cada fase.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Especies de ensayo

18. Para el ensayo de bioacumulación se recomienda emplear varias especies de oligoquetos terrestres. Las especies *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei* (Lumbricidae), o *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus*, o *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae), que son las más frecuentemente utilizadas, se describen en el apéndice 5.

Equipo

19. Se tendrá cuidado de no utilizar, con ninguna parte del equipo, materiales que puedan disolver o adsorber la sustancia problema o lixivar otras sustancias, o tener algún efecto adverso sobre los animales de ensayo. Pueden utilizarse recipientes normales rectangulares o cilíndricos, de materiales químicamente inertes y de una capacidad adecuada para la tasa de carga, es decir, para el número de gusanos de ensayo. Para los equipos que estén en contacto con los medios de ensayo pueden utilizarse acero inoxidable, plástico o vidrio. Los recipientes de ensayo deben estar cubiertos de forma adecuada para evitar que se escapen los gusanos, pero permitiendo que entre suficiente aire. En el caso de sustancias con elevados coeficientes de adsorción, como los piretroides sintéticos, puede ser necesario emplear vidrio silanizado. Será necesario, en estos casos, deshacerse de los equipos una vez usados (49). Debe evitarse que se escapen las sustancias problema con marcado radiactivo y también las sustancias volátiles. Deben emplearse trampas (por ejemplo, frascos lavadores de gas, de vidrio) con absorbentes adecuados para retener los eventuales residuos que se evaporen de los recipientes de ensayo.

Suelo

20. El suelo de ensayo debe ser tal que permita la supervivencia y, preferentemente, la reproducción de los organismos de ensayo durante los períodos de aclimatación y de ensayo, sin que aparezcan comportamientos ni aspectos anormales en los animales. Los gusanos deben enterrarse en el suelo.
21. Se recomienda para usarlo como sustrato de los ensayos el suelo artificial descrito en el capítulo C.8 del presente anexo (48). En el apéndice 4 se explica la preparación del suelo artificial para emplearlo en los ensayos de acumulación, y se dan recomendaciones para su almacenamiento. El suelo artificial seco al aire puede conservarse a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.
22. Sin embargo, como suelo para el ensayo o para el cultivo de los gusanos pueden emplearse suelos naturales procedentes de lugares exentos de contaminación. Los suelos naturales deben caracterizarse al menos por su origen (lugar de recogida), pH, contenido de carbono orgánico, granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), capacidad de retención de agua máxima del suelo (WHCmax), y contenido porcentual de agua (3). El análisis del suelo o de sus componentes para detectar microcontaminantes antes de la utilización debe aportar información útil. Si se utiliza suelo de campo de tierras agrícolas, no debe haberse tratado con productos fitosanitarios ni haberse fertilizado con estiércol de animales tratados durante al menos un año ni con fertilizantes orgánicos durante al menos seis meses antes del muestreo (50). En la referencia 3 se describen los procedimientos de manipulación de los suelos naturales antes de su empleo en los ensayos de ecotoxicología con oligoquetos en laboratorio. El período de almacenamiento de los suelos naturales en el laboratorio debe ser lo más breve posible.

Aplicación de la sustancia problema

23. La sustancia problema se incorpora al suelo. Hay que tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema. Las sustancias problema hidrosolubles deben disolverse completamente en agua antes de mezclarse con el suelo. El procedimiento de enriquecimiento del suelo con sustancias problema poco hidrosolubles implica el recubrimiento de uno o varios de los componentes del suelo (artificial) con la sustancia problema. Por ejemplo, la arena de cuarzo, o una porción de la misma, puede sumergirse en una solución

de la sustancia problema en un disolvente orgánico adecuado, que se evapora lentamente después hasta sequedad. La fracción recubierta puede mezclarse a continuación con el suelo húmedo. La ventaja principal de este procedimiento es que no se introduce ningún disolvente en el suelo. Cuando se utiliza suelo natural, la sustancia problema puede añadirse introduciéndola en una porción de suelo secada al aire como se describe más arriba respecto al suelo artificial, o agitando la sustancia problema en el suelo húmedo, con una fase posterior de evaporación si se utiliza agente solubilizante. En general, debe evitarse el contacto del suelo húmedo con los disolventes, en la medida de lo posible. Deben considerarse los elementos siguientes (3):

- Si se utiliza un disolvente distinto del agua, debe ser uno miscible con esta y/o que pueda extraerse (por ejemplo, mediante evaporación), para dejar en el suelo solamente la sustancia problema.
 - Si se utiliza un control del disolvente, no es necesario emplear un control negativo. El control del disolvente debe contener la máxima concentración de disolvente que se haya añadido al suelo y hay que utilizar disolvente del mismo lote empleado para hacer la solución madre. Los principales criterios para la selección de un agente solubilizante adecuado deben ser la toxicidad y la volatilidad del disolvente, y la solubilidad de la sustancia problema en el disolvente elegido.
24. En el caso de sustancias poco solubles en agua y en disolventes orgánicos, es posible mezclar (por ejemplo, utilizando un mortero) entre 2,0 y 2,5 g de arena de cuarzo finamente molida por recipiente de ensayo con la cantidad de sustancia problema necesaria para obtener la concentración de ensayo deseada. Esta mezcla de arena de cuarzo y sustancia problema se añade al suelo previamente humedecido y se mezcla completamente con la cantidad adecuada de agua desionizada para obtener el contenido necesario de humedad. La mezcla final se reparte en los recipientes de ensayo. Se repite el procedimiento con cada concentración de ensayo, y se prepara asimismo un control adecuado con 2,0 – 2,5 g de arena de cuarzo finamente molida por recipiente de ensayo.
25. Debe determinarse la concentración de la sustancia problema en el suelo tras su adición a este. Ha de verificarse que la sustancia problema está distribuida de forma homogénea en el suelo antes de introducir los organismos de ensayo. Hay que indicar el método utilizado para añadir la sustancia problema y los motivos de la elección del procedimiento concreto (24).
26. Lo ideal es que se establezca el equilibrio entre el suelo y la fase de agua intersticial antes de añadir los organismos; se recomienda dejar un tiempo de cuatro días a 20 °C. Con muchas sustancias orgánicas poco hidrosolubles, el plazo necesario para alcanzar un equilibrio verdadero entre las fracciones adsorbidas y las disueltas puede ser del orden de días o de meses. En función del objeto del estudio, por ejemplo cuando se pretende simular las condiciones ambientales, el suelo al que se ha añadido la sustancia puede "envejecerse" durante un plazo mayor como por ejemplo, en el caso de los metales, de tres semanas a 20 °C (22).

Cultivo de los organismos de ensayo

27. Es preferible mantener los gusanos en cultivos de laboratorio permanentes. En el apéndice 5 se dan orientaciones sobre los métodos de cultivo en laboratorio de *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*, así como de especies de enquistreídos [véanse también (48) (51) (52)].
28. Los gusanos utilizados en los ensayos deben estar libres de enfermedades, anomalías y parásitos observables.

REALIZACIÓN DEL ENSAYO

29. Los organismos de ensayo se exponen a la sustancia problema durante la fase de absorción, la cual debe durar 14 días (con los enquistreídos) o 21 días (con los gusanos de tierra), salvo que se demuestre que se ha alcanzado el estado de equilibrio.
30. Para la fase de eliminación, los gusanos se pasan a un suelo libre de la sustancia problema. La primera muestra debe tomarse a las 4 – 24 h tras el inicio de la fase de eliminación. En el apéndice 3 se dan ejemplos de planes de muestreo con una fase de absorción de 21 días y una fase de eliminación también de 21 días.

