

Gazzetta ufficiale

dell'Unione europea

L 216

Edizione
in lingua italiana

Legislazione

47° anno

16 giugno 2004

Sommario

I Atti per i quali la pubblicazione è una condizione di applicabilità

.....

II Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità

.....

Avviso ai lettori 1

Rettifiche

- ★ **Rettifica della direttiva 2004/73/CE della Commissione, del 29 aprile 2004, recante ventinovesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose (GU L 152 del 30.4.2004)** 3

Prezzo: 46 EUR

IT

Gli atti i cui titoli sono stampati in caratteri chiari appartengono alla gestione corrente. Essi sono adottati nel quadro della politica agricola ed hanno generalmente una durata di validità limitata.

I titoli degli altri atti sono stampati in grassetto e preceduti da un asterisco.

Spedizione in abbonamento postale, articolo 2, comma 20/C, legge 662/96 — Milano.

- ES:** El presente Diario Oficial se publica en español, danés, alemán, griego, inglés, francés, italiano, neerlandés, portugués, finés y sueco.
Las correcciones de errores que contiene se refieren a los actos publicados con anterioridad a la ampliación de la Unión Europea del 1 de mayo de 2004.
- CS:** Tento Úřední věstník se vydává ve španělštině, dánštině, němčině, řečtině, angličtině, francouzštině, italštině, holan-
dštině, portugalštině, finštině a švédštině.
Tisková oprava zde uvedená se vztahuje na akty uveřejněné před rozšířením Evropské unie dne 1. května 2004.
- DA:** Denne EU-Tidende offentliggøres på dansk, engelsk, finsk, fransk, græsk, italiensk, nederlandsk, portugisisk, spansk,
svensk og tysk.
Berigtigelserne heri henviser til retsakter, som blev offentliggjort før udvidelsen af Den Europæiske Union den 1. maj
2004.
- DE:** Dieses Amtsblatt wird in Spanisch, Dänisch, Deutsch, Griechisch, Englisch, Französisch, Italienisch, Niederländisch,
Portugiesisch, Finnisch und Schwedisch veröffentlicht.
Die darin enthaltenen Berichtigungen beziehen sich auf Rechtsakte, die vor der Erweiterung der Europäischen Union
am 1. Mai 2004 veröffentlicht wurden.
- ET:** Käesolev Euroopa Liidu Teataja ilmub hispaania, taani, saksa, kreeka, inglise, prantsuse, itaalia, hollandi, portugali,
soome ja rootsi keeles.
Selle parandused viitavad aktidele, mis on avaldatud enne Euroopa Liidu laienemist 1. mail 2004.
- EL:** Η παρούσα Επίσημη Εφημερίδα δημοσιεύεται στην ισπανική, δανική, γερμανική, ελληνική, αγγλική, γαλλική, ιταλική, ολλαν-
δική, πορτογαλική, φινλανδική και σουηδική γλώσσα.
Τα διορθωτικά που περιλαμβάνει αναφέρονται σε πράξεις που δημοσιεύθηκαν πριν από τη διεύρυνση της Ευρωπαϊκής
Ένωσης την 1η Μαΐου 2004.
- EN:** This Official Journal is published in Spanish, Danish, German, Greek, English, French, Italian, Dutch, Portuguese,
Finnish and Swedish.
The corrigenda contained herein refer to acts published prior to enlargement of the European Union on 1 May
2004.
- FR:** Le présent Journal officiel est publié dans les langues espagnole, danoise, allemande, grecque, anglaise, française, ita-
lienne, néerlandaise, portugaise, finnoise et suédoise.
Les rectificatifs qu'il contient se rapportent à des actes publiés antérieurement à l'élargissement de l'Union européenne
du 1^{er} mai 2004.
- IT:** La presente Gazzetta ufficiale è pubblicata nelle lingue spagnola, danese, tedesca, greca, inglese, francese, italiana,
olandese, portoghese, finlandese e svedese.
Le rettifiche che essa contiene si riferiscono ad atti pubblicati anteriormente all'allargamento dell'Unione europea del
1° maggio 2004.
- LV:** Šis Oficiālais Vēstnesis publicēts spāņu, dāņu, vācu, grieķu, angļu, franču, itāļu, holandiešu, portugāļu, somu un zvie-
dru valodā.
Šeit minētie labojumi attiecas uz tiesību aktiem, kas publicēti pirms Eiropas Savienības paplašināšanās 2004. gada 1.
maijā.
- LT:** Šis Oficialusis leidinys išleistas ispanų, danų, vokiečių, graikų, anglų, prancūzų, italų, olandų, portugalų, suomių ir
švedų kalbomis.
Čia išspausdintas teisės aktų, paskelbtų iki Europos Sąjungos plėtros gegužės 1 d., klaidų ištaisymas.
- HU:** Ez a Hivatalos Lap spanyol, dán, német, görög, angol, francia, olasz, holland, portugál, finn és svéd nyelven jelenik
meg.
Az itt megjelent helyesbítések elsősorban a 2004. május 1-jei európai uniós bővítéssel kapcsolatos jogszabályokra
vonatkoznak.
- MT:** Dan il-Ġurnal Uffiċjali hu ppubblikat fil-ligwa Spanjola, Daniża, Ġermaniża, Griega, Ingliża, Franċiża, Taljana, Olan-
diża, Portugiża, Finlandiża u Svediża.
Il-corrigenda li tinstab hawnhekk tirreferi għal atti ppubblikati qabel it-tkabbir ta' l-Unjoni Ewropea fl-1 ta' Mejju
2004.

- NL:** Dit Publicatieblad wordt uitgegeven in de Spaanse, de Deens, de Duitse, de Griekse, de Engelse, de Franse, de Italiaanse, de Nederlandse, de Portugese, de Finse en de Zweedse taal.
De rectificaties in dit Publicatieblad hebben betrekking op besluiten die vóór de uitbreiding van de Europese Unie op 1 mei 2004 zijn gepubliceerd.
- PL:** Ten Dziennik Urzędowy jest wydawany w językach: hiszpańskim, duńskim, niemieckim, greckim, angielskim, francuskim, włoskim, niderlandzkim, portugalskim, fińskim i szwedzkim.
Sprostowania zawierają odniesienia do aktów opublikowanych przed rozszerzeniem Unii Europejskiej dnia 1 maja 2004 r.
- PT:** O presente Jornal Oficial é publicado nas línguas espanhola, dinamarquesa, alemã, grega, inglesa, francesa, italiana, neerlandesa, portuguesa, finlandesa e sueca.
As rectificações publicadas neste Jornal Oficial referem-se a actos publicados antes do alargamento da União Europeia de 1 de Maio de 2004.
- SK:** Tento úradný vestník vychádza v španielskom, dánskom, nemeckom, gréckom, anglickom, francúzskom, talianskom, holandskom, portugalskom, fínskom a švédskom jazyku.
Korigendá, ktoré obsahuje, odkazujú na akty uverejnené pred rozšírením Európskej únie 1. mája 2004.
- SL:** Ta Uradni list je objavljen v španskem, danskem, nemškem, grškem, angleškem, francoskem, italijanskem, nizozemskem, portugalskem, fínskem in švedskem jeziku.
Vsebovani popravki se nanašajo na akte objavljene pred širitvijo Evropske unije 1. maja 2004
- FI:** Tämä virallinen lehti on julkaistu espanjan, tanskan, saksan, kreikan, englannin, ranskan, italian, hollannin, portugalin, suomen ja ruotsin kielellä.
Lehden sisältämät oikaisut liittyvät ennen Euroopan unionin laajentumista 1. toukokuuta 2004 julkaistuihin säädöksiin.
- SV:** Denna utgåva av Europeiska unionens officiella tidning publiceras på spanska, danska, tyska, grekiska, engelska, franska, italienska, nederländska, portugisiska, finska och svenska.
Rättselena som den innehåller avser rättsakter som publicerades före utvidgningen av Europeiska unionen den 1 maj 2004.

RETTIFICHE

Retifica della direttiva 2004/73/CE della Commissione, del 29 aprile 2004, recante ventinovesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose

(«Gazzetta ufficiale dell'Unione europea» L 152 del 30 aprile 2004)

La direttiva 2004/73/CE va letta come segue:

«DIRETTIVA 2004/73/CE DELLA COMMISSIONE

del 29 aprile 2004

recante ventinovesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la direttiva 67/548/CEE del Consiglio, del 27 giugno 1967, concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose ⁽¹⁾, in particolare l'articolo 28,

considerando quanto segue:

(1) L'allegato I della direttiva 67/548/CEE contiene un elenco di sostanze pericolose e dettagli relativi alle procedure di classificazione ed etichettatura per ogni sostanza. Detto elenco dovrebbe essere aggiornato per inserirvi le sostanze nuove che sono state notificate e ulteriori sostanze esistenti e per adeguare al progresso tecnico le voci esistenti, fissando ad esempio i limiti di concentrazione ambientale per talune sostanze. A tal fine è pertanto anche necessario sopprimere le voci relative a determinate sostanze e dividere alcune voci in quanto la classificazione non si applica più a tutte le sostanze in esse riprese. L'etichettatura delle sostanze contenenti 1,3-butadiene dovrebbe essere modificata per tenere conto del fatto che tale sostanza viene classificata come mutagena dalla presente direttiva.

(2) L'allegato V della direttiva 67/548/CEE stabilisce i metodi per la determinazione delle proprietà fisico-chimiche, tossiche ed ecotossiche delle sostanze e dei preparati. È opportuno modificare tale allegato per ridurre al minimo il numero di animali usati a scopi di sperimentazione, conformemente alla direttiva 86/609/CEE del Consiglio, del 24 novembre 1986, concernente il ravvicinamento

delle disposizioni legislative, regolamentari e amministrative degli Stati membri relative alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici ⁽²⁾. I metodi relativi ai saggi di tossicità orale subcronica di cui ai capitoli B.1, B.4, B.5, B.31 e B.35 dovrebbero essere riveduti di conseguenza. Inoltre, all'allegato V dovrebbe essere aggiunto il capitolo B.42 al fine di proporre un metodo più preciso per la determinazione della tossicità orale subcronica. Infine, dovrebbero essere aggiunti il capitolo A.21 sulle proprietà fisico-chimiche, il capitolo B.43 sulla tossicità orale subcronica e i capitoli da C.21 a C.24 sulla tossicità ambientale, al fine di consentire la determinazione delle proprietà non ancora sufficientemente trattate dai metodi di cui all'allegato V.

(3) Le misure di cui alla presente direttiva sono conformi al parere del comitato per l'adeguamento al progresso tecnico delle direttive volte all'eliminazione degli ostacoli tecnici agli scambi nel settore delle sostanze e dei preparati pericolosi,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DIRETTIVA:

Articolo 1

La direttiva 67/548/CEE è modificata come segue:

1) L'allegato I è modificato come segue:

a) la nota K della prefazione è sostituita dal testo di cui all'allegato 1A;

⁽¹⁾ GU L 196 del 16.8.1967, pag. 1. Direttiva modificata da ultimo dal regolamento (CE) n. 807/2003 (GU L 122 del 16.5.2003, pag. 36).

⁽²⁾ GU L 358 del 18.12.1986, pag. 1. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 2003/65/CE del Parlamento europeo e del Consiglio (GU L 230 del 16.9.2003, pag. 32).

- b) le voci corrispondenti a quelle riprese nell'allegato IB della presente direttiva sono sostituite dal testo di cui a tale allegato;
- c) le voci di cui all'allegato 1C della presente direttiva sono inserite nello stesso ordine delle voci di cui all'allegato I della direttiva 67/548/CEE;
- d) le voci recanti i numeri 604-050-00-X, 607-050-00-8, 607-171-00-6 e 613-130-00-3 sono soppresse;
- e) la voce recante il numero 048-002-00-0 è sostituita dalle voci recanti i numeri 048-002-00-0 e 048-011-00-X di cui all'allegato 1D della presente direttiva;
- f) la voce recante il numero 609-006-00-3 è sostituita dalle voci recanti i numeri 048-609-006-00-3 e 609-065-00-5 di cui all'allegato 1D della presente direttiva;
- g) la voce recante il numero 612-039-00-6 è sostituita dalle voci recanti i numeri 048-612-039-00-6 e 612-207-00-9 di cui all'allegato 1D della presente direttiva.
- 2) L'allegato V è modificato come segue:
- a) il testo dell'allegato 2A della presente direttiva è aggiunto come capitolo A21;
- b) il capitolo B.1bis è sostituito dal testo di cui all'allegato 2B della presente direttiva;
- c) il capitolo B.1ter è sostituito dal testo di cui all'allegato 2C della presente direttiva;
- d) il capitolo B.4 è sostituito dal testo di cui all'allegato 2D della presente direttiva;
- e) il capitolo B.5 è sostituito dal testo di cui all'allegato 2E della presente direttiva;
- f) il capitolo B.31 è sostituito dal testo di cui all'allegato 2F della presente direttiva;
- g) il capitolo B.35 è sostituito dal testo di cui all'allegato 2G della presente direttiva;

- h) il testo dell'allegato 2H della presente direttiva è aggiunto come capitoli B.42 e B.43;
- i) il testo dell'allegato 2I della presente direttiva è aggiunto come capitoli da C.21 a C.24.

Articolo 2

1. Gli Stati membri mettono in vigore le disposizioni legislative, regolamentari e amministrative necessarie per conformarsi alla presente direttiva al più tardi il 31 ottobre 2005. Essi comunicano immediatamente alla Commissione il testo di tali disposizioni, nonché una tavola di concordanza tra queste ultime e la presente direttiva. Quando gli Stati membri adottano tali disposizioni, esse contengono un riferimento alla presente direttiva o sono corredate di un siffatto riferimento all'atto della pubblicazione ufficiale. Le modalità del riferimento sono decise dagli Stati membri.

2. Gli Stati membri comunicano alla Commissione il testo delle disposizioni essenziali di diritto interno da essi adottate nel settore disciplinato dalla presente direttiva.

Articolo 3

La presente direttiva entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*.

Articolo 4

Gli Stati membri sono destinatari della presente direttiva.

Fatto a Bruxelles, il 29 aprile 2004.

Per la Commissione

Margot WALLSTRÖM

Membro della Commissione

ALLEGATO 1A

«Nota K:

La classificazione "cancerogeno" o "mutageno" non è necessaria se si può dimostrare che la sostanza contiene 1,3-butadiene in percentuale inferiore allo 0,1 % di peso/peso (Eines n. 203-450-8). Se la sostanza non è classificata come cancerogena o mutagena, devono almeno comparire le frasi S (2-)9-16. La presente nota si applica soltanto a talune sostanze composte derivate dal petrolio contenute nell'allegato I.»