Organismos de ensayo

31. En muchas especies de enquistreídos terrestres, el peso de cada individuo es muy bajo (por ejemplo, de 5-10 mg de peso húmedo por individuo de *Enchytraeus albidus* y aún menos en el caso de *Enchytraeus crypticus* o de *Enchytraeus luxuriosus*); a fin de efectuar las mediciones del peso y el análisis químico, puede ser necesario agrupar los gusanos de los recipientes de ensayo replicados (es decir, todos los gusanos de un recipiente replicado se utilizarán para obtener un solo resultado de los tejidos analizados). A cada recipiente replicado se añaden 20 individuos de enquistreídos, y se utilizan al menos tres réplicas. Si el límite de detección analítica de la sustancia problema es elevado, puede ser necesario emplear más gusanos. Cuando se trate de especies de ensayo con mayor peso individual (*Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*), pueden emplearse recipientes replicados con un solo individuo.
32. Los gusanos de tierra empleados en un ensayo deben tener pesos similares (por ejemplo, los individuos de *Eisenia fetida* y de *Eisenia andrei* deben tener un peso de 250 – 600 mg). Los enquistreídos (por ejemplo, *Enchytraeus albidus*) deben tener una longitud aproximada de 1 cm. Todos los gusanos utilizados en un ensayo concreto deben proceder de la misma fuente, y ser adultos con clitelo (véase el apéndice 5). Ya que el peso y la

edad de un animal pueden afectar a los valores del BAF (por ejemplo, debido a las variaciones en el contenido de lípidos o a la presencia de huevos), estos parámetros deben registrarse con exactitud y tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados. Además, pueden depositarse capullos durante el período de exposición, lo que también afecta a los valores del BAF. Se recomienda pesar una submuestra de la población de gusanos de ensayo antes del ensayo, para calcular el peso medio, tanto seco como húmedo.

33. Debe ser elevada la proporción de suelo respecto a los gusanos, para minimizar la disminución de la concentración de la sustancia problema en el suelo durante la fase de absorción. Con *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* se recomienda una cantidad mínima de 50 g de peso seco (p.s.) de suelo por gusano; con enquistreidos, la recomendación es de un mínimo de 10-20 g p.s. de suelo por recipiente de ensayo. Los recipientes deben contener una capa de suelo de 2-3 cm (enquistreidos) o 4-5 cm (gusanos de tierra).
34. Los gusanos empleados en un ensayo se toman del cultivo (por ejemplo, en el caso de los enriqueidos utilizando unas pinzas de joyero). Se transfieren animales adultos a un suelo de ensayo no tratado para su aclimatación, y se les da comida (véase el punto 36). Si las condiciones de ensayo son diferentes de las condiciones de cultivo, debe ser suficiente una fase de aclimatación de 24 - 72 h para que los gusanos se adapten a las condiciones de ensayo. Tras su aclimatación, los gusanos de tierra se lavan transfiriéndolos a placas de vidrio (por ejemplo, placas Petri) que contengan agua limpia, y después se pesan antes de añadirlos al suelo de ensayo. Antes de hacer la pesada, debe retirarse el exceso de agua de los gusanos, poniéndolos suavemente contra el borde de la placa o secándolos con precaución con una servilleta de papel humedecida ligeramente.
35. Debe observarse y registrarse la conducta de enterramiento de los organismos de ensayo. En los ensayos con gusanos de tierra, los animales (de control y de tratamiento) se entierran normalmente en el suelo en el plazo de unas pocas horas; ha de comprobarse que esto es así en el plazo máximo de 24 h tras la adición de los gusanos a los recipientes de ensayo. Si los gusanos no se entierran en el suelo (por ejemplo, hay más del 10 % de gusanos que no se entierran a lo largo de más de la mitad de la fase de absorción), puede ser que las condiciones de ensayo no sean adecuadas o bien que los organismos de ensayo no estén sanos. En tal caso, es necesario parar el ensayo y repetirlo. Los enquistreidos viven principalmente en los poros intersticiales del suelo, y con frecuencia su tegumento puede estar en contacto tan solo parcial con el sustrato que lo rodea; se acepta que la exposición de los enquistreidos enterrados y no enterrados es equivalente, y el que estos animales no se entierran no implica necesariamente que deba repetirse el ensayo.

Alimentación

36. Debe preverse dar alimento a los animales cuando se utilice un suelo con bajo contenido de carbono orgánico total. Si se utiliza suelo artificial, se recomienda una tasa de alimentación semanal (es decir, los gusanos se alimentan una vez por semana) de 7 mg de estiércol seco por gramo de suelo en peso seco para los gusanos de tierra, y una tasa semanal de 2 - 2,5 mg de copos de avena molidos por gramo de suelo en peso seco para los enquistreidos (11). La primera ración de alimento debe mezclarse con el suelo justo antes de que se añadan los organismos de ensayo. Es preferible utilizar el mismo tipo de alimento que en los cultivos (véase el apéndice 5).

Luz y temperatura

37. Los ensayos deben efectuarse con un ciclo controlado de 16/8 horas de luz/oscuridad, con un nivel de iluminación preferentemente de 400 a 800 lx en la zona de los recipientes de ensayo (3). La temperatura de ensayo debe ser de 20 ± 2 °C en toda la duración.

Concentraciones de ensayo

38. Se utiliza una única concentración. Deben justificarse las situaciones en que sea necesario añadir una o varias concentraciones más. Si la toxicidad (EC₅₀) de la sustancia problema está próxima al límite de detección analítica, se recomienda utilizar sustancias problema con marcado radiactivo de elevada radiactividad específica. En el caso de los metales, la concentración debe ser superior al nivel de fondo de los tejidos y del suelo.

Réplicas

39. Para las mediciones cinéticas (fases de absorción y de eliminación), el número mínimo de réplicas de recipientes tratados debe ser de tres por punto de muestreo. El número total de réplicas preparadas debe ser suficiente para todos los puntos de muestreo previstos de las fases de absorción y de eliminación.
40. Para las observaciones y mediciones biológicas (por ejemplo, relación entre peso seco y peso húmedo, contenido de lípidos) y para el análisis de las concentraciones de fondo en los gusanos y el suelo, deben preverse al menos 12 recipientes replicados de un control negativo (cuatro muestreados al inicio, cuatro al final de la fase de absorción y cuatro al final de la fase de eliminación) si no se utiliza ningún disolvente distinto del agua. Si se emplea algún agente solubilizante para la aplicación de la sustancia problema, debe utilizarse, además de las réplicas tratadas, un control del disolvente (cuatro recipientes de ensayo muestreados al inicio, cuatro al final de la fase de absorción y cuatro al final de la fase de eliminación) con todos los componentes salvo la sustancia problema. En este caso, pueden prepararse otros cuatro recipientes adicionales de un control negativo (sin disolvente) para permitir un muestreo opcional al final de la fase de absorción. Estas réplicas pueden compararse biológicamente con el control de disolvente para obtener información en cuanto a la posible influencia del disolvente sobre los organismos de ensayo. Se recomienda preparar un número suficiente de recipientes adicionales de reserva (por ejemplo, ocho) añadidos a los de tratamiento y de control.

Frecuencia de las mediciones de la calidad del suelo

41. Al inicio y al final de las fases de absorción y de eliminación deben medirse el pH del suelo, el contenido de humedad del suelo y (continuamente) la temperatura de la sala del ensayo. Una vez por semana debe controlarse el contenido de humedad del suelo pesando los recipientes de ensayo y comparando los pesos medidos en cada momento con los pesos iniciales del comienzo del ensayo. Las pérdidas de agua deben compensarse añadiendo agua desionizada.

Muestreo y análisis de los gusanos y del suelo

42. En el apéndice 3 se encuentra un ejemplo de plan para las fases de absorción y de eliminación de los ensayos de bioacumulación en gusanos de tierra y en enquistreidos.
43. Se toman muestras del suelo de los recipientes de ensayo para la determinación de la concentración de la sustancia problema antes de introducir los gusanos, y durante las fases de absorción y de eliminación. Durante el ensayo se determinan las concentraciones de la sustancia problema en los gusanos y en el suelo. En general, se miden las concentraciones totales en el suelo. Como opción pueden medirse las concentraciones en el agua intersticial; en tal caso, hay que aportar la justificación e indicar los métodos adecuados, antes del inicio del estudio, e incluir estos datos en el informe.
44. Se toman muestras de los gusanos y del suelo al menos en seis ocasiones durante las fases de absorción y de eliminación. Si se demuestra la estabilidad de la sustancia problema, puede reducirse el número de análisis del suelo. Se recomienda analizar al menos tres réplicas al inicio y al final de la fase de absorción. Si la concentración en el suelo medida al final de la fase de absorción se desvía de la concentración inicial en más del 30 %, será necesario analizar también las muestras de suelo en otras fechas.
45. En cada punto de muestreo se extraen los gusanos del suelo de una réplica dada (por ejemplo, después de extender el suelo de la réplica en una bandeja poco profunda, utilizando pinzas de joyero blandas) y se lavan rápidamente con agua en una bandeja poco profunda de vidrio o de acero. Se retira el exceso de agua (véase el punto 34). Se transfieren los gusanos con cuidado a un recipiente tarado y se pesan inmediatamente, incluido el contenido intestinal.
46. A continuación hay que dejar que los gusanos de tierra (*Eisenia sp.*) se purguen del contenido intestinal durante una noche, por ejemplo, en un papel de filtro húmedo puesto en una placa Petri cerrada (véase el punto 34). Tras la purga, debe determinarse el peso de los gusanos para evaluar una posible disminución de la biomasa durante el ensayo (véanse los criterios de validez en el punto 17). La pesada y el análisis tisular de los enquistreidos se efectúan sin purgar, ya que tales operaciones resultan difíciles técnicamente debido al pequeño tamaño de estos gusanos. Tras la determinación final del peso, los gusanos se matan inmediatamente, utilizando el método más adecuado (por ejemplo, con nitrógeno líquido, o congelando por debajo de -18 °C).
47. Durante la fase de eliminación, los gusanos van sustituyendo por suelo limpio el contenido intestinal contaminado. Esto significa que las mediciones de gusanos sin purgar (enquistreidos en este contexto) muestreados justo antes de la fase de eliminación incluyen el suelo contaminado presente en el intestino. Respecto a los oligoquetos acuáticos se acepta que, tras las primeras 4-24 h de la fase de eliminación, la mayor parte del contenido intestinal contaminado ha sido sustituido por sedimento limpio [véase, por ejemplo, (46)]. Se han comunicado observaciones similares en relación con los gusanos de tierra en estudios sobre la acumulación de cadmio y zinc radiomarcados (78). En los enquistreidos no purgados, la concentración de esta primera muestra de la fase de eliminación puede considerarse como la concentración tisular tras la purga intestinal. Para tener en cuenta la dilución de la concentración de la sustancia problema por el suelo no contaminado durante la fase de eliminación, es posible estimar el peso del contenido intestinal a partir de la relación entre el peso húmedo de los gusanos y el peso de las cenizas de los gusanos, o de la relación entre el peso seco de los gusanos y el peso de las cenizas de los gusanos.
48. Es preferible analizar las muestras de suelo y de gusanos inmediatamente después de haberlas tomado (es decir, en el plazo de 1 o 2 días) para evitar la degradación y otras pérdidas, y se recomienda calcular las velocidades aproximadas de absorción y de eliminación según se va llevando a cabo el ensayo. Si se retrasa el análisis, las muestras deben conservarse siguiendo un método adecuado como, por ejemplo, mediante congelación (≤ -18 °C).
49. Hay que comprobar que la precisión y la reproducibilidad del análisis químico, así como la recuperación de la sustancia problema de las muestras de suelo y de gusanos, son satisfactorias para el método considerado; deben indicarse la eficiencia de la extracción, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). Análogamente hay que comprobar que la sustancia problema no es detectable en los recipientes de control a concentraciones superiores a la de fondo. Cuando la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo Ca es > 0 en los gusanos de control, debe incluirse en el cálculo de los parámetros cinéticos (véase el apéndice 2). Todas las muestras deben manipularse a lo largo de todo el ensayo de manera que se minimicen la contaminación y las pérdidas (por ejemplo, derivadas de la adsorción de la sustancia problema al dispositivo de muestreo).

50. Cuando se trabaja con sustancias problema radiomarcadas, es posible analizar la sustancia original y sus metabolitos. La cuantificación de la sustancia problema original y de sus metabolitos en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción proporciona importante información. Las muestras deben "limpiarse" después, de manera que pueda cuantificarse aparte la sustancia problema original. Si alguno de los distintos metabolitos supera el 10 % de la radiactividad total de la muestra o muestras analizadas, se recomienda identificarlo.
51. Hay que registrar y comunicar la recuperación total y la recuperación de la sustancia problema en gusanos, suelo y, si se utilizan, trampas que contengan absorbentes para retener la sustancia problema evaporada.
52. Es aceptable mezclar los individuos muestreados de un recipiente de ensayo dado en el caso de los enquistreidos, que son más pequeños que los gusanos de tierra. Si esa mezcla implica reducir el número de réplicas, quedan limitados los procedimientos estadísticos que pueden aplicarse a los datos. Si se necesitan un procedimiento y una potencia estadística específica, convendrá entonces utilizar en el ensayo un número adecuado de recipientes de ensayo replicados, para conciliar la mezcla con el procedimiento y la potencia deseados.
53. Se recomienda expresar el BAF tanto en función del peso seco total como, cuando se requiera (es decir, en el caso de las sustancias muy hidrofóbicas), en función del contenido lipídico. Deben aplicarse métodos adecuados para la determinación del contenido lipídico; a este propósito deben adaptarse algunos métodos existentes, véase por ejemplo (31) (58). Estos métodos aplican una técnica de extracción con cloroformo/metanol. Sin embargo, para evitar el uso de disolventes clorados debe utilizarse una modificación del método de Bligh y Dyer (9), como se describe en (17). Los diversos métodos pueden no dar valores idénticos, por lo que es importante precisar bien el método utilizado. Lo ideal es hacer el análisis de los lípidos, cuando sea posible (es decir, si se dispone de suficiente tejido de gusanos), con la misma muestra o extracto que se haya utilizado para el análisis de la sustancia problema, puesto que los lípidos deben a menudo retirarse del extracto antes de que este se pueda analizar por cromatografía (49). Otra posibilidad es utilizar animales del control para medir el contenido lipídico, el cual puede servir para normalizar los valores del BAF. Este último planteamiento reduce la contaminación del equipo con la sustancia problema.

DATOS E INFORME

Tratamiento de los resultados

54. La curva de absorción de la sustancia problema se obtiene representando gráficamente su concentración en la superficie o el interior de los gusanos durante la fase de absorción en función del tiempo, con una escala aritmética. Cuando la curva ha alcanzado la fase de meseta, o un estado de equilibrio (véanse las definiciones en el apéndice 1), el factor de bioacumulación en el estado de equilibrio (BAFss) se calcula con ayuda de la fórmula siguiente:

$$\frac{C_a \text{ en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción (media)}}{C_s \text{ en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción (media)}}$$

C_a es la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo

C_s es la concentración de la sustancia problema en el suelo

55. Si no se alcanza el estado de equilibrio, debe determinarse el BAFk, a partir de las constantes de velocidad, en lugar del BAFss, como se describe a continuación:

- Determinar el factor de acumulación (BAFK) como la relación k_s/k_e .
- Es preferible calcular simultáneamente las constantes de absorción y de eliminación (véase la ecuación 11 del apéndice 2).
- La constante de la velocidad de eliminación (k_e) se calcula normalmente a partir de la curva de eliminación (es decir, la gráfica de la concentración de la sustancia problema en los gusanos durante la fase de eliminación). A continuación se calcula la constante de la velocidad de absorción k_s a partir de k_e y del valor de C_a derivado de la curva de absorción; véase en el apéndice 2 una descripción de estos métodos. Para obtener el factor de bioconcentración BAFK y las constantes de velocidad k_s y k_e se utilizarán preferiblemente métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales. En caso de que la eliminación claramente no siga una cinética de primer orden, será necesario emplear otros modelos más complejos.