ALLEGATO 1B

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
006-005-00-4	tiram (bis dimetilcarbamoil) disolfuro disolfuro di tetramiltiourame		205-286-2	137-26-8	Xn; R20/22-48/22 Xi; R36/38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-36/38-43-48/ 22-50/53 S: (2-)26-36/37-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/22-36/38-43-48/ 22-50/53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R36/38-43-48/ 22-50/53 10 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R43-48/22-50/ 53 2,5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R43-50/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi, N; R43-51/53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51/53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52/53	
006-006-01-7	cianuro di idrogeno ...% acido cianidrico ...%	B	200-821-6	74-90-8	T+; R26/27/28 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)7/9-16-36/37- 38-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-51-53 2,5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23/24/25-51-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R23/24/25-52-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-52-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22	
006-012-00-2	ziram bis(N,N-dimetil-ditiocarbam- mato) di zinco		205-288-3	137-30-4	T+; R26 Xn; R22-48/22 Xi; R37-41 R43 N; R50-53	T+; N R: 22-26-37-41-43-48/ 22-50/53 S: (1/2-)22-26-28-36/37/ 39-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R22-26-37-41-43-48/ 22-50-53 20 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26-37-41-43- 48/22-50-53 10 % ≤ C < 20 %: T+, N; R26-41-43-48/ 22-50-53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R26-36-43-50-53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23-36-43-50-53 1 % ≤ C < 5 %: T, N; R23-43-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R20-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
006-021-00-1	linuron (ISO) 3-(3,4-diclorofenil)-1-metil-1- metossiurea	E	206-356-5	330-55-2	Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62 Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 N; R50-53	T; N R: 61-22-40-48/22-62- 50/53 S: 53-45-60-61		
006-044-00-7	isoproturon 3-(4-isopropilfenil)-1,1-dimetil- urea		251-835-4	34123-59-6	Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 40-50/53 S: (2-)36/37-60-61	C ≥ 2,5 %: Xn, N; R40-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn, N; R40-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
006-072-00-X	N,N-dipropiltiocarbammato di S-benzile		401-730-6	52888-80-9	Xn; R22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-43-51/53 S: (2-)24-37-61		
006-089-00-2	diossido di cloro		233-162-8	10049-04-4	O; R8 R6 T+; R26 C; R34 N; R50	O; T+; N R: 6-8-26-34-50 S: (1/2-)23-26-28-36/37/ 39-38-45-61	C ≥ 5 %: T+; N; R26-34-50 1 % ≤ C < 5 %: T+; N; R26-36/37/38-50 0,5 % ≤ C < 1 %: T; N; R23-36/37/38-50 0,2 % ≤ C < 0,5 %: T; N; R23-50 0,02 % ≤ C < 0,2 %: Xn; N; R20-50	
006-089-01-X	diossido di cloro ... %	B	233-162-8	10049-04-4	T; R25 C; R34 N; R50	T; N R: 25-34-50 S: (1/2-)23-26-28-36/37/ 39-45-61	C ≥ 25 %: T; N; R25-34-50 10 % ≤ C < 25 %: C; N; R22-34-50 3 % ≤ C < 10 %: Xn; N; R22-36/37/38-50 0,3 % ≤ C < 3 %: Xi; R36	
007-001-00-5	ammoniaca, anidra		231-635-3	7664-41-7	R10 T; R23 C; R34 N; R50	T; N R: 10-23-34-50 S: (1/2-)9-16-26-36/37/ 39-45-61	C ≥ 25 %: T; N; R23-34-50 5 % ≤ C < 25 %: T; R23-34 0,5 % ≤ C < 5 %: Xn; R20-36/37/38	
007-008-00-3	idrazina	E	206-114-9	302-01-2	R10 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 C; R34 R43 N; R50-53	T; N R: 45-10-23/24/25-34- 43-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T; N; R45-23/24/25-34-43-50/ 53 10 % ≤ C < 25 %: T; N; R45-20/21/22- 34-43-51/53 3 % ≤ C < 10 %: T; N; R45-20/21/22-36/ 38-43-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T; N; R45-43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R45-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45	
007-010-00-4	sodio nitrito		231-555-9	7632-00-0	O; R8 T; R25 N; R50	O; T; N R: 8-25-50 S: (1/2-)45-61	C ≥ 25 %: T; N; R25-50 5 % ≤ C < 25 %: T; R25 1 % ≤ C < 5 %: Xn; R22	
007-011-00-X	potassio nitrito		231-832-4	7758-09-0	O; R8 T; R25 N; R50	O; T; N R: 8-25-50 S: (1/2-)45-61	C ≥ 25 %: T; N; R25-50 5 % ≤ C < 25 %: T; R25 1 % ≤ C < 5 %: Xn; R22	
007-013-00-0	1,2-dimetilidrazina	E	—	540-73-8	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %: T; N; R45-23/24/25-51/53 3 % ≤ C < 25 %: T; R45-20/21/22-52/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T; R45-52/53 0,01 % ≤ C < 2,5 %: T; R45	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
007-017-00-2	nitrito di isobutile isobutilnitrito	E	208-819-7	542-56-3	F; R11 Xn; R20/22 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68	F; T R: 11-20/22-45-68 S: 53-45		
007-027-00-7	1,6-bis(3,3-bis((1-metilpentilide- nimino)propil)ureido)esano		420-190-2	—	Xn; R21/22-48/21 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-43-48/21- 50/53 S: (1/2-)7-26-36/37/39- 45-60-61		
008-003-00-9	perossido di idrogeno soluzione ... % acqua ossigenata ... %	B	231-765-0	7722-84-1	R5 O; R8 C; R35 Xn; R20/22	O; C R: 5-8-20/22-35 S: (1/2-)17-26-28-36/37/ 39-45	C ≥ 70 %: C; R20/22-35 50 % ≤ C < 70 %: C; R20/22-34 35 % ≤ C < 50 %: Xn; R22-37/38-41 8 % ≤ C < 35 %: Xn; R22-41 5 % ≤ C < 8 %: Xi; R36 Footnote: C ≥ 70 %: R5, O;R8 50 % ≤ C < 70 %: O; R8	
009-015-00-7	difluoruro di solforile		220-281-5	2699-79-8	T; R23 Xn; R48/20 N; R50	T; N R: 23-48/20-50 S: (1/2-)45-63-60-61		
015-002-00-7	Fosforo rosso		231-768-7	7723-14-0	F; R11 R16 R52-53	F R: 11-16-52/53 S: (2-)7-43-61		
015-014-00-2	tributilfosfato		204-800-2	126-73-8	Carc.Cat.3; R40 Xn; R22 Xi; R38	Xn R: 22-38-40 S: (2-)36/37-46		
015-015-00-8	tricresilfosfato o-o-o, o-o-m, o-o-p, o-m-m, o-m-p, o-p-p	C	201-103-5	78-30-8	T; R39/23/24/25 N; R51-53	T; N R: 39/23/24/25-51/53 S: (1/2-)20/21-28-45-61	C ≥ 25 %: T, N; R39/23/24/25-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T; R39/23/24/25-52/ 53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R39/23/24/25 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R68/20/21/22	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
015-016-00-3	tricresilfosfato m-m-m, m-m-p, m-p-p, p-p-p	C	201-105-6	78-32-0	Xn; R21/22 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-51/53 S: (2-)28-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R21/22-51/53 5 % ≤ C < 25 %: Xn; R21/22-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: R52/53	
015-020-00-5	mevinfos (ISO) fosfato di dimetile e 1-metil-2- metossicarbonilvinile		232-095-1	7786-34-7	T+; R27/28 N; R50-53	T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)23-28-36/37-45- 60-61	C ≥ 7 %: T+, N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,0025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: N; R51-53 0,000025 % ≤ C < 0,00025 %: R52-53	
015-021-00-0	triclorfon (ISO) 2,2,2-tricloro-1-idrossietilfosfo- nato di dimetile		200-149-3	52-68-6	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-43-50-53 1 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R43-50-53 0,025 % ≤ C < 1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-027-00-3	sulfotep (ISO) ditiopirofosfato di O,O,O,O- tetraetile		222-995-2	3689-24-5	T+; R27/28 N; R50-53	T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)23-28-36/37-45- 60-61	C ≥ 7 %: T+, N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-032-00-0	protoato (ISO) ditiopiofosfato di O,O-dietile e iso- propilcarbammoilmetile		218-893-2	2275-18-5	T+; R27/28 R52-53	T+ R: 27/28-52/53 S: (1/2-)28-36/37-45-61		
015-033-00-6	forato (ISO) ditiopiofosfato di O,O-dietile e etil- tiometile		206-052-2	298-02-2	T+; R27/28 N; R50-53	T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60- 61	C ≥ 7 %: T+, N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
015-034-00-1	paration (ISO) tiofosfato di O,O-dietile e O-4-nitrofenile		200-271-7	56-38-2	T+; R26/28 T; 24-48/25 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-48/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R24-26/28-48/25-50-53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R21-26/28-48/25-50-53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R21-26/28-48/22-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R21-23/25-48/22-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T, N; R23/25-48/22-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20/22-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R20/22-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-035-00-7	paration - metil (ISO) tiofosfato di O,O-dimetile e O-4-nitrofenile		206-050-1	298-00-0	R5 R10 T+; R26/28 T; R24 Xn; R48/22 N; R50-53	T+; N R: 5-10-24-26/28-48/22-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R24-26/28-48/22-50-53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R21-26/28-48/22-50-53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R21-26/28-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R21-23/25-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T, N; R23/25-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20/22-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R20/22-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-041-00-X	malation (ISO) ditiolfosfato di 1,2-bis (etossicarbonil) etile e O,O-dimetile		204-497-7	121-75-5	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-042-00-5	clortion (denominazione non adottata dall'ISO) O-(3-cloro-4-nitro-fenil)-O,O-dimetil-tiofosfato		207-902-5	500-28-7	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)13-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-047-00-2	etion (ISO) S,S'-metilendi (ditiolfosfato) di O,O,O',O'-tetraetile		209-242-3	563-12-2	T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-25-50/53 S: (1/2-)25-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R21-25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,0025 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: N; R51-53 0,000025 % ≤ C < 0,00025 %: R52-53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
015-052-00-X	fenclorfos (ISO) tiofosfato di O-2,4,5-triclorofenile e O,O-dimetile		206-082-6	299-84-3	Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)25-36/37-60-61		
015-055-00-6	naled (ISO) fosfato di 1,2-dibromo-2,2-dicloroetile e dimetile		206-098-3	300-76-5	Xn; R21/22 Xi; R36/38 N; R50	Xn; N R: 21/22-36/38-50 S: (2-)36/37-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R21/22-36/38-50 20 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R36/38-50 0,025 % ≤ C < 20 %: N; R50	
015-063-00-X	dioxation (ISO) di(ditiofosfato) di 1,4-diossano-2,3-diile e O,O,O',O'-tetraetile		201-107-7	78-34-2	T+; R26/28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-26/28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R24-26/28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R21-26/28-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R21-23/25-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T, N; R23/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-065-00-0	S-2-etil-sulfiniletile-O,O-dimetil-ditiofosfato		—	2703-37-9	T+; R26/27/28 N; R51-53	T+; N R: 26/27/28-51/53 S: (1/2-)13-28-45-61		
015-076-00-0	O,O-dietil-O-(4-metilcumarin-7-il)-tiofosfato		—	299-45-6	T+; R26/27/28 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)13-28-45-60-61	C ≥ 7 %: T+, N; R26/27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R23/24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20/21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-078-00-1	demeton-S-metilsolfone tiofosfato di S-2-etilsolfoniletile e dimetile		241-109-5	17040-19-6	T; R25 Xn; R21 N; R51-53	T; N R: 21-25-51/53 S: (1/2-)22-28-36/37-45-61		
015-083-00-9	bensulide (ISO) ditiofosfato di 2-fenilsolfonilamminoetile e O,O-diisopropile		212-010-4	741-58-2	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24-36-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
015-084-00-4	clorpirifos (ISO) tiofosfato di O,O-dietile e O-3,5,6-tricloro-2-piridile		220-864-4	2921-88-2	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,0025 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: N; R51-53 0,000025 % ≤ C < 0,00025 %: R52-53	
015-095-00-4	metamidofos (ISO) tiofosforamidato di O,S-dimetile		233-606-0	10265-92-6	T+; R26/28 T; R24 N; R50	T+; N R: 24-26/28-50 S: (1/2-)28-36/37-45-61		
015-096-00-X	ossidisulfoton ditiofosfato di O,O-dietile e di S-2-(etilsulfinil)-etile		219-679-1	2497-07-6	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R24-28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R21-28-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R21-25-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T, N; R25-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R22-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R22-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: R52-53	
015-097-00-5	fentoato (ISO) 2-(dimetossifosfinotioil)io)-2-fenilacetato di etile		219-997-0	2597-03-7	Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-100-00-X	foxima (ISO) α-(dietossifosfinotioilimmino) fenilacetone nitrile		238-887-3	14816-18-3	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)36-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,025 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-101-00-5	fosmet (ISO) ditiofosfato di O,O-dimetile e ftalimidometile		211-987-4	732-11-6	Xn; R21/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-105-00-7	fosfito di trifenile		202-908-4	101-02-0	Xi; R36/38 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-50/53 S: (2-)28-60-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/38-50/53 5 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R36/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
015-107-00-8	etoprofos (ISO) ditiofosfato di etile e S,S-dipropile		236-152-1	13194-48-4	T+; R26/27 T; R25 R43 N; R50-53	T+; N R: 25-26/27-43-50/53 S: (1/2-)27/28-36/37/39-45-60-61		
015-108-00-3	bromofos (ISO) tiofosfato di O-4-bromo-2,5-diclorofenile e O,O-dimetile		218-277-3	2104-96-3	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)36-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,25 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
015-109-00-9	crotoxfas (ISO) 3-(dimetossifosfinilossi) isocrotonato di 1-feniletile		231-720-5	7700-17-6	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R24/25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
015-110-00-4	cianofenfos (ISO) feniltiofosfonato di O-4-cianofenile e O-etile		—	13067-93-1	T; R25-39/25 Xn; R21 Xi; R36 N; R51-53	T; N R: 21-25-36-39/25-51/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
015-114-00-6	clormefos (ISO) ditiofosfato di S-clorometile e O,O-dietile		246-538-1	24934-91-6	T+; R27/28 N; R50-53	T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-115-00-1	clortiofos (ISO)		244-663-6	21923-23-9	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-122-00-X	tiofosfato di O-6-etossi-2-etilpirimidin-4-ile e di O,O-dimetile etrimfos		253-855-9	38260-54-7	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 2,5 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
015-123-00-5	fenamifos (ISO) N-isopropilfosforammidato di etile e 4-metiltio-m-tolile		244-848-1	22224-92-6	T+; R28 T; R24 N; R50-53	T+; N R: 24-28-50/53 S: (1/2-)23-28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R24-28-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R21-28-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R21-25-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T, N; R25-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R22-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R22-51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-126-00-1	eptenofos (ISO) fosfato di 7-clorobicyclo(3.2.0)epite-2,6-dien-6-ile e dimetile		245-737-0	23560-59-0	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)23-28-37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,25 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
015-127-00-7	tiofosfato di S-benzile e diisopropile		247-449-0	26087-47-8	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
015-128-00-2	ditiofosfato di S-etilsolfinilmetile e O,O-diisopropile		—	5827-05-4	T+; R27 T; R25 N; R50-53	T+; N R: 25-27-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R25-27-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R22-27-50-53 3 % ≤ C < 7 %: T, N; R22-24-50-53 1 % ≤ C < 3 %: T, N; R24-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21-50-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn, N; R21-51-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-129-00-8	isofenfos (ISO) N-isopropiltiofosforamidato di O-etile e O-2-isopropossicarbonilfenile		246-814-1	25311-71-1	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R24/25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,25 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-131-00-9	tiofosfato di O,O-dietile e O-5-fenilisossazol-3-ile		242-624-8	18854-01-8	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
015-132-00-4	ditiofosfato di S-(clorofeniltiometile) e O,O-dimetile		—	953-17-3	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R24/25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-133-00-X	piperofos (ISO) ditiofosfato di S-2-metilpiperidinocarbonilmetil-O,O-dipropile		—	24151-93-7	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50-53 2,5 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
015-134-00-5	pirimifos-metil (ISO) tiofosfato di O-(2-dietilamino-6-metilpirimidin-4-ile) e O,O-dimetile		249-528-5	29232-93-7	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
015-135-00-0	tiofosfato di O-(4-bromo-2-clorofenile) di O-etile e S-propile profenofos (ISO)		255-255-2	41198-08-7	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)36/37-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 25 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
015-136-00-6	(etilammido)tiofosfato di O-etile e O-[(2-isopropossicarbonil)-1-metil]vinile		250-517-2	31218-83-4	T; R25 N; R50-53	T; N R: 25-50/53 S: (1/2-)37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,25 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
015-138-00-7	quinalfos (ISO) tiofosfato di O,O-dietile e O-chi- nossalin-2-ile		237-031-6	13593-03-8	T; R25 Xn; R21 N; R50-53	T; N R: 21-25-50/53 S: (1/2-)22-36/37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R21-25-50-53 3 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-50-53 0,025 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-139-00-2	tiofosfato di S-terz-butiltiometile e O,O-dietile terbufos (ISO)		235-963-8	13071-79-9	T+; R27/28 N; R50-53	T+; N R: 27/28-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61	C ≥ 7 %: T+, N; R27/28-50-53 1 % ≤ C < 7 %: T, N; R24/25-50-53 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R21/22-50-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	
015-154-00-4	acido 2-cloroetilfosfonico		240-718-3	16672-87-0	Xn; R20/21 C; R34 R52-53	C R: 20/21-34-52/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C; R20/21-34-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
015-179-00-0	Prodotto di condensazione UVCB di: cloruro di tetrachis- idrossimetilfosfonio, urea e C16- 18 sego-alchilammina idrogenata distillata		422-720-8	166242-53-1	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-40-43-48/22-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
016-001-00-4	solfuro di idrogeno idrogeno solforato		231-977-3	7783-06-4	F+; R12 T+; R26 N; R50	F+; T+; N R: 12-26-50 S: (1/2-)9-16-36-38-45-61		
016-008-00-2	ammonio polisolfuri		232-989-1	9080-17-5	R31 C; R34 N; R50	C; N R: 31-34-50 S: (1/2-)26-45-61	C ≥ 25 %: C, N; R31-34-50 5 % ≤ C < 25 %: C; R31-34 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R31-36/38	
016-012-00-4	monocloruro di zolfo zolfo monocloruro		233-036-2	10025-67-9	R14 T; R25 Xn; R20 R29 C; R35 N; R50	T; C; N R: 14-20-25-29-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: T, C, N; R20-25-35-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R22-35 5 % ≤ C < 10 %: C; R22-34 3 % ≤ C < 5 %: Xn; R22-36/37/38 1 % ≤ C < 3 %: Xi; R36/37/38	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
016-013-00-X	dicloruro di zolfo dicloro di zolfo zolfo dicloruro		234-129-0	10545-99-0	R14 C; R34 Xi; R37 N; R50	C; N R: 14-34-37-50 S: (1/2-)26-45-61	C ≥ 25 %: C, N ; R34-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
016-014-00-5	tetracloruro di zolfo zolfo tetracloruro		—	13451-08-6	R14 C; R34 N; R50	C; N R: 14-34-50 S: (1/2-)26-45-61	C ≥ 25 %: C, N; R34-50 10 ≤ C < 25 %: C; R34 5 ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
016-021-00-3	metantiolo metilmercaptano		200-822-1	74-93-1	F+; R12 T; R23 N; R50-53	F+; T; N R: 12-23-50/53 S: (2-)16-25-60-61		
016-023-00-4	dimetilsolfato	E	201-058-1	77-78-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T+; R26 T; R25 C; R34 R43	T+ R: 45-25-26-34-43-68 S: 53-45	C ≥ 25 %: T+; R45-R25-R26-R34-R43-R68 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-R22-R26-R34-R43-R68 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-R22-R26-R36/37/38-R43-R68 5 % ≤ C < 7 %: T; R45-R22-R23-R36/37/38-R43-R68 3 % ≤ C < 5 %: T; R45-R22-R23-R43-R68 1 % ≤ C < 3 %: T; R45-R23-R43-R68 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-R20-R68 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45-R68	
016-059-00-0	N,N,N',N'-tetrametilditiobis(etilen)diammina, dicloridrato		405-300-9	17339-60-5	Xn; R22 Xi; R36 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-36-43-50/53 S: (2-)26-36/37-60-61		
017-003-00-8	clorato di bario bario clorato		236-760-7	13477-00-4	O; R9 Xn; R20/22 N; R51-53	O; Xn; N R: 9-20/22-51/53 S: (2-)13-27-61		
017-004-00-3	clorato di potassio potassio clorato		223-289-7	3811-04-9	O; R9 Xn; R20/22 N; R51-53	O; Xn; N R: 9-20/22-51/53 S: (2-)13-16-27-61		
017-005-00-9	clorato di sodio sodio clorato		231-887-4	7775-09-9	O; R9 Xn; R22 N; R51-53	O; Xn; N R: 9-22-51/53 S: (2-)13-17-46-61		
017-011-00-1	ipoclorito di sodio, soluzione ... % Cl attivo sodio ipoclorito, soluzione ... % Cl attivo	B	231-668-3	7681-52-9	C; R34 R31 N; R50	C; N R: 31-34-50 S: (1/2-)28-45-50-61	C ≥ 25 %: C, N; R31-34-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R31-34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R31-36/38	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
017-012-00-7	ipoclorito di calcio		231-908-7	7778-54-3	O; R8 Xn; R22 R31 C; R34 N; R50	O; C; N R: 8-22-31-34-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C, N; R22-34-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 3 % ≤ C < 10 %: Xi; R37/38-41 0,5 % ≤ C < 3 %: Xi; R36	
024-001-00-0	triossido di cromo	E	215-607-8	1333-82-0	O; R9 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 3; R62 T+; R26 T; R24/25-48/23 C; R35 R42/43 N; R50-53	O; T+; N R: 45-46-9-24/25-26-35-42/43-48/23-62-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R24/25-26-35-42/43-45-46-48/23-50/53-62 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R21/22-26-35-42/43-45-46-48/23-51/53-62 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R21/22-26-34-42/43-45-46-48/20-51/53-62 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R21/22-23-34-42/43-45-46-48/20-51/53-62 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R21/22-23-36/37/38-42/43-45-46-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R23-36/37/38-42/43-45-46-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R23-36/37/38-42/43-45-46-48/20-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R20-45-46-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R20-45-46	
024-002-00-6	dicromato di potassio	E	231-906-6	7778-50-9	O; R8 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; 50-53	T+; N; O R: 45-46-60-61-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20	3