Informe del ensayo

56. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

- Toda la información disponible sobre la toxicidad aguda o a largo plazo (por ejemplo EC_x, LC_x, NOEC) de la sustancia problema respecto a los oligoquetos que viven en el suelo.
- Pureza, naturaleza física y propiedades fisicoquímicas como, por ejemplo, log K_{ow}, hidrosolubilidad.
- Datos de identificación química, fuente de la sustancia problema, identidad y concentración de los eventuales disolventes utilizados.
- Si se utilizan sustancias problema radiomarcadas, la posición precisa de los átomos marcados, la radiactividad específica y la pureza radioquímica.

Especie de ensayo:

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

Condiciones de ensayo:

- Procedimiento de ensayo seguido.
- Tipo y características del alumbrado y del fotoperíodo o fotoperíodos utilizados.
- Diseño del ensayo (por ejemplo, número y tamaño de los recipientes de ensayo, masa de suelo y altura de la capa de suelo, número de réplicas, número de gusanos por réplica, número de concentraciones de ensayo, duración de las fases de absorción y eliminación, frecuencia del muestreo).
- Justificación de la elección del material de los recipientes de ensayo.
- Método de preparación y aplicación de la sustancia problema, así como motivos para elegir un método específico.
- Concentraciones de ensayo nominales, medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas en los recipientes de ensayo, y método de obtención de estos valores.
- Fuente de los componentes del suelo artificial o, si se utilizan medios naturales, origen del suelo, descripción de los eventuales tratamientos previos, resultados de los controles (supervivencia, desarrollo de la biomasa, reproducción), características del suelo (pH, contenido de carbono orgánico total, granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), WHCmax, contenido porcentual de agua al inicio y al final del ensayo, y otras mediciones realizadas eventualmente).
- Información pormenorizada sobre el tratamiento de las muestras de suelo y de gusanos, incluidos datos de preparación, almacenamiento, adición de la sustancia problema, extracción y procedimientos (y precisión) del análisis de la sustancia problema en los gusanos y en el suelo y del contenido lipídico (si se mide), y recuperaciones de la sustancia problema.

Resultados:

- Mortalidad de los gusanos de control y de los gusanos de cada recipiente de ensayo, y eventuales comportamientos anormales observados (por ejemplo, evitación del suelo, ausencia de reproducción en un ensayo de bioacumulación con enquistados).
- Relación de peso seco a peso húmedo del suelo y de los organismos del ensayo (útil a efectos de normalización).
- Pesos húmedos de los gusanos a cada punto temporal de muestreo; en el caso de los gusanos de tierra, los pesos húmedos al inicio del ensayo y a cada punto temporal de muestreo antes y después de la purga intestinal.
- El contenido lipídico de los organismos de ensayo (si se determina).

- Curvas que indiquen las cinéticas de absorción y de eliminación de la sustancia problema en los gusanos y el tiempo hasta alcanzar el estado de equilibrio.
- C_a y C_s (con desviación típica y bandas, en caso adecuado) a todos los puntos temporales de muestreo (C_a expresada en g kg^{-1} de peso húmedo y seco de cuerpo completo, C_s expresada en g kg^{-1} de peso húmedo y seco de suelo); si se necesita conocer el factor de acumulación biota-suelo (BSAF) (por ejemplo, a efectos de comparación de los resultados de dos o más ensayos realizados con animales de diferente contenido lipídico), C_a puede expresarse además en g kg^{-1} de contenido lipídico del organismo, y C_s puede expresarse en g kg^{-1} de carbono orgánico del suelo.
- BAF (expresado en $\text{kg de suelo kg}^{-1}$ de gusanos), constante de la velocidad de absorción del suelo k_s (expresada en $\text{g de suelo kg}^{-1}$ de gusanos día^{-1}), y constante de la velocidad de eliminación k_e (expresada en día^{-1}); también puede indicarse adicionalmente el BSAF (expresado en $\text{kg de CO del suelo kg}^{-1}$ de contenido lipídico de los gusanos).
- Los siguientes parámetros, si se miden: porcentajes de sustancia original, metabolitos, y residuos ligados (es decir, porcentaje de sustancia problema que no puede extraerse con métodos comunes de extracción) detectados en el suelo y en los animales de ensayo.
- Métodos utilizados para los análisis estadísticos de los datos.

Evaluación de los resultados:

- Cumplimiento de los resultados con los criterios de validez recogidos en el punto 17,
- resultados imprevistos o poco usuales como, por ejemplo, eliminación incompleta de la sustancia problema de los animales de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA:

- (1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ -HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.
- (2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- (3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid potworm Enchytraeus albidus. ASTM International, E1676-04: 26 pp.
- (4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation-New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.
- (5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (Eisenia andrei): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.
- (6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (Eisenia andrei): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.
- (7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (Eisenia andrei). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.
- (8) Bell AW (1958). The anatomy of Enchytraeus albidus, with a key to the species of the genus Enchytraeus. Ann. Mus. Novit. 1902: 1-13.
- (9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.
- (10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

- (11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R & D No.: 298 64 416.
- (12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). *Hydrobiologia* 463: 185-196.
- (13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm Eisenia fetida. *J. Soils Sediments* 3: 13-20.
- (14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91-100.
- (15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2-29.
- (16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitoring. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555-576.
- (17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- (18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140-145.
- (19) Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión (DO L 396 de 30.12.2006, p. 1).
- (20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.
- (21) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris
- (22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Roßlau), R & D No.: 204 67 458: 149 pp. Puede descargarse en la dirección: <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>
- (23) Elmgaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.
- (24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- (25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.
- (26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897-1905.

- (27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501-1514.
- (28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von g-1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.
- (29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. *UWSF-Z. Umweltchem, Ökotox.* 15: 78-84.
- (30) Gabric AJ, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. *Wat. Res.* 24: 1225-1231.
- (31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. *Limnology and Oceanography* 30: 1099-1105.
- (32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. *Wat. Res.* 22: 701-707.
- (33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. *J. Soils Sediments* 1: 15-20.
- (34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.
- (35) ISO 11268-2 (1998) Calidad del suelo: Efectos de los contaminantes en lombrices (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción.
- (36) Jaenike J (1982). "Eisenia foetida" is two biological species. *Megadrilogica* 4: 6-8.
- (37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 2080-2090.
- (38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 953-961.
- (39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 767-775.
- (40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). *Environ. Sci. Technol.* 37: 3399-3404.
- (41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 305-312.
- (42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. *Pedobiologia* 23: 217-232.
- (43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C -Hexachlorbenzol und ^{14}C -Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.
- (44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Toxicol.* 23: 588-595.

- (45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. *Ecotox. Environ. Safety* 36: 17-26.
- (46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 1244-1249.
- (47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of $\log K_{ow}/\log BCF$ correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- (48) Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.
- (49) Capítulo C.13 del presente anexo. Bioconcentración: Ensayo dinámico con peces.
- (50) Capítulo C.21 del presente anexo. Microorganismos del suelo: Ensayo de transformación del nitrógeno.
- (51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/Eisenia Andrei*), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- (53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris
- (54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287-388.
- (55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: *Handbook of Ecotoxicology* Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.
- (56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.
- (57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.
- (58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1431-1436.
- (59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.
- (60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.
- (61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeae als Testorganismen, In: *Toxikologische Beurteilung von Böden*. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.
- (62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W, Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Environ. Safety* 27: 107-127.

- (63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110-2120.
- (64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletal Dosierung. *Zool. Beitr. NF* 34: 413-433.
- (65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinae* 57: 93-100.
- (66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): *Synopses of the British Fauna (New Series)* No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- (67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557-2563.
- (68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309-320.
- (69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: *Advances in earthworm ecotoxicology*. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.
- (70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167-1171.
- (71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation-Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- (72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- (73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277-285.
- (74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: *Ecotoxicology of Earthworms* (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).
- (75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023-1033.
- (76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409-417.
- (77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23: 161-165.
- (78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1843-1851.
- (79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402-406.

Apéndice 1

DEFINICIONES

Bioacumulación es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo respecto a la concentración de esta sustancia en el medio ambiente. La bioacumulación es el resultado de procesos tanto de bioconcentración como de biomagnificación (véase más abajo).

Bioconcentración es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo derivado de la absorción de la sustancia solo a partir del medio circundante (es decir, a través de la superficie corporal y del suelo ingerido), respecto a la concentración de esta sustancia en el medio circundante.

Biomagnificación es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo derivado de la absorción a través de comida o presas contaminadas, respecto a la concentración de esta sustancia en la comida o en la presa. La biomagnificación puede provocar la transferencia o la acumulación de la sustancia dentro de redes alimentarias.

La **eliminación** de una sustancia problema es la pérdida de esta sustancia por parte del tejido del organismo de ensayo por procesos activos o pasivos que se producen independientemente de la presencia o ausencia de la sustancia en el medio circundante.

El **factor de bioacumulación** (BAF) en cualquier momento de la fase de absorción de este ensayo de bioacumulación es la concentración de la sustancia problema en la superficie o en el interior del organismo de ensayo (C_a en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso seco de gusanos) dividida por la concentración de la sustancia en el medio circundante (C_s en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso seco de suelo); la unidad del BAF es el kg de suelo $\cdot\text{kg}^{-1}$ de gusanos.

El **factor de bioacumulación en el estado de equilibrio** (BAF_{ss}) es el BAF en dicho estado y no cambia significativamente a lo largo de un período prolongado de tiempo, durante el cual se mantiene constante la concentración de la sustancia problema en el medio circundante (C_s en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso seco de suelo).

Los **factores de bioacumulación** calculados directamente a partir de la relación entre la constante de la velocidad de absorción del suelo y la constante de la velocidad de eliminación (k_s y k_e , véase más adelante) se denominan factores de bioacumulación cinéticos (BAF_K).

El **factor de acumulación biota-suelo** (BSAF) es la concentración (normalizada teniendo en cuenta el contenido lipídico) de la sustancia problema en la superficie o en el interior del organismo de ensayo, dividida entre la concentración (normalizada teniendo en cuenta el contenido de carbono orgánico) de la sustancia problema en el suelo en el estado de equilibrio. C_a se expresa entonces en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de contenido lipídico del organismo, y C_s en $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de carbono orgánico del suelo; la unidad del BSAF es el kg de carbono orgánico $\cdot\text{kg}^{-1}$ de lípidos.

La **meseta** o el **estado de equilibrio** se define como el equilibrio entre los procesos de absorción y de eliminación que se dan simultáneamente durante la fase de exposición. La fase de equilibrio se alcanza en la representación gráfica del BAF frente al tiempo cuando la curva se hace paralela al eje del tiempo y tres análisis sucesivos del BAF realizados con muestras tomadas a intervalos de, al menos, dos días presentan una diferencia máxima del $\pm 20\%$ entre sí, y no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres puntos temporales de muestreo. Si las sustancias problema se absorben con lentitud, es más apropiado que los intervalos sean semanales (49).

El **coeficiente de reparto carbono orgánico-agua** (K_{oc}) es la relación de la concentración de una sustancia en la fracción de carbono orgánico de un suelo respecto a su concentración en el agua, en equilibrio.

El **coeficiente de reparto octanol-agua** (K_{ow}) es la relación entre la solubilidad de una sustancia en n-octanol y en agua, en equilibrio; también se denomina P_{ow} . El logaritmo de K_{ow} ($\log K_{ow}$) se utiliza como indicación del potencial de bioacumulación de una sustancia por los organismos acuáticos.

La **fase de absorción o de exposición** es el tiempo durante el cual los organismos de ensayo se exponen a la sustancia problema.

La **constante de la velocidad de absorción del suelo** (k_s) es el valor numérico que define la velocidad del aumento de la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo debido a la absorción desde la fase del suelo. k_s se expresa en g de suelo kg^{-1} de gusanos d^{-1} .

La **fase de eliminación** es el tiempo, tras la transferencia de los organismos de ensayo desde un medio contaminado a un medio exento de la sustancia problema, durante el cual se estudia la eliminación (o la pérdida neta) de la sustancia por los organismos de ensayo.

La **constante de la velocidad de eliminación** (k_e) es el valor numérico que define la velocidad de reducción de la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo, tras la transferencia de los organismos de ensayo desde un medio que contiene la sustancia problema hacia un medio exento de ella; k_e se expresa en d^{-1} .

Sustancia problema: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

Apéndice 2

Cálculo de los parámetros de absorción y de eliminación

El parámetro principal del ensayo de bioacumulación es el factor de bioacumulación, el BAF. El BAF medido puede calcularse dividiendo la concentración en el organismo de ensayo, C_a , por la concentración en el suelo, C_s , en el estado de equilibrio. Si no se alcanza el estado de equilibrio durante la fase de absorción, en lugar del BAF_{ss} se calcula el BAF_K a partir de las constantes de velocidad. Sin embargo, ha de señalarse si el BAF se refiere o no a las concentraciones en el estado de equilibrio.

El medio usual de obtener el factor de bioacumulación cinético (BAF_K), la constante de la velocidad de absorción del suelo (k_s) y la constante de la velocidad de eliminación (k_e) es emplear métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales, por ejemplo siguiendo los modelos descritos en (68). Dado un conjunto de datos secuenciales de concentración en el tiempo y las ecuaciones del modelo:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ecuación 1}]$$

o

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{ecuación 2}]$$

donde:

C_a = concentración de sustancia en los gusanos [g kg⁻¹ de peso húmedo o seco]

k_s = constante de la velocidad de absorción en los tejidos [g de suelo kg⁻¹ de gusanos d⁻¹]

C_s = concentración de sustancia en el suelo [g kg⁻¹ de peso húmedo o seco]

k_e = constante de la velocidad de eliminación [d⁻¹]

t_c = tiempo al final de la fase de absorción;

estos programas informáticos calculan los valores de BAF_K, k_s y k_e .

Cuando la concentración de fondo en los gusanos no expuestos, por ejemplo en el día 0, se aparta significativamente de cero (como puede suceder, por ejemplo, con los metales), es necesario incluir la concentración de fondo ($C_{a,0}$) en estas ecuaciones, que así se convierten en las siguientes:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ecuación 3}]$$

y

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{ecuación 4}]$$

En los casos en que se observe un descenso significativo de la concentración de la sustancia problema en el suelo a lo largo del tiempo durante la fase de absorción, pueden utilizarse los modelos siguientes, por ejemplo (67) (79):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad [\text{ecuación 5}]$$

donde:

C_s = concentración de sustancia en el suelo [g kg⁻¹ de peso húmedo o seco]

k_0 = constante de la velocidad de degradación en el suelo [d⁻¹]

C_0 = concentración inicial de sustancia en el suelo [g kg⁻¹ de peso húmedo o seco]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ecuación 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t_c} - e^{-k_e t_c} * e^{-k_e(t - t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{ecuación 7}]$$

donde:

C_a = concentración de sustancia en los gusanos [g kg⁻¹ de peso húmedo o seco]

k_s = constante de la velocidad de absorción en los tejidos [g de suelo kg⁻¹ de gusanos d⁻¹]

k_0 = constante de la velocidad de degradación en el suelo [d⁻¹]

k_e = constante de la velocidad de eliminación [d⁻¹]

t_c = tiempo al final de la fase de absorción.