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
024-003-00-1	dicromato di ammonio	E	232-143-1	7789-09-5	E; R2 O; R8 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; R50-53	E; T+; N R: 45-46-60-61-2-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-50/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-50/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20	3
024-004-00-7	dicromato di sodio	E	234-190-3	10588-01-9	O; R8 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; 50-53	T+; N; O R: 45-46-60-61-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20	3

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
024-004-01-4	dicromato di sodio, diidrato	E	234-190-3	7789-12-0	O; R8 Carc. Cat.2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; R50-53	T+; N; O R: 45-46-60-61-8-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20	3
024-011-00-5	bis(1-(3,5-dinitro-2-ossidofenilazo)-3-(N-fenilcarbammoil)-2-naftolato)cromato(1-) di ammonio		400-110-2	—	F; R11 N; R50-53	F; N R: 11-50/53 S: (2-)33-60-61		
024-018-00-3	cromato di sodio sodio cromato	E	231-889-5	7775-11-3	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat.2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23 Xn; R21 C; R34 R42/43 N; R50-53	T+; N R: 45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-21-25-26-34-42/43-48/23-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-34-42/43-48/23-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-36/37/38-42/43-48/20-51/53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-36/37/38-42/43-48/20-51/53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-42/43-48/20-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-23-42/43-48/20-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20-42/43-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20-42/43 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45-46-20	3

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
027-004-00-5	dicloruro di cobalto	E	231-589-4	7646-79-9	Carc. Cat. 2; R49 Xn; R22 R42/43 N; R50-53	T; N R: 49-22-42/43-50/53 S: (2-)22-53-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R49-22-42/43-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R49-22-42/43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R49-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R49-52/53 0,01 % ≤ C < 0,25 %: T; R49	1
027-005-00-0	solfato di cobalto	E	233-334-2	10124-43-3	Carc. Cat. 2; R49 Xn; R22 R42/43 N; R50-53	T; N R: 49-22-42/43-50/53 S: (2-)22-53-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R49-22-42/43-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R49-42/43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R49-42/43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: T; R49-52/53 0,01 % ≤ C < 0,25 %: T; R49	1
029-002-00-X	ossido di rame (I) ossido rameoso		215-270-7	1317-39-1	Xn; R22 N; 50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)22-60-61		
030-001-00-1	zinco in polvere (piroforica)		231-175-3	7440-66-6	F; R15-17 N; R50-53	F; N R: 15-17-50/53 S: (2-)43-46-60-61		
030-002-00-7	zinco in polvere (stabilizzata)		231-175-3	7440-66-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
030-003-00-2	cloruro di zinco		231-592-0	7646-85-7	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R22-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
030-006-00-9	solfato di zinco (mono-, hexa- e heptaidrato) [1] solfato di zinco (anidra) [2]		231-793-3 [1] 231-793-3 [2]	7446-19-7 [1] 7733-02-0 [2]	Xn; R22 R41 N; R50-53	Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-)22-26-39-46-60-61		
033-001-00-X	arsenico		231-148-6	7440-38-2	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)20/21-28-45-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
033-002-00-5	composti di arsenico, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 23/25-50/53 S: (1/2-)20/21-28-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/25-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/25-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: T; R23/25 0,1 % ≤ C < 0,2 %: Xn; R20/22	1
042-002-00-4	esa-μ-ossotetra-μ3-ossodi-μ5-ossotetradecaossoottamolibdato(4-) di tetrachis(dimetildite-tradecilammonio)		404-760-8	117342-25-3	T; R23 Xi; R41 R53	T R: 23-41-53 S: (1/2-)26-37/39-45-61		
048-001-00-5	composti di cadmio, esclusi il solfoseleniuro (xCdS.yCdSe), i solfuri misti di cadmio e zinco (xCdS.yZnS), i solfuri misti di cadmio e mercurio (xCdS.yHgS) e quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/21/22-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22	1
048-003-00-6	diformiato di cadmio		224-729-0	4464-23-7	T; R23/25 R33 Xn; R68 N; R50-53	T; N R: 23/25-33-68-50/53 S: (1/2-)22-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/25-33-50/53-68 10 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/25-33-51/53-68 2,5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22-33-52/53-68 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/22-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/22-33-52/53	
048-004-00-1	cianuro di cadmio		208-829-1	542-83-6	T+; R26/27/28 R32 R33 Xn; R68 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-32-33-68-50/53 S: (1/2-)7-28-29-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-32-33-50/53-68 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-32-33-51/53-68 2,5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23/24/25-32-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/24/25-32-33-52/53-68 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22-33	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
048-005-00-7	esafluorosilicato(2-) di cadmio		241-084-0	17010-21-8	T; R23/25 R33 Xn; R68 N; R50-53	T; N R: 23/25-33-68-50/53 S: (1/2-)-22-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/25-33-50/53-68 10 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/25-33-51/53-68 2,5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22-33-52/53-68 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/22-33	
048-006-00-2	fluoruro di cadmio	E	232-222-0	7790-79-6	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23/25 N; R50-53	T+; N R: 45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-48/23/25-51/53 2,5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20/22-48/20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20/22-48/20/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20/22-48/20/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
048-007-00-8	cadmio ioduro		232-223-6	7790-80-9	T; R23/25 R33 Xn; R68 N; R50-53	T; N R: 23/25-33-68-50/53 S: (1/2-)-22-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/25-33-50/53-68 10 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/25-33-51/53-68 2,5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-33-51/53-68 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22-33-52/53-68 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/22-33	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
048-008-00-3	cloruro di cadmio	E	233-296-7	10108-64-2	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T+; R26 T; R25-48/23/25 N; R50-53	T+; N R: 45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-48/23/25-51/53 2,5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20/22-48/20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20/22-48/20/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20/22-48/20/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
048-009-00-9	solfo di cadmio	E	233-331-6	10124-36-4	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 T; R48/23/25 T+; R26 T; R25 N; R50-53	T+; N R: 45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-50/53 10 % ≤ C < 25 %: T+, N; R45-46-60-61-25-26-48/23/25-51/53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R45-46-60-61-22-26-48/23/25-51/53 2,5 % ≤ C < 7 %: T, N; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-46-60-61-22-23-48/20/22-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-60-61-20/22-48/20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-20/22-48/20/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46-20/22-48/20/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
048-010-00-4	solfo di cadmio	E	215-147-8	1306-23-6	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62-63 T; R48/23/25 Xn; R22 R53	T; N R: 45-22-48/23/25-62-63-68-53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %: T; R45-22-48/23/25-62-63-68-53 10 % ≤ C < 25 %: T; R45-22-48/23/25-62-63-68 5 % ≤ C < 10 %: T; R45-48/20/22-62-63-68 1 % ≤ C < 5 %: T; R45-48/20/22-68 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-48/20/22	1

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
050-001-00-5	tetracloruro di stagno		231-588-9	7646-78-8	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)7/8-26-45-61	C ≥ 25 %: C; R34-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38	
050-005-00-7	composti di stagno trimetile esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	T+; R26/27/28 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)26-27-28-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R23/24/25-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R23/24/25 0,05 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/21/22	1
050-006-00-2	composti di stagno trietile esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	T+; R26/27/28 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-50/53 S: (1/2-)26-27-28-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R23/24/25-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R23/24/25 0,05 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/21/22	1
050-007-00-8	composti di stagno tripropile esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	T; R23/24/25 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-50/53 S: (1/2-)26-27-28-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/24/25-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/24/25-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22	1
050-008-00-3	composti di stagno tributile esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	T; R25-48/23/25 Xn; R21 Xi; R36/38 N; R50-53	T; N R: 21-25-36/38-48/23/25-50/53 S: (1/2-)35-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R21-25-36/38-48/23/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R21-25-36/38-48/23/25-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R21-25-36/38-48/23/25-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R22-48/20/22-52/53	1
050-009-00-9	fluorotripentilstannano [1] esapentildistannossano [2]		243-546-7 [1] 247-143-7 [2]	20153-49-5 [1] 25637-27-8 [2]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/21/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	1
050-010-00-4	fluorotriesilstannano		243-547-2	20153-50-8	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/21/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	1

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
050-011-00-X	composti di stagno trifenile esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	T; R23/24/25 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-50/53 S: (1/2-)26-27-28-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/24/25-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/24/25-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-52/53	1
050-012-00-5	tetracicloesilstannano [1] clorotricicloesilstannano [2] butiltricicloesilstannano [3]	A	215-910-5 [1] 221-437-5 [2] 230-358-5 [3]	1449-55-4 [1] 3091-32-5 [2] 7067-44-9 [3]	Xn; R20/21/22 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/21/22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/21/22-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	1
050-013-00-0	composti di stagno triottile esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	Xi; R36/37/38 R53	Xi R: 36/37/38-53 S: (2-)61	C ≥ 25 %: Xi; R36/37/38-53 1 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38	1
051-002-00-3	pentacloruro di antimonio		231-601-8	7647-18-9	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)26-45-61	C ≥ 25 %: C, N; R34-51/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-52/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: R52/53	
051-003-00-9	composti di antimonio esclusi tetraossido (Sb ₂ O ₄), pentaossido (Sb ₂ O ₅), trisolfuro (Sb ₂ S ₃), penta-solfuro (Sb ₂ S ₅), e quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	Xn; R20/22 N; R51-53	Xn; N R: 20/22-51/53 S: (2-)61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/22-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn; R20/22-52/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/22	1
080-002-00-6	composti inorganici del mercurio, escluso il solfuro di mercurio (cinabro) e quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	T+; R26/27/28 R33 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-33-50/53 S: (1/2-)13-28-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-33-51/53 2 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-33-52/53 0,5 % ≤ C < 2 %: T; R23/24/25-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: Xn; R20/21/22-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22-33	1

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
080-004-00-7	composti organici del mercurio, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	T+; R26/27/28 R33 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-33-50/53 S: (1/2-)13-28-36-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-33-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-33-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R23/24/25-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: Xn; R20/21/22-33-52/53 0,05 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20/21/22-33	1
080-007-00-3	dimetilmercurio [1] dietilmercurio [2]		209-805-3 [1] 211-000-7 [2]	593-74-8 [1] 627-44-1 [2]	T+; R26/27/28 R33 N; R50-53	T+; N R: 26/27/28-33-50/53 S: (1/2-)13-28-36-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R26/27/28-33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T+, N; R26/27/28-33-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T+; R26/27/28-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R23/24/25-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R23/24/25-33 0,05 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/21/22-33	1
082-001-00-6	composti del piombo, esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato	AE	—	—	Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R20/22 R33 N; R50-53	T; N R: 61-20/22-33-62-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R61-20/22-33-62-50/53 5 % ≤ C < 25 %: T, N; R61-20/22-33-62-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T, N; R61-20/22-33-62-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R61-20/22-33-52/53 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R61-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: R52/53	1
082-002-00-1	piomboalchili	AE	—	—	Repr. Cat. 1; R61 Repr. Cat. 3; R62 T+; R26/27/28 R33 N; R50-53	T+; N R: 61-26/27/28-33-62-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R61-26/27/28-33-62-50/53 5 % ≤ C < 25 %: T+, N; R61-26/27/28-33-62-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T+, N; R61-26/27/28-33-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: T+; R61-26/27/28-33-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R61-26/27/28-33-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R61-23/24/25-33 0,05 % ≤ C < 0,1 %: Xn; R20/21/22-33	1

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
601-010-00-3	etilene		200-815-3	74-85-1	F+; R12 R67	F+ R: 12-67 S: (2-)9-16-33-46		
601-014-00-5	isoprene 2-metil-1,3-butadiene	D	201-143-3	78-79-5	F+; R12 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 R52-53	F+; T R: 45-12-68-52/53 S: 53-45-61		
601-017-00-1	cicloesano		203-806-2	110-82-7	F; R11 Xn; R65 Xi; R38 R67 N; R50-53	F; Xn; N R: 11-38-65-67-50/53 S: (2-)9-16-25-33-60-61-62		4 6
601-020-00-8	benzene	E	200-753-7	71-43-2	F; R11 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46 T; R48/23/24/25 Xn; R65 Xi; R36/38	F; T R: 45-46-11-36/38-48/ 23/24/25-65 S: 53-45		
601-021-00-3	toluene		203-625-9	108-88-3	F; R11 Repr.Cat.3; R63 Xn; R48/20-65 Xi; R38 R67	F; Xn R: 11-38-48/20-63-65-67 S: (2-)36/37-62-46		4, 6
601-025-00-5	mesitilene 1,3,5-trimetilbenzene		203-604-4	108-67-8	R10 Xi; R37 N; R51-53	Xi; N R: 10-37-51/53 S: (2-)61	C ≥ 25 %: Xi, N; R37-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: R52/53	
601-027-00-6	2-fenilpropene α-metilstirene		202-705-0	98-83-9	R10 Xi; R36/37 N; R51-53	Xi; N R: 10-36/37-51/53 S: (2-)61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: R52/53	
601-028-00-1	2-metilstirene 2-viniltoluene		210-256-7	611-15-4	Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 20-51/53 S: (2-)24-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: R52/53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
601-032-00-3	benzo[def]crisene benzo[a]pirene		200-028-5	50-32-8	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 2; R60-61 R43 N; R50-53	T; N R: 45-46-60-61-43-50/ 53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R43-45-46-50-53-60-61 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R43-45-46-51- 53-60-61 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R43-45-46-52-53- 60-61 0,5 % ≤ C < 1 %: T; R45-46-52-53-60-61 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T; R45-46-52-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R45-46 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
601-037-00-0	n-esano		203-777-6	110-54-3	F; R11 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R65-48/20 Xi; R38 R67 N; R51-53	F; Xn; N R: 11-38-48/20-62-65- 67-51/53 S: (2-)9-16-29-33-36/37- 61-62	C ≥ 25 %: Xn, N; R38-48/20-62-51/53 20 % ≤ C < 25 %: Xn; R38-48/20-62-52/ 53 5 % ≤ C < 20 %: Xn; R48/20-62-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: R52/53	4 6
601-041-00-2	dibenzo[a,h]antracene		200-181-8	53-70-3	Carc. Cat. 2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R45-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R45-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-52/53 0,01 % ≤ C < 0,25 %: T; R45	
601-048-00-0	crisene		205-923-4	218-01-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 N; R50-53	T; N R: 45-68-50/53 S: 53-45-60-61		
601-052-00-2	naftalene		202-049-5	91-20-3	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		
601-053-00-8	nonilfenolo [1] 4-nonilfenolo, ramificato [2]		246-672-0 [1] 284-325-5 [2]	25154-52-3 [1] 84852-15-3 [2]	Repr. Cat. 3; R62 Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-62-63-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45- 46-60-61		
602-003-00-8	dibromometano		200-824-2	74-95-3	Xn; R20 R52-53	Xn R: 20-52/53 S: (2-)24-61	C ≥ 25 %: Xn; R20-52/53 12,5 % ≤ C < 25 %: Xn; R20	
602-008-00-5	tetracloruro di carbonio tetraclorometano		200-262-8	56-23-5	Carc. Cat. 3; R40 T; R23/24/25-48/23 R52-53 N; R59	T; N R: 23/24/25-40-48/23- 59-52/53 S: (1/2-)23-36/37-45-59- 61	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-40-48/23-52/ 53-59 1 % ≤ C < 25 %: T, N; R23/24/25-40-48/ 23-59 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20/21/22-48/ 20-59 0,1 % ≤ C < 0,2 %: N; R59	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
602-010-00-6	1,2-dibromoetano	E	203-444-5	106-93-4	Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R36/37/38 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-36/37/ 38-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %: T, N; R45-23/24/25-36/37/38-51/53 20 % ≤ C < 25 %: T, N; R45-23/24/25-36/37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 20 %: T, N; R45-23/24/25-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23/24/25 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20/21/22	
602-011-00-1	1,1-dicloroetano		200-863-5	75-34-3	F; R11 Xn; R22 Xi; R36/37 R52-53	F; Xn R: 11-22-36/37-52/53 S: (2-)16-23-61	C ≥ 25 %: Xn; R22-36/37-52/53 20 % ≤ C < 25 %: Xn; R22-36/37 12,5 % ≤ C < 20 %: Xn; R22	
602-014-00-8	1,1,2-tricloroetano		201-166-9	79-00-5	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R20/21/22 R66	Xn R: 20/21/22-40-66 S: (2-)9-36/37-46	C ≥ 5 %: Xn; R20/21/22	
602-015-00-3	1,1,2,2-tetracloroetano		201-197-8	79-34-5	T+; R26/27 N; R51-53	T+; N R: 26/27-51/53 S: (1/2-)38-45-61	C ≥ 25 %: T+, N; R26/27-51/53 7 % ≤ C < 25 %: T+; R26/27-52/53 2,5 % ≤ C < 7 %: T; R23/24-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R23/24 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21	
602-016-00-9	1,1,2,2-tetrabromoetano		201-191-5	79-27-6	T+; R26 Xi; R36 R52-53	T+ R: 26-36-52/53 S: (1/2-)24-27-45-61	C ≥ 25 %: T+; R26-36-52/53 20 % ≤ C < 25 %: T+; R26-36 7 % ≤ C < 20 %: T+; R26 1 % ≤ C < 7 %: T; R23 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20	
602-017-00-4	pentacloroetano		200-925-1	76-01-7	Carc. Cat. 3; R40 T; R48/23 N; R51-53	T; N R: 40-48/23-51/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61	C ≥ 25 %: T, N; R40-48/23-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T; R40-48/23-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R40-48/23 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R48/20	
602-019-00-5	1-bromopropano bromuro di propile		203-445-0	106-94-5	F; R11 Rep. Cat. 2; R60 Rep. Cat. 3; R63 Xn; R48/20 Xi; R36/37/38 R67	T; F R: 60-11-36/37/38-48/ 20-63-67 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
602-025-00-8	1,1-dicloroetilene cloruro di vinilidene	D	200-864-0	75-35-4	F; R12 Carc.Cat.3; R40 Xn; R20	F+; Xn R: 12-20-40 S: (2-)7-16-29-36/37-46	C ≥ 12,5 %: Xn; R20-40 1 % ≤ C < 12,5 %: Xn; R40	
602-026-00-3	1,2-dicloroetilene [1] cis-dicloroetilene [2] trans-dicloroetilene [3]	C	208-750-2 [1] 205-859-7 [2] 205-860-2 [3]	540-59-0 [1] 156-59-2 [2] 156-60-5 [3]	F; R11 Xn; R20 R52-53	F; Xn R: 11-20-52/53 S: (2-)7-16-29-61	C ≥ 25 %: Xn; R20-52/53 12,5 % ≤ C < 25 %: Xn; R20	
602-029-00-X	3-cloropropene cloruro di allile	D	203-457-6	107-05-1	F; R11 Carc.Cat.3; R40 Muta.Cat.3; R68 Xn; R20/21/22-48/20 Xi; R36/37/38 N; R50	F; Xn; N R: 11-20/21/22-36/37/ 38-40-48/20-68-50 S: (2-)16-25-26-36/37- 46-61		
602-033-00-1	clorobenzene		203-628-5	108-90-7	R10 Xn; R20 N; R51-53	Xn; N R: 10-20-51/53 S: (2-)24/25-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20-51/53 5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: R52/53	
602-034-00-7	1,2-diclorobenzene o-diclorobenzolo		202-425-9	95-50-1	Xn; R22 Xi; R36/37/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/37/38-50/53 S: (2-)23-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-36/37/38-50/53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-36/37/38- 51/53 5 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R22-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
602-035-00-2	1,4-diclorobenzene p-diclorobenzolo		203-400-5	106-46-7	Xi; R36 Carc. Cat. 3; R40 N; R50-53	Xn; N R: 36-40-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		
602-036-00-8	2-cloro-1,3-butadiene cloroprene	D E	204-818-0	126-99-8	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 Xn; R20/22-48/20 Xi; R36/37/38	F; T R: 45-11-20/22-36/37/ 38-48/20 S: 53-45		
602-039-00-4	policlorodifenili PCB	C	215-648-1	1336-36-3	R33 N; R50-53	Xn; N R: 33-50/53 S: (2-)35-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R33-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R33-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xn, N; R33-52/53 0,005 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R33	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
602-043-00-6	lindano γ -1,2,3,4,5,6-esacloro-cicloesano		200-401-2	58-89-9	T; R25 Xn; R20/21-48/22 R64 N; R50-53	T; N R: 20/21-25-48/22-64-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61	C \geq 25 %: T, N; R20/21-25-48/22-64-50-53 10 % \leq C < 25 %: Xn, N; R22-48/22-64-50-53 3 % \leq C < 10 %: Xn, N; R22-64-50-53 2,5 % \leq C < 3 %: N; R64-50-53 1 % \leq C < 2,5 %: N; R64-51-53 0,25 % \leq C < 1 %: N; R51-53 0,025 % \leq C < 0,25 %: R52-53	
602-062-00-X	1,2,3-tricloropropano	D	202-486-1	96-18-4	Carc. Cat. 2; R45 Repr. Cat. 2; R60 Xn; R20/21/22	T R: 45-60-20/21/22 S: 53-45		
602-073-00-X	1,4-diclorobut-2-ene	E	212-121-8	764-41-0	Carc. Cat. 2; R45 T+; R26 T; R24/25 C; R34 N; R50-53	T+; N R: 45-24/25-26-34-50/53 S: 53-45-60-61	C \geq 25 %: T+, N; R45-24/25-26-34-50/53 10 % \leq C < 25 %: T+, N; R45-21/22-26-34-51/53 7 % \leq C < 10 %: T+, N; R45-21/22-26-36/37/38-51/53 5 % \leq C < 7 %: T, N; R45-21/22-23-36/37/38-51/53 3 % \leq C < 5 %: T, N; R45-21/22-23-51/53 2,5 % \leq C < 3 %: T, N; R45-23-51/53 1 % \leq C < 2,5 %: T; R45-23-52/53 0,25 % \leq C < 1 %: T; R45-20-52/53 0,1 % \leq C < 0,25 %: T; R45-20 0,01 % \leq C < 0,1 %: T; R45	
603-006-00-7	Pentanolio isomeri, esclusi quelli espressamente indicati in questo Allegato	C	250-378-8	30899-19-5	R10 Xn; R20 Xi; R37 R66	Xn R: 10-20-37-66 S: (2-)46		
603-007-00-2	2-metilbutan-2-olo alcolio amilico terziario		200-908-9	75-85-4	F; R11 Xn; R20 Xi; R37/38	F; Xn R: 11-20-37/38 S: (2-)46		
603-029-00-2	2,2'-dicloroetiletere		203-870-1	111-44-4	R10 Carc. Cat. 3; R40 T+; R26/27/28	T+ R: 10-26/27/28-40 S: (1/2-)7/9-27-28-36/37-45	C \geq 7 %: T+; R26/27/28-40 1 % \leq C < 7 %: T; R23/24/25-40 0,1 % \leq C < 1 %: Xn; R20/21/22	
603-030-00-8	2-aminoetanolo etanolamina		205-483-3	141-43-5	Xn; R20/21/22 C; R34	C R: 20/21/22-34 S: (1/2-)26-36/37/39-45	C \geq 25 %: C; R20/21/22-34 10 % \leq C < 25 %: C; R34 5 % \leq C < 10 %: Xi; R36/37/38	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
603-031-00-3	1,2-dimetossietano etilenglicol-dimetiletere dimetilglicol		203-794-9	110-71-4	Repr.Cat.2; R60 Repr.Cat.2; R61 F; R11 R19 Xn; R20	F; T R: 60-61-11-19-20 S: 53-45		
603-054-00-9	di-n-butil-etero		205-575-3	142-96-1	R10 Xi; R36/37/38 R52-53	Xi R: 10-36/37/38-52/53 S: (2-)61	C ≥ 10 %: Xi; R36/37/38	
603-063-00-8	2,3-epossipropan-1-olo glycidolo	E	209-128-3	556-52-5	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 2; R60 T; R23 Xn; R21/22 Xi; R36/37/38	T R: 45-60-21/22-23-36/ 37/38-68 S: 53-45		
603-066-00-4	1-epossietil-3,4-epossicicloesano		203-437-7	106-87-6	T; R23/24/25 Xn; R68	T R: 23/24/25-68 S: (1/2-)23-24-45	C ≥ 1 %: T; R23/24/25-68 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22	
603-067-00-X	1,2-epossi-3-fenossipropano	E	204-557-2	122-60-1	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20 Xi; R37/38 R43 R52-53	T R: 45-20-37/38-43-68- 52/53 S: 53-45-61		
603-070-00-6	2-amino-2-metilpropanolo		204-709-8	124-68-5	Xi; R36/38 R52-53	Xi R: 36/38-52/53 S: (2-)61	C ≥ 25 %: Xi; R36/38-52/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/38	
603-074-00-8	prodotto di reazione: bisfenolo-A-epicloridrina resine epossidiche (peso molecolare medio ≤ 700)		500-033-5	25068-38-6	Xi; R36/38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36/38-43-51/53 S: (2-)28-37/39-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/38-43-51/53 5 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/38-43-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi; R43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43	
603-076-00-9	but-2-in-1,4-diolo 2-butin-1,4-diolo	D	203-788-6	110-65-6	C; R34 T; R23/25 Xn; R21-48/22 R43	C; T R: 21-23/25-34-43-48/ 22 S: (1/2-)25-26-36/37/39- 45-46	C ≥ 50 %: T, C; R21-23/25-34-48/22-43 25 % ≤ C < 50 %: T; R21-23/25-36/38- 48/22-43 10 % ≤ C < 25 %: Xn; R20/22-48/22-43 3 % ≤ C < 10 %: Xn; R20/22-43 1 % ≤ C < 3 %: Xi; R43	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
603-095-00-2	2-(propilossi)etanolo EGPE		220-548-6	2807-30-9	Xn; R21 Xi; R36	Xn R: 21-36 S: (2-)26-36/37-46		
603-105-00-5	furano	E	203-727-3	110-00-9	F+; R12 R19 Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/22-48/22 Xi; R38 R52-53	F+; T R: 45-12-19-20/22-38-48/22-68-52/53 S: 53-45-61		
604-001-00-2	fenolo		203-632-7	108-95-2	Muta.Cat.3; R68 T; R23/24/25 Xn; R48/20/21/22 C; R34	T; C R: 23/24/25-34-48/20/21/22-68 S: (1/2-)24/25-26-28-36/37/39-45	C ≥ 10 %: T; R23/24/25-48/20/21/22-34-68 3 % ≤ C < 10 %: C ; Xn ; R20/21/22-34-68 1 % ≤ C < 3 %: Xn ; R36/38-68	
604-009-00-6	pirogallolo 1,2,3-triidrossibenzene		201-762-9	87-66-1	Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/21/22 R52-53	Xn R: 20/21/22-68-52/53 S: (2-)36/37-61	C ≥ 25 %: Xn; R20/21/22-68-52/53 10 % ≤ C < 25 %: Xn; R20/21/22-68 1 % ≤ C < 10 %: Xn; R68	
604-010-00-1	resorcina 1,3-diidrossibenzene		203-585-2	108-46-3	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50	Xn; N R: 22-36/38-50 S: (2-)26-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-36/38-50 20 % ≤ C < 25 %: Xn; R22-36/38 10 % ≤ C < 20 %: Xn; R22	
604-012-00-2	4-cloro- <i>o</i> -cresolo 4-cloro-2-metilfenolo		216-381-3	1570-64-5	T; R23 C; R35 N; R50	T; C; N R: 23-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: T, C, N; R23-35-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R20-35 5 % ≤ C < 10 %: C; R20-34 3 % ≤ C < 5 %: Xn; R20-36/37/38 1 % ≤ C < 3 %: Xi; R36/37/38	
604-013-00-8	2,3,4,6-tetraclorofenolo		200-402-8	58-90-2	T; R25 Xi; R36/38 N; R50-53	T; N R: 25-36/38-50/53 S: (1/2-)26-28-37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R25-36/38-50/53 20 % ≤ C < 25 %: T, N; R25-51/53 5 % ≤ C < 20 %: T, N; R25-36/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R22-51/53 0,5 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R22-52/53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: R52/53	
604-014-00-3	clorocresolo		200-431-6	59-50-7	Xn; R21/22 Xi; R41 R43 N; R50	Xn; N R: 21/22-41-43-50 S: (2-)26-36/37/39-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R21/22-41-43-50 10 % ≤ C < 25 %: Xn; R21/22-41-43 5 % ≤ C < 10 %: Xn; R21/22-36-43 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R43	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
604-015-00-9	2,2'-metilen-bis-(3,4,6-triclorofenolo) esaclorofene		200-733-8	70-30-4	T; R24/25 N; R50-53	T; N R: 24/25-50/53 S: (1/2-)20-37-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R24/25-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R24/25-51/53 2 % ≤ C < 2,5 %: T; R24/25-52/53 0,25 % ≤ C < 2 %: Xn; R21/22-52/53 0,2 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R21/22	
604-017-00-X	2,4,5-triclorofenolo		202-467-8	95-95-4	Xn; R22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 22-36/38-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-36/38-50/53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-36/38-51/53 5 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R36/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
604-030-00-0	4,4'-isopropilidendifenolo		201-245-8	80-05-7	Repr. Cat. 3; R62 Xi; R37-41 R43	Xn R: 37-41-43-62 S: (2-)26-36/37-39-46		
605-002-00-0	1,3,5-triossano triossimetilene		203-812-5	110-88-3	F; R11 Repr.Cat.3; R63 Xi; R37	F; Xn R: 11-37-63 S: (2-)36/37-46		
605-016-00-7	gliosale...% etandiale...%	B	203-474-9	107-22-2	Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20 Xi; R36/38 R43	Xn R: 20-36/38-43-68 S: (2-)36/37	C ≥ 10 %: Xn; R20-36/38-43-68 1 % ≤ C < 10 %: Xn; R43-68	
605-020-00-9	safrolo 5-allil-1,3-benzodiossolo	E	202-345-4	94-59-7	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R22	T R: 45-22-68 S: 53-45		
605-022-00-X	glutarale glutaraldeide 1,5-pentandiale		203-856-5	111-30-8	T; R23/25 C; R34 R42/43 N; R50	T; N R: 23/25-34-42/43-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 50 %: T, N; R23/25-34-42/43-50 25 % ≤ C < 50 %: T; R22-23-34-42/43 10 % ≤ C < 25 %: C; R20/22-34-42/43 2 % ≤ C < 10 %: Xn; R20/22-37/38-41-42/43 1 % ≤ C < 2 %: Xn; R36/37/38-42/43 0,5 % ≤ C < 1 %: Xi; R36/37/38-43	
605-025-00-6	cloroacetaldeide		203-472-8	107-20-0	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 T; R24/25 C; R34 N; R50	T+; N R: 24/25-26-34-40-50 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: T+, N; R24/25-26-34-40-50 10 % ≤ C < 25 %: T+; R21/22-26-34-40 7 % ≤ C < 10 %: T+; R21/22-26-36/37/38-40 5 % ≤ C < 7 %: T; R21/22-23-36/37/38-40 3 % ≤ C < 5 %: T; R21/22-23-40 1 % ≤ C < 3 %: T; R23-40 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
606-037-00-4	triadimefon (ISO) 1-(4-clorofenossi)-3,3-dimetil-1-(1,2,4-triazol-1-il)butanone		256-103-8	43121-43-3	Xn; R22 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-43-51/53 S: (2-)24-37-61		
606-048-00-4	2'-anilino-3'-metil-6'-dipentilamminospiro(isobenzofuran-1(1H),9'-xanten)-3-one		406-480-1	—	R53	R: 53 S: 61		
607-004-00-7	acido tricloroacetico		200-927-2	76-03-9	C; R35 N; R50-53	C; N R: 35-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R35-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R35-51/53 5 % ≤ C < 10 %: C, N; R34-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R36/37/38-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	
607-019-00-9	cloroformiato di metile metile cloroformiato		201-187-3	79-22-1	F; R11 T+; R26 Xn; R21/22 C; R34	F; T+ R: 11-21/22-26-34 S: (1/2-)26-14-28-36/37-39-36/37/39-45-46-63		