Cuando se alcanza el estado de equilibrio durante la fase de absorción (es decir, $t = \infty$), la ecuación 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{ecuación 1}]$$

puede reducirse a:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

o

$$C_a/C_s = k_s/k_e = BAF_K \quad [\text{ecuación 8}]$$

Entonces, $k_s/k_e \times C_s$ es una aproximación de la concentración de la sustancia problema en el tejido de los gusanos en el estado de equilibrio ($C_{a,ss}$).

El factor de acumulación biota-suelo (BSAF) puede calcularse de la forma siguiente:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad [\text{ecuación 9}]$$

donde f_{oc} es la fracción de carbono orgánico del suelo, y f_{lip} es la fracción de lípidos de los gusanos, habiéndose determinado ambos valores preferentemente en muestras tomadas del ensayo, y referidos al peso seco o al peso húmedo.

La cinética de eliminación puede modelizarse utilizando los datos de la fase de eliminación y aplicando la siguiente ecuación modelo y un método informático de estimación de parámetros no lineales. Si la representación de los datos frente al tiempo indica un declive exponencial constante de la concentración de la sustancia problema en los animales, puede utilizarse un modelo monocompartimental (ecuación 9) para describir la evolución temporal de la eliminación.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{ecuación 10}]$$

Los procesos de eliminación a veces resultan bifásicos, con un rápido declive de C_a durante las primeras etapas, que luego se convierte en una pérdida más lenta de sustancia problema en las fases posteriores de la eliminación [véanse, por ejemplo, (27) (68)]. Las dos fases pueden interpretarse aceptando que hay dos compartimentos diferentes en el organismo, y la sustancia problema sale de cada uno de ellos a diferentes velocidades. En estos casos hay que consultar la bibliografía específica, como (38) (39) (40) (78).

Utilizando las ecuaciones modelo anteriores, es posible calcular también los parámetros cinéticos (k_s y k_e) de una sola vez aplicando el modelo de cinética de primer orden a todos los datos de las fases tanto de absorción como de eliminación, simultáneamente. Para encontrar una descripción de un método que permite este cálculo combinado de las constantes de velocidad de absorción y de eliminación, pueden consultarse las referencias (41) (73) y (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[\frac{K_s}{K_e} \times C_s (e^{-K_e(t - t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2) \right] \quad [\text{ecuación 11}]$$

Nota: Cuando los parámetros de absorción y de eliminación se estiman simultáneamente a partir de los datos combinados de absorción y de eliminación, el símbolo "m" de la ecuación 11 es un descriptor que permite al programa informático asignar los subtrminos de la ecuación a los conjuntos de datos de la fase respectiva y llevar a cabo la evaluación correctamente (m = 1 para la fase de absorción; m = 2 para la fase de eliminación).

No obstante, estas ecuaciones modelo deben emplearse con precaución, especialmente cuando durante el ensayo se producen cambios en la (bio)degradación o en la biodisponibilidad de la sustancia problema [véase, por ejemplo, (79)].

Apéndice 3

EJEMPLOS DE CALENDARIOS DE ENSAYOS DE BIOACUMULACIÓN EN EL SUELO

Ensayo con gusanos de tierra

- a) Fase de absorción con ocho fechas de muestreo para el cálculo de la cinética

Día	Actividad
- 6	Acondicionamiento durante 48 h del suelo preparado.
- 4	Adición de la solución de la sustancia problema a la fracción del suelo; evaporación de los eventuales disolventes; mezcla de los componentes del suelo; distribución del suelo en los recipientes de ensayo; equilibrado a las condiciones de ensayo durante 4 días (3 semanas en caso de adición de metales al suelo).
- 3 a - 1	Separación de los organismos de ensayo del cultivo de aclimatación; preparación y humidificación de los componentes del suelo.
0	Medición de la temperatura y del pH del suelo; toma de muestras del suelo de los recipientes de tratamiento y de los controles de disolvente para determinar la concentración de la sustancia problema; adición de la ración alimentaria; pesada y distribución aleatorizada de los gusanos en los recipientes de ensayo; conservación de suficientes submuestras de gusanos para la determinación de los valores analíticos de fondo, peso húmedo y seco, y contenido lipídico; pesada de todos los recipientes de ensayo para controlar la humedad del suelo; control del aporte de aire, si se utiliza un sistema de ensayo cerrado.
1	Control del aporte de aire, registro del comportamiento de los gusanos y de la temperatura; toma de muestras de suelo y de gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema.
2	Como el día 1.
3	Control del aporte de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura.
4	Como el día 1.
5-6	Como el día 3.
7	Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada.
8-9	Como el día 3.
10	Como el día 1.
11-13	Como el día 3.
14	Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada.
15-16	Como el día 3.
17	Como el día 1.
18-20	Como el día 3.
21	Como el día 1; medición de la temperatura y del pH del suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo; final de la fase de absorción; transferencia de los gusanos de las réplicas expuestas restantes a recipientes que contienen suelo limpio, para la fase de eliminación (sin purga intestinal); toma de muestras de suelo y de gusanos para los controles de los disolventes.
	Las actividades previas a la exposición (fase de equilibrado) deben programarse teniendo en cuenta las propiedades de la sustancia problema.
	Las actividades descritas para el día 3 deben realizarse diariamente (al menos en los días laborables).

b) Fase de eliminación

Día	Actividad
- 6	Preparación y humidificación de los componentes del suelo; acondicionamiento durante 48 h del suelo preparado.
- 4	Mezcla de los componentes del suelo; distribución del suelo en los recipientes de ensayo; incubación a las condiciones de ensayo durante 4 días.
0 (final de la fase de absorción)	Medición de la temperatura y del pH del suelo; pesada y distribución aleatorizada de los gusanos en los recipientes de ensayo; adición de la ración alimentaria; transferencia de los gusanos de las réplicas expuestas restantes a recipientes que contienen suelo limpio; toma de muestras de suelo y de gusanos al cabo de 4 – 6 horas para determinar la concentración de la sustancia problema.
1	Control del aporte de aire, registro del comportamiento de los gusanos y de la temperatura; toma de muestras de suelo y de gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema.
2	Como el día 1.
3	Control del aporte de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura.
4	Como el día 1.
5-6	Como el día 3.
7	Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada.
8-9	Como el día 3.
10	Como el día 1.
11-13	Como el día 3.
14	Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada.
15-16	Como el día 3.
17	Como el día 1.
18-20	Como el día 3.
21	Como el día 1; medición de la temperatura y del pH del suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo; toma de muestras de suelo y de gusanos para los controles de los disolventes.
	La preparación del suelo antes del inicio de la fase de eliminación debe hacerse de la misma forma que antes de la fase de absorción.
	Las actividades descritas para el día 3 deben realizarse diariamente (al menos en los días laborables).

Ensayo con enquistreidos

a) Fase de absorción con ocho fechas de muestreo para el cálculo de la cinética

Día	Actividad
- 6	Acondicionamiento durante 48 h del suelo preparado.
- 4	Adición de la solución de la sustancia problema a la fracción del suelo; evaporación de los eventuales disolventes; mezcla de los componentes del suelo; distribución del suelo en los recipientes de ensayo; equilibrado a las condiciones de ensayo durante 4 días (3 semanas en caso de adición de metales al suelo).