607-049-00-2	mecoprop (ISO) acido 2-(4-cloro- <i>o</i> -tolilossi) propionico acido (RS)-2-(4-cloro- <i>o</i> -tolilossi) propionico [1]		230-386-8 [1] 202-264-4 [2]	7085-19-0 [1] 93-65-2 [2]	Xn; R22 Xi; R38-41 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-41-50/53 S: (2-)13-26-37/39-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-38-41-50-53 20 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R38-41-50-53 10 % ≤ C < 20 %: Xi, N; R41-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36-50-53 0,25 % ≤ C < 5 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
607-053-00-4	MCPB (ISO) acido 4-(4-cloro- <i>o</i> -tolilossi) butirrico		202-365-3	94-81-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-061-00-8	acido acrilico	D	201-177-9	79-10-7	R10 Xn; R20/21/22 C; R35 N; R50	C; N R: 10-20/21/22-35-50 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C, N; R20/21/22-35-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R35 5 % ≤ C < 10 %: C; R34 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R36/37/38	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-064-00-4	cloroformiato di benzile benzile cloroformiato		207-925-0	501-53-1	C; R34 N; R50-53	C; N R: 34-50/53 S: (1/2-)26-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
607-072-00-8	acrilato di 2-idrossietile	D	212-454-9	818-61-1	T; R24 C; R34 R43 N; R50	T; N R: 24-34-43-50 S: (1/2-)26-36/39-45-61	C ≥ 25 %: T; R24-34-43-50 10 % ≤ C < 25 %: T; R24-34-43 5 % ≤ C < 10 %: T; R24-36/38-43 2 % ≤ C < 5 %: T; R24-43 0,2 % ≤ C < 2 %: Xn; R21-43	
607-086-00-4	ftalato di diallile		205-016-3	131-17-9	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24/25-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
607-091-00-1	acido trifluoroacetico ... %	B	200-929-3	76-05-1	Xn; R20 C; R35 R52-53	C R: 20-35-52/53 S: (1/2-)9-26-27-28-45-61	C ≥ 25 %: C; R20-35-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R20-35 5 % ≤ C < 10 %: C; R34 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R36/38	
607-094-00-8	acido peracetico ... %		201-186-8	79-21-0	R10 O; R7 Xn; R20/21/22 C; R35 N; R50	O; C; N R: 7-10-20/21/22-35-50 S: (1/2-)3/7-14-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C, N; R20/21/22-35-50 10 % ≤ C < 25 %: C; R20/21/22-35 5 % ≤ C < 10 %: C; R34 1 % ≤ C < 5 %: Xi, R36/37/38	
607-107-00-7	2-etilesil acrilato	D	203-080-7	103-11-7	Xi; R37/38 R43	Xi R: 37/38-43 S: (2-)36/37-46		
607-113-00-X	metacrilato di isobutile	D	202-613-0	97-86-9	R10 Xi; R36/37/38 R43 N; R50	Xi; N R: 10-36/37/38-43-50 S: (2-)24-37-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-43-50 20 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38-43 1 % ≤ C < 20 %: Xi; R43	
607-116-00-6	acrilato di cicloesile	D	221-319-3	3066-71-5	Xi; R37/38 N; R51-53	Xi; N R: 37/38-51/53 S: (2-)61	C ≥ 25 %: Xi, N; R37/38-51/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 10 %: R52/53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-133-00-9	monoalchil o monoaril o monoalchilaril esteri di acido acrilico esclusi quelli espressamente indicati in questo allegato	A	—	—	Xi; R36/37/38 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-51/53 S: (2-)26-28-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38-52/53 2,5 % ≤ C < 10 %: R52/53	
607-151-00-7	propargite (ISO) solfito di 2-(4-terz-butilfenossi) cicloesile e prop-2-inile		219-006-1	2312-35-8	Carc.Cat.3; R40 T; R23 Xi; R38-41 N; R50-53	T; N R: 23-38-40-41-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23-38-40-41-50-53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20-38-40-41-50-53 10 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R20-40-41-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20-40-36-50-53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20-40-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: Xn, N; R40-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn, N; R40-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
607-189-00-4	acido trimetilendiamminatetraacetico		400-400-9	1939-36-2	Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-)22-26-39-60-61		
607-244-00-2	acrilato di isoottile		249-707-8	29590-42-9	Xi; R36/37/38 N; R50-53	Xi; N R: 36/37/38-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-50/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
607-245-00-8	acrilato di terz-butile terz-butile acrylato	D	216-768-7	1663-39-4	F; R11 Xn; R20/21/22 Xi; R37/38 R43 N; R52-53	F; Xn R: 11-20/21/22-37/38-43-52/53 S: (2-)16-25-37-61	C ≥ 25 %: Xn; R20/21/22-37/38-43-52-53 20 % ≤ C < 25 %: Xi; R37/38-43 1 % ≤ C < 20 %: Xi; R43	
607-247-00-9	metacrilato di dodecile		205-570-6	142-90-5	Xi; 36/37/38 N; R50-53	Xi; N R: 36/37/38-50/53 S: (2-)26-28-60-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-50/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,50 %: R52/53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-249-00-X	diacrilato di (1-metil-1,2-etandil)bis[ossi(metil-2,1-etandile)]		256-032-2	42978-66-5	Xi; R36/37/38 R43 N; R51-53	Xi; N R: 36/37/38-43-51/53 S: (2-)24-37-61	C ≥ 25 %: Xi, N; R36/37/38-43-51/53 10 % ≤ C < 25 %: Xi; R36/37/38-43-52/53 2,5 % ≤ C < 10 %: Xi; R43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43	
608-003-00-4	acrilonitrile	D E	203-466-5	107-13-1	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T; R23/24/25 Xi; R37/38-41 R43 N; R51-53	F; T; N R: 45-11-23/24/25-37/ 38-41-43-51/53 S: 9-16-53-45-61	C ≥ 25 %: T, N; R45-23/24/25-37/38-41-43-51/53 20 % ≤ C < 25 %: T; R45-23/24/25-37/38-41-43-52/53 10 % ≤ C < 20 %: T; R45-23/24/25-41-43-52/53 5 % ≤ C < 10 %: T; R45-23/24/25-36-43-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T; R45-23/24/25-43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23/24/25-43 0,2 % ≤ C < 1 %: T; R45-20/21/22 0,1 % ≤ C < 0,2 %: T; R45	
608-006-00-0	bromoxinil (ISO) 3,5-dibromo-4-idrossibenzonitrile		216-882-7	1689-84-5	Repr. Cat. 3; R63 T+; R26 T; R25 R43 N; R50-53	T+; N R: 25-26-43-63-50/53 S: (1/2-)27/28-36/37-45-63-60-61	C ≥ 25 %: T+, N; R25-26-43-63-50-53 7 % ≤ C < 25 %: T+, N; R22-26-43-63-50-53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R22-23-43-63-50-53 3 % ≤ C < 5 %: T, N; R22-23-43-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: T, N; R23-43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R23-43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20-51-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20-52-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: R52-53	
608-007-00-6	ioxinil (ISO) 4-idrossi-3,5-diiodobenzonitrile		216-881-1	1689-83-4	Repr. Cat. 3; R63 T; R23/25 Xn; R21-48/22 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 21-23/25-36-48/22-63-50/53 S: (1/2-)36/37-45-60-61-63	C ≥ 25 %: T, N; R21-23/25-36-48/22-63-50-53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20/22-36-48/22-63-50-53 10 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R20/22-48/22-63-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/22-63-50-53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20/22-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R50-53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
608-010-00-2	metacrilonitrile 2-metil-2-propene-nitrile	D	204-817-5	126-98-7	F; R11 T; R23/24/25 R43	F; T R: 11-23/24/25-43 S: (1/2-)9-16-18-29-45	C ≥ 1 %: T; R23/24/25-43 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R20/21/22-43	
608-014-00-4	clorotalonil (ISO) tetracloroisofalonnitrile		217-588-1	1897-45-6	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R41 Xi; R37 R43 N; R50-53	T+; N R: 26-37-40-41-43-50/ 53 S: (2-)28-36/37/39-45- 60-61	C ≥ 20 %: T+, N; R26-37-40-41-43-50-53 10 % ≤ C < 20 %: T+, N; R26-40-41-43- 50-53 7 % ≤ C < 10 %: T+, N; R26-40-36-43- 50-53 5 % ≤ C < 7 %: T, N; R23-40-36-43-50- 53 2,5 % ≤ C < 5 %: T, N; R23-40-43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R23-40-43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: Xn, N; R20-51-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xn; R20-52-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: R52-53	
608-017-00-0	bromoxinil ottanoato (ISO) ottanoato di 2,6-dibromo-4-cia- nofenile		216-885-3	1689-99-2	Repr. Cat. 3; R63 T; R23 Xn; R22 R43 N; R50-53	T; N R: 22-23-43-63-50/53 S: (1/2-)36/37-45-63-60- 61	C ≥ 25 %: T, N; R22-23-43-63-50-53 5 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R20-43-63-50-53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20-43-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: Xi, N; R43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi, N; R43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
608-018-00-6	ioxinil ottanoato (ISO) ottanoato di 4-ciano-2,6-diiodo- fenile		223-375-4	3861-47-0	Repr. Cat. 3; R63 T; R25 Xi; R36 R43 N; R50-53	T; N R: 25-36-43-63-50/53 S: (1/2-)26-36/37-45-60- 61	C ≥ 25 %: T, N; R25-36-43-63-50-53 20 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R22-36-43-63- 50-53 5 % ≤ C < 20 %: Xn, N; R22-43-63-50-53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R22-43-50-53 2,5 % ≤ C < 3 %: N; R43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: N; R43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
608-021-00-2	3-(2-(diamminometilenammino)- tiazol-4-ilmetilto)propiononi- trile		403-710-2	76823-93-3	Xn; R22 R43	Xn R: 22-43 S: (2-)22-24-37		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
609-007-00-9	2,4-dinitrotoluene dinitrotoluene, tecnico [1] dinitrotoluene [2]	E	204-450-0 [1] 246-836-1 [2]	121-14-2 [1] 25321-14-6 [2]	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-51/53 S: 53-45-61		
609-023-00-6	dinocap (ISO)	E	254-408-0	39300-45-3	Repr. Cat. 2; R61 Xn; R20-48/22 Xi; R38 R43 N; R50-53	T; N R: 61-20-22-38-43-48/ 22-50/53 S: 53-45-60-61		
609-043-00-5	quintozene (ISO) pentacloronitrobenzene		201-435-0	82-68-8	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)13-24-37-60-61		
609-049-00-8	2,6-dinitrotoluene	E	210-106-0	606-20-2	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 R52-53	T R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-52/53 S: 53-45-61		
609-050-00-3	2,3-dinitrotoluene	E	210-013-5	602-01-7	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R50-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-50/53 S: 53-45-60-61		
609-051-00-9	3,4-dinitrotoluene	E	210-222-1	610-39-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22- 62-68-51/53 S: 53-45-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
609-052-00-4	3,5-dinitrotoluene	E	210-566-2	618-85-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 R52-53	T R: 45-23/24/25-48/22-62-68-52/53 S: 53-45-61		
609-055-00-0	2,5-dinitrotoluene	E	210-581-4	619-15-8	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62 T; R23/24/25 Xn; R48/22 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-48/22-62-68-51/53 S: 53-45-61		
609-056-00-6	2,2-dibromo-2-nitroetano		412-380-9	69094-18-4	E; R2 Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22-48/22 C; R35 R43 N; R50-53	E; C; N R: 2-22-35-40-43-48/22-50/53 S: (1/2-)23-26-35-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R22-35-40-43-48/22-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R22-35-40-43-48/22-51/53 5 % ≤ C < 10 %: C, N; R34-40-43-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R36/37/38-40-43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R36/37/38-40-43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	
610-005-00-5	1-cloro-4-nitrobenzene		202-809-6	100-00-5	Carc. Cat. 3; R40 Mut. Cat. 3; R68 T; R23/24/25 Xn; R48/20/21/22 N; R51-53	T; N R: 23/24/25-40-48/20/21/22-68-51/53 S: (1/2-)28-36/37-45-61		
611-001-00-6	azobenzene difenildiazene	E	203-102-5	103-33-3	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/22-48/22 N; R50-53	T; N R: 45-20/22-48/22-68-50/53 S: 53-45-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
611-060-00-8	Miscela di: 5-[8-[4-[4-[7-(3,5-dicarbossilatofenilazo)-8-idrossi-3,6-disolfonato-naftalen-1-ilammino]-6-idrossi-1,3,5-triazin-2-il]-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-6-idrossi-1,3,5-triazin-2-ilammino]-1-idrossi-3,6-disolfonato-naftalen-2-ilazo]-isofalato di sodio; 5-[8-[4-[4-[7-(3,5-dicarbossilatofenilazo)-8-idrossi-3,6-disolfonato-naftalen-1-ilammino]-6-idrossi-1,3,5-triazin-2-il]-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-6-idrossi-1,3,5-triazin-2-ilammino]-1-idrossi-3,6-disolfonato-naftalen-2-ilazo]-isofalato d'ammonio;acido 5-[8-[4-[4-[7-(3,5-dicarbossilatofenilazo)-8-idrossi-3,6-disolfonato-naftalen-1-ilammino]-6-idrossi-1,3,5-triazin-2-il]-2,5-dimetilpiperazin-1-il]-6-idrossi-1,3,5-triazin-2-ilammino]-1-idrossi-3,6-disolfonato-naftalen-2-ilazo]-isofalico		413-180-4	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
611-063-00-4	[4'-(8-acetilammino-3,6-disolfonato-2-naftilazo)-4''-(6-benzoilammino-3-solfonato-2-naftilazo)-bifenil-1,3',3'',1'''-tetraolato-O,O',O'',O''']rame(II) di trisodio		413-590-3	164058-22-4	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
612-008-00-7	anilina		200-539-3	62-53-3	Carc. Cat. 3; R40 Muta.Cat.3; R68 T; R23/24/25-48/23/24/25 Xi; R41 R43 N; R50	T; N R: 23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-68-50 S: (1/2-)26-27-36/37/39-45-46-61-63	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-50-68 10 % ≤ C < 25 %: T; R20/21/22-40-41-43-48/23/24/25-68 1 % ≤ C < 10 %: T; R20/21/22-40-43-48/23/24/25-68 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R48/20/21/22	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
612-009-00-2	sali di anilina	A	—	—	Carc. Cat. 3; R40 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25 Xi; R41 R43 N; R50	T; N R: 23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-68-50 S: (1/2-)26-27-36/37/39-45-61-63	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-40-41-43-48/23/24/25-50-68 10 % ≤ C < 25 %: T; R20/21/22-40-41-43-48/23/24/25-68 1 % ≤ C < 10 %: T; R20/21/22-40-43-48/23/24/25-68 0,2 % ≤ C < 1 %: Xn; R48/20/21/22	
612-010-00-8	cloroaniline (esclusi quelli espressamente indicati in questo Allegato)	C	—	—	T; R23/24/25 R33 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-33-50/53 S: (1/2-)28-36/37-45-60-61		
612-022-00-3	2-naftilamina	E	202-080-4	91-59-8	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %: T, N; R45-22-51/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T; R45-52/53 0,01 % ≤ C < 2,5 %: T; R45	
612-023-00-9	fenilidrazina [1] cloruro di fenilidrazina [2] cloridrato di fenilidrazina [3] solfato di fenilidrazina (2:1) [4]	E	202-873-5 [1] 200-444-7 [2] 248-259-0 [3] 257-622-2 [4]	100-63-0 [1] 59-88-1 [2] 27140-08-5 [3] 52033-74-6 [4]	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25-48/23/24/25 Xi; R36/38 R43 N; R50	T; N R: 45-23/24/25-36/38-43-48/23/24/25-68-50 S: 53-45-61		
612-025-00-X	nitrotoluidina	C	—	—	T; R23/24/25 R33 N; R51-53	T; N R: 23/24/25-33-51/53 S: (1/2-)28-36/37-45-61		
612-035-00-4	2-metossi-anilina o-anisidina	E	201-963-1	90-04-0	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T; R23/24/25	T R: 45-23/24/25-68 S: 53-45		
612-042-00-2	benzidina 1,1'-bifenil-4,4' diamina 4,4'-diaminobifenile	E	202-199-1	92-87-5	Carc. Cat. 1; R45 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 45-22-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R45-22-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: T, N; R45-51/53 0,01 % ≤ C < 2,5 %: T; R45	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
612-051-00-1	4,4'-diaminodifenilmetano	E	202-974-4	101-77-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 T; R39/23/24/25 Xn; R48/20/21/22 R43 N; R51-53	T; N R: 45-39/23/24/25-43-48/20/21/22-68-51/53 S: 53-45-61		
612-054-00-8	N,N-dietilanilina		202-088-8	91-66-7	T; R23/24/25 R33 N; R51-53	T; N R: 23/24/25-33-51/53 S: (1/2-)28-37-45-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-33-51/53 5 % ≤ C < 25 %: T; R23/24/25-33-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xn; R20/21/22-33-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xn; R20/21/22-33	
612-056-00-9	N,N-dimetil-p-toluidina [1] N,N-dimetil-m-toluidina [2] N,N-dimetil-o-toluidina [3]	C	202-805-4 [1] 204-495-6 [2] 210-199-8 [3]	99-97-8 [1] 121-72-2 [2] 609-72-3 [3]	T; R23/24/25 R33 R52-53	T R: 23/24/25-33-52/53 S: (1/2-)28-36/37-45-61	C ≥ 25 %: T; R23/24/25-33-52-53 5 % ≤ C < 25 %: T; R23/24/25-33 1 % ≤ C < 5 %: Xn; R20/21/22-33	
612-059-00-5	3,6-diazaottano-1,8-diamina trietilene tetramina		203-950-6	112-24-3	Xn; R21 C; R34 R43 R52-53	C R: 21-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C; R21-34-43-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-43 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/38-43 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R43	
612-060-00-0	3,6,9-triazaundecano-1,11-diamino tetraetilenepentamina		203-986-2	112-57-2	Xn; R21/22 C; R34 R43 N; R51-53	C; N R: 21/22-34-43-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C, N; R21/22-34-43-51/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-43-52/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/38-43-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi; R43-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43	
612-064-00-2	3,6,9,12-tetraazatetradecano-1,14-diamina pentactileneesamina		223-775-9	4067-16-7	C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-43-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-43-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi, N; R43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	
612-065-00-8	polietilenpoliamine escluse quelle espressamente indicate in questo allegato		—	—	Xn; R21/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R21/22-34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-43-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
612-066-00-3	dicicloesilamina		202-980-7	101-83-7	Xn; R22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 22-34-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R22-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-51/53 2,5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-51/53 2 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R36/38-52/53 0,25 % ≤ C < 2 %: R52/53	
612-067-00-9	3-aminometil-3,5,5-trimetilcicloesilamina		220-666-8	2855-13-2	Xn; R21/22 C; R34 R43 R52-53	C R: 21/22-34-43-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61	C ≥ 25 %: C; R21/22-34-43-52/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R34-43 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36/38-43 1 % ≤ C < 5 %: Xi; R43	
612-077-00-3	dimetilnitrosoamina N-nitrosodimetilamina	E	200-549-8	62-75-9	Carc. Cat. 2; R45 T+; R26 T; R25-48/25 N; R51-53	T+; N R: 45-25-26-48/25-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-25-26-48/25-51/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-22-26-48/25-52/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-22-26-48/22-52/53 3 % ≤ C < 7 %: T; R45-22-23-48/22-52/53 2,5 % ≤ C < 3 %: T; R45-23-48/22-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23-48/22 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20 0,001 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
612-086-00-2	amitraz (ISO) N,N-bis(2,4-xililiminometil)metilamina		251-375-4	33089-61-1	Xn; R22-48/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-48/22-50/53 S: (2-)22-60-24-61-36/37	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-43-48/22-50-53 10 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R43-48/22-50-53 2,5 % ≤ C < 10 %: N; R43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: N; R43-51-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R51-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52-53	
612-087-00-8	guazatina 1,1'-iminobis(ottametilen)diguanidina		236-855-3	13516-27-3	T+; R26 Xn; R21/22 Xi; R37/38-41 N; R50-53	T+; N R: 21/22-26-37/38-41-50/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-38-45-46-60-61-63		
612-094-00-6	4-(2-cloro-4-trifluorometil)fenossi-2-fluoroanilina, cloridrato		402-190-4	—	T; R48/25 Xn; R22-48/20 Xi; R41 R43 N; R50-53	T; N R: 22-41-43-48/20-48/25-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
612-121-00-1	amine, polietilenpoli-HEPA		268-626-9	68131-73-7	Xn; R21/22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R21/22-34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-43-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/38-43-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi, N; R43-51/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52/53	
612-136-00-3	N'-fenil-N-isopropil-p-fenilendiamina		202-969-7	101-72-4	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-43-50/53 2,5 % ≤ C < 25 %: Xi, N; R43-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: Xi; R43	
612-151-00-5	diaminotoluene [1]	E	246-910-3 [1] 202-453-1 [2] 212-513-9 [3]	25376-45-8 [1] 95-80-7 [2] 823-40-5 [3]	Carc. Cat. 2; R45 T; R25 Xn; R20/21 Xi; R36 R43 N; R51-53	T; N R: 45-20/21-25-36-43-51/53 S: 53-45-61		
613-009-00-5	2,4,6-tricloro-1,3,5-triazina cloruro di cianurile		203-614-9	108-77-0	T+; R26 Xn; R22 C; R34 R43 R14	T+; C R: 14-22-26-34-43 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-46-63	C ≥ 25 %: T+; R22-26-34-43 10 % ≤ C < 25 %: T+; R26-34-43 7 % ≤ C < 10 %: T+; R26-36/37/38-43 5 % ≤ C < 7 %: T; R23-36/37/38-43 1 % ≤ C < 5 %: T; R23-43 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20	
613-011-00-6	amitrol (ISO) 1,2,4-triazol-3-ilammina		200-521-5	61-82-5	Repr.Cat.3; R63 Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-63-51/53 S: (2-)13-36/37-61		
613-033-00-6	2-metilaziridina propileneimina	E	200-878-7	75-55-8	F; R11 Carc. Cat. 2; R45 T+; R26/27/28 Xi; R41 N; R51-53	F; T+; N R: 45-11-26/27/28-41-51/53 S: 53-45-61	C ≥ 25 %: T+, N; R45-26/27/28-41-51/53 10 % ≤ C < 25 %: T+; R45-26/27/28-41-52/53 7 % ≤ C < 10 %: T+; R45-26/27/28-36-52/53 5 % ≤ C < 7 %: T; R45-23/24/25-36-52/53 2,5 % ≤ C < 5 %: T; R45-23/24/25-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: T; R45-23/24/25 0,1 % ≤ C < 1 %: T; R45-20/21/22 0,01 % ≤ C < 0,1 %: T; R45	
613-040-00-4	azaconazolo (ISO) 1-[[2-(2,4-diclorofenil)-1,3-diosolan-2-il]metil]-1H-1,2,4-triazolo		262-102-3	60207-31-0	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)46		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
613-043-00-0	imazalil solfato (ISO) polvere idrogenosolfato di 1-[2-(allilossi)etil-2-(2,4-diclorofenil)]-1H-imidazolio [1] idrogenosolfato di (±)-1-[2-(allilossi)etil-2-(2,4-diclorofenil)]-1H-imidazolio [2]		261-351-5 [1] 281-291-3 [2]	58594-72-2 [1] 83918-57-4 [2]	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)24/25-37-46-60-61		
613-048-00-8	carbendazina (ISO) benzimidazol-2-ilcarbammato di metile		234-232-0	10605-21-7	Muta. Cat. 2; R46 Repr.Cat.2; R60-6 N; R50-531	T; N R: 46-60-61-50/53 S: 53-45-60-61		
613-049-00-3	benomil (ISO) 1-(butilcarbammoil)benzimidazol-2-ilcarbammato di metile		241-775-7	17804-35-2	Muta. Cat. 2; R46 Repr.Cat.2; R60-61 Xi; R37/38 R43 N; R50-53	T; N R: 46-60-61-37/38-43-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 20 %: T, N; R46-60-61-37/38-43-50-53 2,5 % ≤ C < 20 %: T, N; R46-60-61-43-50-53 1 % ≤ C < 2,5 %: T, N; R46-60-61-43-51-53 0,5 % ≤ C < 1 %: T, N; R46-60-61-51-53 0,25 % ≤ C < 0,5 %: T, N; R46-51-53 0,1 % ≤ C < 0,25 %: T; R46-52-53 0,025 % ≤ C < 0,1 %: R52-53	
613-051-00-4	molinato (ISO) 1-peridroazepintioato di S-etile		218-661-0	2212-67-1	Carc.Cat3; R40 Repr.Cat3; R62 Xn; R20/22 Xn; R48/22 R43 N; R50-53	T; N R: 20/22-40-43-48/22-63-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/22-40-43-48/22-62-50-53 10 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R40-43-48/22-62-50-53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R40-43-62-50-53 1 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R40-43-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
613-058-00-2	3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropancarbossilato di <i>m</i> -fenossibenzile permetrine (ISO)		258-067-9	52645-53-1	Xn; R20/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-43-50/53 S: (2-)13-24-36/37/39-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R20/22-43-50-53 1 % ≤ C < 25 %: N; R43-50-53 0,025 % ≤ C < 1 %: N; R50-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: N; R51-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: R52-53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
613-075-00-5	1,3-dicloro-5-etil-5-metilimidazolidin-2,4-dione		401-570-7	89415-87-2	O; R8 T; R23 C; R34 Xn; R22 R43 N; R50	O; T; N R: 8-22-23-34-43-50 S: (1/2-)8-26-36/37/39-45-61		
613-088-00-6	1,2-benzisotiazol-3(2H)-one		220-120-9	2634-33-5	Xn; R22 Xi; R38-41 R43 N; R50	Xn; N R: 22-38-41-43-50 S: (2-)24-26-37/39-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-38-41-43-50 20 % ≤ C < 25 %: Xi; R38-41-43 10 % ≤ C < 20 %: Xi; R41-43 5 % ≤ C < 10 %: Xi; R36-43 0,05 % ≤ C < 5 %: Xi; R43	
613-112-00-5	2-ottil-2H-isotiazol-3-one		247-761-7	26530-20-1	T; R23/24 Xn; R22 C; R34 R43 N; R50-53	T; N R: 22-23/24-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R22-23/24-34-43-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R20/21-34-43-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xn, N; R20/21-36/38-43-51/53 3 % ≤ C < 5 %: Xn, N; R20/21-43-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: Xi, N; R43-51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52/53 0,05 % ≤ C < 0,25 %: Xi; R43	
613-124-00-0	fenpropimorf cis-4-[3-(p-terz-butilfenil)-2-metilpropil]-2,6-dimetilmorfolina		266-719-9	67564-91-4	Repr. Cat. 3; R63 Xn; R22 Xi; R38 N; R51-53	Xn; N R: 22-38-63-51/53 S: (2-)36/37-46-61		
613-129-00-8	metamitron 4-amino-3-metil-6-fenil-1,2,4-triazin-5-one		255-349-3	41394-05-2	Xn; R22 N; R50	Xn; N R: 22-50 S: (2-)61		
613-167-00-5	Miscela di: 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 247-500-7]; 2-metil-2H-isotiazol-3-one [EC no. 220-239-6] (3:1)		—	55965-84-9	T; R23/24/25 C; R34 R43 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-34-43-50/53 S: (2-)26-28-36/37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: T, N; R23/24/25-34-43-50/53 3 % ≤ C < 25 %: C, N; R20/21/22-34-43-51/53 2,5 % ≤ C < 3 %: C, N; R34-43-51/53 0,6 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R34-43-52/53 0,25 % ≤ C < 0,6 %: Xi; R33/38-43-52/53 0,06 % ≤ C < 0,25 %: Xi; R36/38-43 0,0015 % ≤ C < 0,06 %: Xi; R43	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
613-175-00-9	(2RS,3SR)-3-(2-clorofenil)-2-(4-fluorofenil)-[1H-1,2,4-triazol-1-il]metil]ossirano		406-850-2	133855-98-8	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 3; R62 Repr. Cat. 3; R63 N; R51-53	Xn; N R: 40-62-63-51/53 S: (2-)36/37-46-61		
615-001-00-7	isocianato di metile metilisocianato		210-866-3	624-83-9	F+; R12 Repr. Cat. 3; R63 T+; R26 T; R24/25 R42/43 Xi; R37/38-41	F+; T+ R: 12-24/25-26-37/38-41-42/43-63 S: (1/2-)26-27/28-36/37/39-45-63		
615-004-00-3	sali dell'acido solfocianico	A	—	—	Xn; R20/21/22 R32 R52-53	Xn R: 20/21/22-32-52/53 S: (2-)13-61		
615-006-00-4	diisocianato di 2-metil- <i>m</i> -fenilene 2,4-toluen-diisocianato [1] diisocianato di 4-metil- <i>m</i> -fenilene 2,6-toluen-diisocianato [2] diisocianato di <i>m</i> -tolilidene [3]		202-039-0 [1] 209-544-5 [2] 247-722-4 [3]	91-08-7 [1] 584-84-9 [2] 26471-62-5 [3]	Carc. Cat. 3; R40 T+; R26 Xi; R36/37/38 R42/43 R52-53	T+ R: 26-36/37/38-40-42/43-52/53 S: (1/2-)23-36/37-45-61	C ≥ 25 %: T+; R26-36/37/38-40-42/43-52/53 20 % ≤ C < 25 %: T+; R26-36/37/38-40-42/43 7 % ≤ C < 20 %: T+; R26-40-42/43 1 % ≤ C < 7 %: T; R23-40-42/43 0,1 % ≤ C < 1 %: Xn; R20-42	
615-008-00-5	isocianato di 3-isocianatometil-3,5,5-trimetylcicloesile		223-861-6	4098-71-9	T; R23 Xi; R36/37/38 R42/43 N; R51-53	T; N R: 23-36/37/38-42/43-51/53 S: (1/2-)26-28-38-45-61	C ≥ 25 %: T, N; R23-36/37/38-42/43-51/53 20 % ≤ C < 25 %: T; R23-36/37/38-42/43-52/53 2,5 % ≤ C < 20 %: T; R23-42/43-52/53 2 % ≤ C < 2,5 %: T; R23-42/43 0,5 % ≤ C < 2 %: Xn; R20-42/43	2
615-015-00-3	tiocianatoacetato di 1,7,7-trimetilbicyclo(2,2,1)ept-2-ile		204-081-5	115-31-1	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)24/25-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
616-015-00-6	alacoloro (ISO) 2-cloro-2',6'-dietil-N-(metossi- metil)acetanilide		240-110-8	15972-60-8	Carc. Cat. 3; R40 Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-43-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61	C ≥ 25 %: Xn, N; R22-40-43-50-53 1 % ≤ C < 25 %: Xn, N; R40-43-50-53 0,25 % ≤ C < 1 %: N; R50-53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51-53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52-53	
616-024-00-5	2-(4,4-dimetil-2,5-diossoosazo- lidin-1-il)-2-cloro-5-(2-(2,4-di- terz-pentilfenossi)butirrammido)- 4,4-dimetil-3-ossovaleranilide		402-260-4	—	R53	R: 53 S: 61		
617-002-00-8	α,α-dimetilbenzil idroperossido cumene idroperossido		201-254-7	80-15-9	O; R7 T; R23 Xn; R21/22-48/20/22 C; R34 N; R51-53	O; T; N R: 7-21/22-23-34-48/ 20/22-51/53 S: (1/2-)3/7-14-36/37/ 39-45-50-61	C ≥ 25 %: T, N; R21/22-23-34-48/20/22- 51/53 10 % ≤ C < 25 %: C; R20-34-48/20/22- 52/53 3 % ≤ C < 10 %: Xn; R20-37/38-41-52/53 2,5 % ≤ C < 3 %: Xi; R36/37-52/53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R36/37	
617-004-00-9	idroperossido di 1,2,3,4-tetraid- dro-1-naftile		212-230-0	771-29-9	O; R7 Xn; R22 C; R34 N; R50-53	O; C; N R: 7-22-34-50/53 S: (1/2-)3/7-14-26-36/ 37/39-45-60-61	C ≥ 25 %: C, N; R22-34-50/53 10 % ≤ C < 25 %: C, N; R34-51/53 5 % ≤ C < 10 %: Xi, N; R36/37/38-51/53 2,5 % ≤ C < 5 %: N; R51/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: R52/53	
648-043-00-X	olio di creosoto, frazione acenaft- tene, privo di acenaftene olio lavaggio gas ridistillato [Olio che rimane dopo la rimo- zione dell'acenaftene per mezzo di un processo di cristallizza- zione dall'olio di acenaftene dal catrame di carbone. Costituito prevalentemente da naftalene ed alchilnaftaleni.]	H	292-606-9	90640-85-0	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
648-080-00-1	residui (catrame di carbone), distillazione di olio di creosoto Olio lavaggio gas ridistillato [Residuo dalla distillazione frazionata di olio di lavaggio con punto di ebollizione nell'intervallo 270 °C-330 °C ca. È costituito prevalentemente da idrocarburi aromatici diciclici ed eterociclici.]	H	295-506-3	92061-93-3	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
648-098-00-X	olio di creosoto, frazione acenaf-tene Olio lavaggio gas [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta dalla distillazione di catrame di carbone e con punto di ebollizione nell'intervallo 240 °C-280 °C ca. Costituita prevalentemente da acenaf-tene, naftalene ed alchil naftalene.]	H	292-605-3	90640-84-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
648-099-00-5	olio di creosoto [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuti dalla distillazione di catrame di carbon fossile. È costituita prevalentemente da idrocarburi aromatici e può contenere quantità apprezzabili di acidi di catrame e basi di catrame. Distilla nell'intervallo 200 °C-325 °C ca.]	H	263-047-8	61789-28-4	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
648-100-00-9	olio di creosoto, distillato altobollente Olio lavaggio gas [Taglio di distillazione altobollente ottenuto dalla carbonizzazione ad alta temperatura di carbone bituminoso che viene ulteriormente raffinato per separare i sali cristallini in eccesso. È costituito principalmente da olio di creosoto da cui sono stati separati alcuni dei sali aromatici polinucleari normali che compongono i distillati di catrame di carbone. È privo di cristalli alla temperatura di 5 °C ca.]	H	274-565-9	70321-79-8	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
648-101-00-4	creosoto [Distillato di catrame di carbone prodotto mediante distillazione ad altra temperatura del carbone bituminoso. È costituito principalmente da idrocarburi aromatici, acidi di catrame e basi di catrame.]	H	232-287-5	8001-58-9	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
648-102-00-X	residui estratti (carbone), olio acido di creosoto Olio lavaggio gas lavato [Combinazione complessa di idrocarburi proveniente dalla frazione priva di basi dalla distillazione di catrame di carbone, con punto di ebollizione nell'intervallo 250 °C-280 °C ca. È costituito prevalentemente da bifenile e dimetilnaftaleni isomeri.]	H	310-189-4	122384-77-4	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
648-138-00-6	olio de cresoto, distillato basso-bollente Olio lavaggio gas [Il taglio di distillazione basso-bollente ottenuto dalla carbonizzazione ad alta temperatura di carbone bituminoso che viene ulteriormente raffinato per separare i sali cristallini in eccesso. È costituito principalmente da olio di cresoto da cui sono stati separati alcuni dei sali aromatici polinucleari normali che compongono i distillati del catrame di carbone. È privo di cristalli alla temperatura di 38 °C ca.]	H	274-566-4	70321-80-1	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-001-00-3	estratti (petrolio), frazione naftenica leggera distillata con solvente	H	265-102-1	64742-03-6	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-002-00-9	estratti (petrolio), frazione paraffinica pesante distillata con solvente	H	265-103-7	64742-04-7	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-003-00-4	estratti (petrolio), frazione paraffinica leggera distillata con solvente	H	265-104-2	64742-05-8	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-004-00-X	estratti (petrolio), distillato naftenico pesante da solvente	H	265-111-0	64742-11-6	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-005-00-5	estratti (petrolio), solvente gasolio leggero sotto vuoto	H	295-341-7	91995-78-7	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		