Día	Actividad
-3 a -1	Separación de los organismos de ensayo del cultivo de aclimatación; preparación y humidificación de los componentes del suelo.
0	Medición de la temperatura y del pH del suelo; toma de muestras del suelo de los recipientes de tratamiento y de los controles de disolvente para determinar la concentración de la sustancia problema; adición de la ración alimentaria al suelo; pesada y distribución aleatorizada de los gusanos en los recipientes de ensayo; conservación de suficientes submuestras de gusanos para la determinación de los valores analíticos de fondo, peso húmedo y seco, y contenido lipídico; pesada de todos los recipientes de ensayo para controlar la humedad del suelo; control del aporte de aire, si se utiliza un sistema de ensayo cerrado.
1	Control del aporte de aire, registro del comportamiento de los gusanos y de la temperatura; toma de muestras de suelo y de gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema.
2	Como el día 1.
3	Control del aporte de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura.
4	Como el día 1.
5-6	Como el día 3.
7	Como el día 1; adición de la ración alimentaria al suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada.
9	Como el día 1.
10	Como el día 3.
11	Como el día 1.
12-13	Como el día 3.
14	Como el día 1; adición de la ración alimentaria al suelo; medición de la temperatura y del pH del suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo; final de la fase de absorción; transferencia de los gusanos de las réplicas expuestas restantes a recipientes que contienen suelo limpio, para la fase de eliminación (sin purga intestinal); toma de muestras de suelo y de gusanos para los controles de los disolventes.
	Las actividades previas a la exposición (fase de equilibrado) deben programarse teniendo en cuenta las propiedades de la sustancia problema.
	Las actividades descritas para el día 3 deben realizarse diariamente (al menos en los días laborables).

Apéndice 4

Suelo artificial — recomendaciones de preparación y conservación

Dado que es posible que no se disponga durante todo el año de suelos naturales de una fuente particular, y que la presencia de organismos endógenos y de microcontaminantes puede influir en el ensayo, se recomienda emplear en este ensayo el suelo artificial indicado en el capítulo C.8 del presente anexo, Toxicidad para gusanos de tierra (48). Son varias las especies de ensayo que pueden sobrevivir, crecer y reproducirse en este suelo, y se facilita con él una normalización máxima, así como la comparabilidad intra e interlaboratorios de las condiciones de ensayo y de cultivo.

Componentes del suelo:

Turba:	10 %	Turba esfágnea, de acuerdo con las directrices 207 de la OCDE (48),
Arena de cuarzo:	70 %	Arena de cuarzo industrial (secada al aire); granulometría: más del 50 % de las partículas debe estar en la banda de 50-200 µm, pero todas las partículas deben tener ≤ 2 mm,
Caolín:	20 %	Contenido en caolinita ≥ 30 %,
Carbonato de calcio:	≤ 1 %	CaCO ₃ , pulverizado, químicamente puro.

Como opción, puede reducirse el contenido de carbono orgánico del suelo artificial como, por ejemplo, rebajando el contenido de turba al 4-5 % de suelo seco y aumentando análogamente el contenido de arena. Con esta reducción del contenido de carbono orgánico, es posible que disminuyan las posibilidades de adsorción de la sustancia problema al suelo (carbono orgánico) y que aumente la disponibilidad de la sustancia problema para los gusanos (74). Se ha demostrado que *Enchytraeus albidus* y *Eisenia fetida* pueden ajustarse a los criterios de validez sobre la reproducción cuando se someten a ensayo en suelos de campo con un contenido menor de carbono orgánico como, por ejemplo, del 2,7 % (33) (61), y la experiencia demuestra que esto también puede conseguirse en suelo artificial con un 5 % de turba.

Preparación

Los componentes secos del suelo se mezclan a fondo (por ejemplo, en un mezclador de laboratorio de gran escala). Esta operación debe efectuarse alrededor de una semana antes de que se inicie el ensayo. La mezcla de componentes secos del suelo debe humedecerse con agua desionizada, al menos 48 h antes de que se añada la sustancia problema a fin de equilibrar o estabilizar la acidez. Para la determinación del pH se utiliza una mezcla de suelo y solución 1 M de KCl en la proporción de 1:5. Si el pH no se encuentra en la banda necesaria ($6,0 \pm 0,5$), se añade al suelo una cantidad suficiente de CaCO₃ o se prepara un nuevo lote de suelo.

Se determina de acuerdo con la norma ISO 11268-2 (35) la capacidad de retención de agua (WHC) máxima del suelo artificial. Al menos dos días antes del inicio del ensayo, el suelo artificial seco se humedece añadiéndole una cantidad suficiente de agua desionizada o reconstituida para obtener aproximadamente la mitad del contenido final de agua. El contenido final de agua debe estar entre el 40 y el 60 % del WHC máximo. Al inicio del ensayo, el suelo previamente humedecido se divide en tantos lotes como concentraciones de ensayo y controles se vayan a emplear en el ensayo, y el contenido de humedad se ajusta al 40 – 60 % del WHC_{max} utilizando la solución de la sustancia problema o añadiendo agua desionizada o reconstituida. Se determina el contenido de humedad al inicio y al final del ensayo (a 105 °C). El resultado debe ser óptimo para los requisitos de la especie utilizada (también es posible comprobar el contenido de humedad de la manera siguiente: cuando el suelo se aprieta suavemente con la mano, deben aparecer gotitas de agua entre los dedos).

Almacenamiento

Los componentes secos del suelo artificial pueden conservarse a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización. El suelo preparado, humedecido previamente, puede conservarse en un lugar fresco hasta tres días antes de que se le añada la sustancia problema; debe velarse por reducir al mínimo la evaporación de agua. Una vez se le haya añadido la sustancia problema, el suelo debe utilizarse inmediatamente, salvo que se disponga de información en el sentido de que ese suelo concreto puede conservarse sin que se vea afectada la toxicidad ni la biodisponibilidad de la sustancia problema. En tal caso, es posible conservar, en las condiciones recomendadas para el ensayo concreto, las muestras de suelo con la sustancia problema añadida hasta el momento de su análisis.

Apéndice 5

Especies de oligoquetos recomendadas para el ensayo de bioacumulación a partir del suelo

Gusanos de tierra

La especie recomendada para el ensayo es *Eisenia fetida* (Savigny 1826), que pertenece a la familia Lumbricidae. Desde 1972 está dividida en dos subespecies [*Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* (10)]. Según Jaenike (36), se trata de verdaderas especies aparte. *Eisenia fetida* se reconoce fácilmente por sus rayas intersegmentales de color amarillo claro, mientras que *Eisenia andrei* tiene color rojo oscuro uniforme. Proceden probablemente de la región del mar Negro, y actualmente tienen una distribución universal, especialmente en hábitats modificados antropogénicamente, como las pilas de compost. Las dos especies pueden utilizarse en ensayos tanto ecotoxicológicos como de bioacumulación.

Eisenia fetida y *Eisenia andrei* están disponibles en el comercio, por ejemplo como cebos de pesca. En comparación con otros gusanos de tierra lumbriádicos, tienen un ciclo de vida breve y alcanzan la madurez en el plazo de unos 2 o 3 meses (a temperatura ambiente). Su temperatura óptima es de unos 20 – 24 °C; prefieren sustratos relativamente húmedos, con un pH casi neutro y un elevado contenido de materia orgánica. Como estas especies llevan unos 25 años utilizándose ampliamente en ensayos ecotoxicológicos normalizados, su cultivo se conoce muy bien (48) (77).

Ambas especies pueden cultivarse en una amplia gama de residuos animales. El medio de cría recomendado por la ISO (35) es una mezcla al 50 % de estiércol de caballo o de vaca y de turba. Este medio debe tener un valor aproximado de pH entre 6 y 7 (regulado con carbonato de calcio) y una conductividad iónica baja (menos de 6 mS/cm o menos del 0,5 % de concentración salina), y no debe presentar una contaminación excesiva de amoníaco ni de orina animal. También puede utilizarse un suelo comercial de jardinería exento de aditivos, o un suelo artificial de acuerdo con la OCDE (48), o una mezcla de ambos al 50 %. El sustrato debe estar húmedo, pero no demasiado mojado. Son adecuados los incubadores de un volumen entre 10 y 50 litros.