649-006-00-0	idrocarburi, C ₂₆₋₅₅ , ricchi di aromatici	H	307-753-7	97722-04-8	Carc. Cat. 2; R45	T R: 45 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-062-00-6	gas (petrolio), nafta crackizzata cataliticamente, frazioni di testa del depropanizzatore, ricchi di C ₃ privi di acido Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal frazionamento di idrocarburi crackizzati cataliticamente e trattati per separare le impurezze acide. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₂ -C ₄ , prevalentemente C ₃ .]	H K	270-755-0	68477-73-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-063-00-1	gas (petrolio), dall'impianto di cracking catalitico Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti derivanti da un processo di cracking catalitico. È costituita prevalentemente da idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	270-756-6	68477-74-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-064-00-7	gas (petrolio), da impianto di cracking catalitico, ricchi di C _{1,5} Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti da un processo di cracking catalitico. È costituita da idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁ -C ₆ , prevalentemente C ₁ -C ₅ .]	H K	270-757-1	68477-75-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-065-00-2	gas (petrolio), frazione di testa stabilizzatore nafta polimerizzata cataliticamente, ricchi di C ₂₋₄ . Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione-frazionamento di nafta polimerizzata cataliticamente. È costituita da idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₂ -C ₆ , prevalentemente C ₂ -C ₄ .]	H K	270-758-7	68477-76-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-066-00-8	gas (petrolio), impianto di reforming catalitico, ricchi di C ₁₋₄ . Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti da un processo di reforming catalitico. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁ -C ₆ , prevalentemente C ₁ -C ₄ .]	H K	270-760-8	68477-79-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-067-00-3	gas (petrolio), C ₃₋₅ , carica di alchilazione olefinica-paraffinica Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi olefinici e paraffinici con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₃ -C ₅ usati come carica di alchilazione. Le temperature ambienti sono di norma superiori alla temperatura critica di queste combinazioni.]	H K	270-765-5	68477-83-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-068-00-9	gas (petrolio), ricchi di C ₄ Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti da un processo di frazionamento catalitico. È costituita da idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₃ -C ₅ , prevalentemente C ₄ .]	H K	270-767-6	68477-85-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-069-00-4	gas (petrolio), frazioni di testa del deetanizzatore Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla distillazione delle frazioni di gas e di benzina provenienti dal processo di cracking catalitico. Contiene prevalentemente etano ed etilene.]	H K	270-768-1	68477-86-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-070-00-X	gas (petrolio), frazioni di testa della colonna del deisobutanizzatore Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione atmosferica di una corrente di butano-butilene. È costituita da idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₃ -C ₄ .]	H K	270-769-7	68477-87-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-071-00-5	gas (petrolio), secchi dal depropanizzatore, ricchi di propilene Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuti per distillazione di prodotti provenienti dalle frazioni di gas e di benzina di un processo di cracking catalitico. È costituita prevalentemente da propilene con un poco di etano e propano.]	H K	270-772-3	68477-90-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-072-00-0	gas (petrolio), frazioni di testa del depropanizzatore Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti dalle frazioni di gas e benzina di un processo di cracking catalitico. È costituita da idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₂ -C ₄ .]	H K	270-773-9	68477-91-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-073-00-6	gas (petrolio), frazioni di testa depropanizzatore impianto recupero gas Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per frazionamento di una miscelanea di correnti idrocarburiche. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁ -C ₄ , prevalentemente propano.]	H K	270-777-0	68477-94-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-074-00-1	gas (petrolio), alimentazione impianto Girbatol Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi utilizzata come carica di alimentazione dell'impianto Girbatol per la separazione dell'acido solfidrico. È costituita da idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₂ -C ₄ .]	H K	270-778-6	68477-95-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-075-00-7	gas (petrolio), frazionati di benzina pesante isomerizzata, arricchiti in C ₄ , esenti da idrogeno solforato Gas di petrolio	H K	270-782-8	68477-99-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-076-00-2	gas di coda (petrolio), da torre di riflusso frazionamento olio purificato di cracking catalitico e residuo sotto vuoto di cracking termico Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal frazionamento di olio purificato crackizzato cataliticamente e di residuo sotto vuoto crackizzato termicamente. È costituito prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ C ₆ .]	H K	270-802-5	68478-21-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-077-00-8	gas di coda (petrolio), assorbitore di stabilizzazione nafta crackizzata cataliticamente Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione di nafta crackizzata cataliticamente. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	270-803-0	68478-22-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-078-00-3	gas di coda (petrolio), dai processi di cracking e reforming catalitico e dal frazionatore combinato con l'idrodesolforatore Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal frazionamento di prodotti del cracking catalitico, del reforming catalitico e dei processi di idrodesolforazione, trattata per eliminarne le impurezze acide. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ C ₅ .]	H K	270-804-6	68478-24-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-079-00-9	gas di coda (petrolio), dalla stabilizzazione per frazionamento di nafta riformata cataliticamente Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione per frazionamento di nafta riformata cataliticamente. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	270-806-7	68478-26-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-080-00-4	gas di coda (petrolio), corrente mista impianto di gas saturo, ricco di C ₄ Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione frazionata di nafta ottenuta per via diretta, gas di coda di distillazione e gas di coda stabilizzatore da nafta riformata cataliticamente. È costituita da idrocarburi aventi numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₃ -C ₆ , prevalentemente butano e isobutano.]	H K	270-813-5	68478-32-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-081-00-X	gas di coda (petrolio), impianto di ricupero di gas saturo, ricco di C ₁₋₂ Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuti dal frazionamento di gas di coda distillato, nafta ottenuta per via diretta, gas di coda stabilizzatore da nafta riformata cataliticamente. È costituita prevalentemente da idrocarburi aventi numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁₋₅ , prevalentemente metano e etano.]	H K	270-814-0	68478-33-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-082-00-5	gas di coda (petrolio), dall'impianto di cracking termico di residui sotto vuoto Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal cracking termico di residui sotto vuoto. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	270-815-6	68478-34-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-083-00-0	idrocarburi, ricchi di C ₃₋₄ , distillato di petrolio Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta per distillazione e condensazione di petrolio grezzo. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₃ -C ₅ , prevalentemente C ₃ -C ₄ .]	H K	270-990-9	68512-91-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-084-00-6	gas (petrolio), dall'apparecchio di deesizzazione di nafta di prima distillazione, gamma completa di frazioni Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per frazionamento di nafta di prima distillazione +full range;. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₂ - C ₆ .]	H K	271-000-8	68513-15-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-085-00-1	gas (petrolio), dal depropanizzatore di idrocracking, ricchi di idrocarburi Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti da un processo di idrocracking. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ . Può anche contenere piccole quantità di idrogeno e idrogeno solforato.]	H K	271-001-3	68513-16-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-086-00-7	gas (petrolio), dalla stabilizzazione frazioni leggere di nafta di prima distillazione Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per stabilizzazione di tagli leggeri di nafta di prima distillazione. È costituita da idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₂ -C ₆ .]	H K	271-002-9	68513-17-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-087-00-2	residui (petrolio), splitter di alchilazione, ricchi di C ₄ Gas di petrolio [Residuo complesso della distillazione di correnti provenienti da varie operazioni di raffineria. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₄ -C ₅ , prevalentemente butano, e punto di ebollizione nell'intervallo -11,7 °C a 27,8 °C ca.]	H K	271-010-2	68513-66-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-088-00-8	idrocarburi, C ₁₋₄ Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta mediante cracking termico e operazioni di assorbimento e con la distillazione di petrolio grezzo. È costituita da idrocarburi con numero di atomi carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ C ₄ e con punto di ebollizione nell'intervallo -164 °C a -0,5 °C ca.]	H K	271-032-2	68514-31-8	Carc. Cat 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-089-00-3	idrocarburi, C ₁₋₄ , addolciti Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta sottoponendo gas idrocarburici a un processo di addolcimento per convertire i mercaptani o per eliminare le impurezze acide. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ e punto di ebollizione nell'intervallo da -164 °C a -0,5 °C ca.]	H K	271-038-5	68514-36-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-090-00-9	idrocarburi, C ₁₋₃ Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₃ e con punto di ebollizione nell'intervallo -164 °C a -42 °C ca.]	H K	271-259-7	68527-16-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-091-00-4	idrocarburi, C ₁₋₄ , frazione debutanizzatore Gas di petrolio	H K	271-261-8	68527-19-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-092-00-X	gas (petrolio), C ₁₋₅ , umidi Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta per distillazione di petrolio grezzo e/o cracking di gasolio di colonna. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	271-624-0	68602-83-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-093-00-5	idrocarburi, C ₂₋₄ Gas di petrolio	H K	271-734-9	68606-25-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-094-00-0	idrocarburi, C ₃ Gas di petrolio	H K	271-735-4	68606-26-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-095-00-6	gas (petrolio), carica di alchilazione Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta mediante cracking catalitico di gasolio. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₃ -C ₄ .]	H K	271-737-5	68606-27-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-096-00-1	gas (petrolio), dal frazionamento di residui del depropanizzatore Gas di petrolio [Combinazione complessa ottenuta dal frazionamento dei residui del depropanizzatore. È costituita prevalentemente da butano, isobutano e butadiene.]	H K	271-742-2	68606-34-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-097-00-7	gas (petrolio), miscela di raffineria Gas di petrolio [Combinazione complessa ottenuta da vari di raffineria. È costituita da idrogeno, idrogeno solforato e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ C ₅ .]	H K	272-183-7	68783-07-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-098-00-2	gas (petrolio), da cracking catalitico Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti da un processo di cracking catalitico. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₃ -C ₅ .]	H K	272-203-4	68783-64-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-099-00-8	gas (petrolio), C ₂₋₄ , addolciti Gas petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta sottoponendo un distillato di petrolio ad un processo di addolcimento per convertire i mercaptani o eliminare impurezze acide. È costituita prevalentemente da idrocarburi saturi e insaturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₂ -C ₄ e punto di ebollizione nell'intervallo da -51 °C a -34 °C ca.]	H K	272-205-5	68783-65-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-100-00-1	gas (petrolio), dal frazionamento del grezzo Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta con il frazionamento del petrolio grezzo. È costituita da idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	272-871-7	68918-99-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-101-00-7	gas (petrolio), dal deesanzizzatore Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta con il frazionamento di correnti combinate di nafta. È costituita da idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	272-872-2	68919-00-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-102-00-2	gas (petrolio), da apparecchio stabilizzatore per frazionamento di benzina leggera di prima distillazione Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per frazionamento di benzina leggera di prima distillazione. È costituita da idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	272-878-5	68919-05-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-103-00-8	gas (petrolio), da stripper di desolforazione +unifining di nafta Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta con il processo unifining di desolforazione della nafta e ottenuta per stripping dalla nafta prodotta. È costituita da idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	272-879-0	68919-06-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-104-00-3	gas (petrolio), da reforming catalitico di nafta di prima distillazione Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal reforming catalitico di nafta di prima distillazione e dal frazionamento dell'effluente totale. È costituita da metano, etano e propano.]	H K	272-882-7	68919-09-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-105-00-9	gas (petrolio), frazioni di testa di splitter di cracking catalitico fluidizzato Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta per frazionamento della carica alimentata allo splitter C ₃ -C ₄ . È costituita prevalentemente da idrocarburi C ₃ .]	H K	272-893-7	68919-20-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-106-00-4	gas (petrolio), dallo stabilizzatore di prima distillazione Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal frazionamento del liquido proveniente dalla prima torre usata nella distillazione del grezzo. È costituita da idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	272-883-2	68919-10-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-107-00-X	gas (petrolio), da debutanizzatore di nafta crackizzata cataliticamente Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal frazionamento nafta crackizzata cataliticamente. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	273-169-3	68952-76-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-108-00-5	gas di coda (petrolio), da stabilizzatore di nafta e distillato crackizzati cataliticamente Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta da frazionamento di distillato e nafta crackizzati cataliticamente. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	273-170-9	68952-77-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-109-00-0	gas di coda (petrolio), da assorbitore di nafta, gasolio e distillato crackizzati termicamente Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla separazione di distillati, nafta e gasolio crackizzati termicamente. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	273-175-6	68952-81-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-110-00-6	gas di coda (petrolio), da stabilizzazione per frazionamento di idrocarburi crackizzati termicamente, coking del petrolio Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione per frazionamento di idrocarburi crackizzati termicamente provenienti dal processo di coking del petrolio. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	273-176-1	68952-82-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-111-00-1	gas (petrolio), da frazioni leggere di cracking con vapore, concentrati in butadiene Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti di cracking termico. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente di C ₄ .]	H K	273-265-5	68955-28-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-112-00-7	gas (petrolio), nafta di prima distillazione, frazione di testa stabilizzatore reforming catalitico Gas di petrolio [Combinazione complessa ottenuta con il reforming catalitico di nafta di prima distillazione e frazionamento dell'effluente globale. È costituita da idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₂ -C ₄ .]	H K	273-270-2	68955-34-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-113-00-2	idrocarburi C ₄ Gas di petrolio	H K	289-339-5	87741-01-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-114-00-8	alcani C ₁₋₄ , ricchi di C ₃ Gas di petrolio	H K	292-456-4	90622-55-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-115-00-3	gas (petrolio), cracker a vapore ricchi di C ₃ Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi prodotti della distillazione di prodotti da un processo di cracking con vapore. È costituita prevalentemente da propilene con del propano e con punto di ebollizione nell'intervallo da -70 °C a 0 °C ca.]	