Para obtener gusanos de edad y masa normalizadas, lo mejor es iniciar el cultivo con capullos. Por tanto, se añaden gusanos adultos a un incubador que contenga sustrato fresco para producir capullos. La experiencia práctica indica que se obtienen buenas tasas de reproducción con una densidad de población de unos 100 gusanos adultos por kg de sustrato (peso húmedo). Tras 28 días se extraen los gusanos adultos. Los gusanos de tierra que salen de los capullos se utilizan para los ensayos una vez hayan madurado, al cabo de un mínimo de 2 meses y un máximo de 12 meses.

Los gusanos de las especies antes descritas pueden considerarse sanos si se mueven a través del sustrato, no intentan abandonarlo y se reproducen continuamente. Un movimiento muy lento o un color amarillo en el extremo posterior (en el caso de *Eisenia fetida*) son indicativos de agotamiento del sustrato. En este caso, se recomienda añadir sustrato fresco o rebajar el número de animales por incubador.

Bibliografía adicional seleccionada

- Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.
- Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.
- Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.
- Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.
- Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.
- Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.
- Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology-from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

Enquitrídeos

La especie recomendada es *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (gusano blanco). Esta especie es una de las más grandes (hasta 15 mm) de la familia Enchytraeidae de los anélidos oligoquetos y presenta una distribución universal [véase, por ejemplo, (8)]. *Enchytraeus albidus* se encuentra en hábitats marinos, lacustres y terrestres, sobre todo en materia orgánica en descomposición (algas, compost) y raramente en praderas (42). Esta amplia tolerancia ecológica y algunas variaciones morfológicas indican que la especie podría tener diferentes razas.

Enchytraeus albidus se encuentra en el comercio, vendida como alimento para peces. Ha de comprobarse si el cultivo está contaminado con otras especies, generalmente más pequeñas (60). Si se da la contaminación, hay que lavar todos los gusanos con agua en una placa Petri. Despues se seleccionan ejemplares adultos grandes de *Enchytraeus albidus* (empleando

un microscopio estereoscópico) para iniciar un nuevo cultivo. Se desechan todos los demás gusanos. Tienen un breve ciclo de vida, ya que alcanzan la madurez entre los 33 días (a 18 °C) y los 74 días (a 12 °C). Solo deben utilizarse para los ensayos los cultivos que hayan estado en el laboratorio al menos 5 semanas (una generación) sin problemas.

También son adecuadas otras especies del género *Enchytraeus*, en particular *Enchytraeus luxuriosus*. Esta especie es un verdadero habitante del suelo, que se ha descrito recientemente en (65). Si se utilizan otras especies de *Enchytraeus*, deben identificarse claramente y hay que indicar los motivos por los que se han seleccionado.

Enchytraeus crypticus (Westheide & Graefe 1992) es una especie que pertenece al mismo grupo que *Enchytraeus luxuriosus*. No se ha determinado con certeza si existe en el campo, ya que solo se ha descrito a partir de cultivos de gusanos de tierra y de pilas de compost (Römbke 2003). Por tanto, no se conocen sus requisitos ecológicos originales. Sin embargo, en estudios de laboratorio recientes en varios suelos de campo se ha confirmado que esta especie muestra una amplia tolerancia respecto a propiedades del suelo como el pH y la textura (Jänsch *et al.* 2005). En los últimos años se está utilizando esta especie con frecuencia en estudios ecotoxicológicos debido a la simplicidad de su cultivo y de sus ensayos, por ejemplo según Kuperman *et al.* 2003). Sin embargo, es pequeña (3 – 12 mm; 7 mm de media (Westheide & Müller 1996), lo que hace que sea más difícil de manejar que *Enchytraeus albidus*. Cuando se utiliza esta especie en lugar de *Enchytraeus albidus*, es posible reducir el tamaño del recipiente de ensayo, aunque no es necesario. Por otra parte, ha de tenerse en cuenta que esta especie se reproduce muy rápidamente, con un tiempo de generación inferior a 20 días a 20 ± 2 °C (Achazi *et al.* 1999) e incluso más deprisa a temperaturas más altas.

Los enquistreidos de la especie *Enchytraeus albidus* (así como otras especies del género *Enchytraeus*) pueden criarse en grandes cajas de plástico (por ejemplo, de 30 × 60 × 10 cm o 20 × 12 × 8 cm, que es adecuado para el cultivo de gusanos de pequeño tamaño) llenas de una mezcla de suelo artificial y de suelo de jardín comercial, sin contaminar y exento de aditivos. Debe evitarse material de compost, ya que podría contener sustancias tóxicas, como metales pesados. Antes de utilizar el suelo de cultivo hay que eliminar la fauna, congéñandolo tres veces. También puede utilizarse suelo artificial puro, pero la tasa de reproducción podría ser menor que la obtenida con sustratos mixtos. El sustrato debe tener un pH de 6,0 ± 0,5. El cultivo se mantiene en un incubador a la temperatura de 15 ± 2 °C a oscuras. En cualquier caso, ha de evitarse una temperatura superior a 23 °C. El suelo artificial/natural debe estar húmedo, pero no demasiado mojado. Cuando se aprieta el suelo suavemente con la mano, solo deben aparecer gotitas de agua. En todo caso hay que evitar las condiciones anóxicas (es decir, si se utiliza tapa, el número de agujeros de esta debe bastar para que sea suficiente la renovación del aire). El suelo del cultivo debe airearse removiéndolo cuidadosamente una vez por semana.

Debe darse alimento a los gusanos *ad libitum* al menos una vez por semana con granos aplastados de avena que se introducen en una cavidad de la superficie del suelo y se recubren con suelo. Si queda comida en el recipiente desde la última vez que se les haya dado, será necesario ajustar en consecuencia la cantidad de alimento dado. Si se aprecia crecimiento fúngico en la comida restante, será necesario sustituir esta por una nueva cantidad de granos aplastados de avena. Para estimular la reproducción, es posible complementar cada dos semanas los granos aplastados de avena utilizando proteínas en polvo con vitaminas añadidas, disponibles en el comercio. Al cabo de tres meses, los animales se transfieren a un sustrato de cría o cultivo recién preparado. Los granos aplastados de avena, que deben conservarse en recipientes herméticamente cerrados, tienen que pasarse por el autoclave o calentarse antes de su utilización para evitar infecciones por ácaros de la harina (por ejemplo, *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) o ácaros depredadores [por ejemplo, *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*]. Tras su desinfección, el alimento se muela de forma que sea fácil de espolvorear sobre la superficie del suelo. Otra posible fuente de alimento es la levadura de panadería o la comida para peces TetraMin®.

En general, las condiciones de cultivo son suficientes si los gusanos no intentan abandonar el sustrato, se mueven rápidamente por el suelo, presentan una superficie externa brillante sin que se les adhieran partículas del suelo, presentan un color más o menos blanquecino, y se observan gusanos de diferentes edades. En realidad, puede considerarse que los gusanos están sanos si se reproducen continuamente.

Bibliografía adicional seleccionada

- Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.
- Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.
- Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.
- Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.
- Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.
- Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.»

EUR-Lex (<http://new.eur-lex.europa.eu>) ofrece acceso directo y gratuito a la legislación de la Unión Europea. Desde este sitio puede consultarse el *Diario Oficial de la Unión Europea*, así como los Tratados, la legislación, la jurisprudencia y la legislación en preparación.

Para más información acerca de la Unión Europea, consulte: <http://europa.eu>



Oficina de Publicaciones de la Unión Europea
2985 Luxemburgo
LUXEMBURGO

ES