H K	295-404-9	92045-22-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-116-00-9	idrocarburi, C ₄ , distillato da cracker a vapore Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta dalla distillazione dei prodotti di un processo di cracking con vapore. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio pari a C ₄ , prevalentemente 1-butene e 2-butene, contiene inoltre butano ed isobutene ed ha un punto di ebollizione nell'intervallo da -12 °C a 5 °C ca.]	H K	295-405-4	92045-23-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-117-00-4	gas di petrolio, liquefatti, addolciti, frazione C ₄ Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta sottoponendo una miscela di gas di petrolio liquefatti ad un processo di addolcimento per ossidare i mercaptani o per eliminare le impurezze acide. E costituita prevalentemente da idrocarburi C ₄ saturi ed insaturi.]	HKS	295-463-0	92045-80-2	F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	F+; T R: 12-45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-119-00-5	raffinati (petrolio), frazione C ₄ crackizzata con vapore dell'estrazione con ammonio acetato di rame, C _{3,5} e C _{3,5} insaturi, privi di butadiene Gas di petrolio	H K	307-769-4	97722-19-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-120-00-0	gas (petrolio), carica sistema amminico Gas di raffineria [Il gas di alimentazione del sistema amminico di eliminazione dell'idrogeno solforato. È costituito da idrogeno. Possono anche essere presenti ossido di carbonio, anidride carbonica, componenti naturali dell'aria e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	270-746-1	68477-65-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-121-00-6	gas (petrolio), dall'idrodesolfatore dell'impianto benzene Gas di raffineria [Gas prodotti dall'impianto benzene, costituiti principalmente da idrogeno. Possono anche essere presenti ossido di carbonio e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ , compreso il benzene.]	H K	270-747-7	68477-66-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-122-00-1	gas (petrolio), riciclo dall'impianto benzene, ricchi di idrogeno Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta riciclando i gas dell'impianto benzene. È costituita principalmente da idrogeno con varie piccole quantità di ossido di carbonio e idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	270-748-2	68477-67-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-123-00-7	gas (petrolio), da olio di miscela, ricco in idrogeno-azoto Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di un olio di miscela. È costituita principalmente da idrogeno e azoto con varie piccole quantità di ossido di carbonio, anidride carbonica e idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	270-749-8	68477-68-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-124-00-2	gas (petrolio), nafta dal reforming catalitico, teste dello strip-per Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione di nafta riformata cataliticamente. È costituita da idrogeno e idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	270-759-2	68477-77-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-125-00-8	gas (petrolio), C ₆₋₈ , riciclo di reforming catalitico Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti dal reforming catalitico di una carica C ₆₋₈ e riciclata per recuperare l'idrogeno. È costituita principalmente da idrogeno. Può anche contenere varie piccole quantità di ossido di carbonio, anidride carbonica, azoto e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C _{1-C₆} .]	H K	270-761-3	68477-80-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-126-00-3	gas (petrolio), C ₆₋₈ , da reforming catalitico Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti dal reforming catalitico di una carica C ₆₋₈ . È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C _{1-C₅} e da idrogeno.]	H K	270-762-9	68477-81-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-127-00-9	gas (petrolio), riciclo reformer catalitico di C ₆₋₈ , arricchiti in idrogeno Gas di raffineria	H K	270-763-4	68477-82-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-128-00-4	gas (petrolio), corrente di ritorno C ₂ Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per estrazione di idrogeno da una corrente gassosa costituita principalmente da idrogeno con piccole quantità di azoto, ossido di carbonio, metano, etano ed etilene. Contiene prevalentemente idrocarburi quali metano, etano ed etilene, con piccole quantità di idrogeno, azoto e ossido di carbonio.]	H K	270-766-0	68477-84-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-129-00-X	gas (petrolio), secchi leggermente acidi, dall'impianto di concentrazione gas Gas di raffineria [Combinazione complessa di gas secchi provenienti dall'impianto di concentrazione gas. È costituita da idrogeno, idrogeno solforato e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ C ₃ .]	H K	270-774-4	68477-92-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-130-00-5	gas (petrolio), distillazione riassorbitore concentrazione gas Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti da correnti gassose combinate in un riassorbitore di concentrazione gas. È costituita prevalentemente da idrogeno, ossido di carbonio, anidride carbonica, azoto, acido solfidrico e idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁ -C ₃ .]	H K	270-776-5	68477-93-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-131-00-0	gas (petrolio), da assorbitore idrogeno Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta per assorbimento di idrogeno da una corrente ricca di idrogeno. È costituita da idrogeno, ossido di carbonio, azoto e metano, con piccole quantità di idrocarburi C ₂ .]	H K	270-779-1	68477-96-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-132-00-6	gas (petrolio), ricchi di idrogeno Gas di raffineria [Combinazione complessa separata in forma di gas da gas idrocarburi mediante raffreddamento. È costituita principalmente da idrogeno con varie piccole quantità di ossido di carbonio, azoto, metano e idrocarburi C ₂ .]	H K	270-780-7	68477-97-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-133-00-1	gas (petrolio), riciclo olio di miscela idrotreatato, ricchi di idrogeno-azoto Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta da olio di miscela idrotreatato riciclato. È costituita principalmente da idrogeno e azoto con varie piccole quantità di ossido di carbonio, anidride carbonica e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	270-781-2	68477-98-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-134-00-7	gas (petrolio), riciclo, ricchi di idrogeno Gas de raffineria [Combinazione complessa ottenuta da gas di reattore riciclati. È costituita principalmente da idrogeno con varie piccole quantità di ossido di carbonio, anidride carbonica, azoto, idrogeno solforato e idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	270-783-3	68478-00-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-135-00-2	gas (petrolio), condizionamento impianto reforming, ricchi di idrogeno Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta dagli apparecchi di reforming. È costituita principalmente da idrogeno con varie piccole quantità di ossido di carbonio e idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	270-784-9	68478-01-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-136-00-8	gas (petrolio), idrotrattamento, reforming Gas de raffineria [Combinazione complessa ottenuta dal processo di idrotrattamento-reforming. È costituita principalmente da idrogeno, metano ed etano con varie piccole quantità di acido solfidrico e idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₃ -C ₅ .]	H K	270-785-4	68478-02-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-137-00-3	gas (petrolio), idrotrattamento-reforming, ricchi di idrogeno-metano Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta dal processo di idrotrattamento-reforming. È costituita principalmente da idrogeno e metano con varie piccole quantità di ossido di carbonio, anidride carbonica, azoto e idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₂ -C ₅]	H K	270-787-5	68478-03-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-138-00-9	gas (petrolio), condizionamento impianto idrotrattamento-reforming, ricchi di idrogeno Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta dal processo di idrotrattamento-reforming. È costituita principalmente da idrogeno con varie piccole quantità di ossido di carbonio e idrocarburi alifatici con numero di atomi nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	270-788-0	68478-04-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-139-00-4	gas (petrolio), distillazione da cracking termico Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta per distillazione di prodotti provenienti da un processo di cracking termico. È costituita da idrogeno, idrogeno solforato, ossido di carbonio, anidride carbonica e idrocarburi con numero di atomi di carbonio, prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	270-789-6	68478-05-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-140-00-X	gas di coda (petrolio), dall'assorbitore di rifrazione dell'apparecchiatura di cracking catalitico Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal rifrazione dei prodotti di un processo di cracking catalitico. È costituita da idrogeno e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₃ .]	H K	270-805-1	68478-25-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-141-00-5	gas di coda (petrolio), separatore nafta riformata cataliticamente Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi dal reforming catalitico di nafta di prima distillazione. È costituita da idrogeno e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	270-807-2	68478-27-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-142-00-0	gas di coda (petrolio), stabilizzatore nafta riformata cataliticamente Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione di nafta riformata cataliticamente. È costituita da idrogeno e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	270-808-8	68478-28-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-143-00-6	gas di coda (petrolio), separatore di idrotattamento del distillato crackizzato Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta trattando con idrogeno in presenza di un catalizzatore, distillati crackizzati. È costituita da idrogeno e idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	270-809-3	68478-29-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-144-00-1	gas di coda (petrolio), separatore nafta di prima distillazione idrodesolforata Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per idrodesolforazione di nafta di prima distillazione. È costituita da idrogeno e idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	270-810-9	68478-30-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-145-00-7	gas (petrolio), tagli di testa nafta di prima distillazione sottoposta a reforming catalitico Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal reforming catalitico di nafta di prima distillazione, seguito da frazionamento dell'effluente totale. È costituita da idrogeno, metano, etano e propano.]	H K	270-999-8	68513-14-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-146-00-2	gas (petrolio), dal flashing ad alta pressione dell'effluente del reforming Gas di raffineria [Combinazione complessa prodotta mediante flashing ad alta pressione dell'effluente del reattore di reforming. È costituita principalmente da idrogeno, con varie piccole quantità di metano, etano e propano.]	H K	271-003-4	68513-18-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-147-00-8	gas (petrolio), dal flashing a bassa pressione dell'effluente del reforming Gas di raffineria [Combinazione complessa prodotta mediante flashing a bassa pressione dell'effluente del reattore di reforming. È costituita principalmente da idrogeno, con varie piccole quantità di metano, etano e propano.]	H K	271-005-5	68513-19-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-148-00-3	gas (petrolio), da distillazione gas di raffineria di petrolio Gas di raffineria [Combinazione complessa separata per distillazione di una corrente di gas contenente idrogeno, ossido di carbonio, anidride carbonica e idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁ -C ₆ o ottenuta per cracking di etano e propano. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₂ , idrogeno, azoto e ossido di carbonio.]	H K	271-258-1	68527-15-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-149-00-9	gas (petrolio), frazioni di testa del depentanizzatore di idrotrattamento dell'unità benzene Gas di raffineria [Combinazione complessa prodotta per trattamento della carica proveniente dall'unità benzene con idrogeno in presenza di un catalizzatore, seguito da depentanizzazione. È costituita principalmente da idrogeno, etano e propano con varie piccole quantità di azoto, ossido di carbonio, anidride carbonica e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ . Può contenere tracce di benzene.]	H K	271-623-5	68602-82-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-150-00-4	gas (petrolio), da assorbitore secondario, frazionamento frazioni di testa cracking catalitico fluidizzato Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta per frazionamento di prodotti di testa provenienti dal processo di cracking catalitico nell'impianto di cracking catalitico fluidizzato. È costituito da idrogeno, azoto e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₃ .]	H K	271-625-6	68602-84-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-151-00-X	prodotti del petrolio gas di raffineria Gas di raffineria [Combinazione complessa costituita principalmente da idrogeno con varie piccole quantità di metano, etano e propano.]	H K	271-750-6	68607-11-4	Car. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-152-00-5	gas (petrolio), hydrocracking, dal separatore a basse pressione Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta mediante separazione liquido-vapore dell'effluente del reattore del processo di hydrocracking. È costituita prevalentemente da idrogeno e idrocarburi saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₃ .]	H K	272-182-1	68783-06-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-153-00-0	gas (petrolio), di raffineria Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta da varie operazioni di raffinazione del petrolio. È costituita da idrogeno e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₃ .]	H K	272-338-9	68814-67-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-154-00-6	gas (petrolio), dal separatore di prodotti di platforming Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta dal reforming chimico dei nafteni a composti aromatici. È costituita da idrogeno e idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₂ -C ₄ .]	H K	272-343-6	68814-90-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-155-00-1	gas (petrolio), dalla stabilizzazione in depentanizzatore di cherosene «sour» idrotrattato Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta dalla stabilizzazione in depentanizzatore di cherosene idrotrattato. È costituita principalmente da idrogeno, metano, etano e propano con varie piccole quantità di azoto, idrogeno solforato, monossido di carbonio e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₄ -C ₅ .]	H K	272-775-5	68911-58-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-156-00-7	gas (petrolio), da «flash drum» di cherosene «sour» idrotrattato Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta dal «flash drum»; dell'unità di trattamento di cherosene «sour»; con idrogeno in presenza di un catalizzatore. È costituita principalmente da idrogeno e metano con varie piccole quantità di azoto, ossido di carbonio e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₂ -C ₅ .]	H K	272-776-0	68911-59-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-157-00-2	gas (petrolio), distillato, dallo stripper del processo di desolfurazione «unifining» Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta per stripping dal prodotto liquido del processo di desolfurazione «unifining». È costituita da idrogeno solforato, metano, etano e propano.]	H K	272-873-8	68919-01-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-158-00-8	gas (petrolio), dal frazionamento del cracking catalitico fluidizzato Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta per frazionamento del prodotto di testa del processo di cracking catalitico fluidizzato. È costituita da idrogeno, idrogeno solforato, azoto, e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	272-874-3	68919-02-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-159-00-3	gas (petrolio), da assorbitore secondario di scrubbing dell'impianto di cracking catalitico fluidizzato Gas di raffineria [Combinazione complessa prodotta con lo scrubbing del gas di testa proveniente dall'impianto di cracking catalitico fluidizzato. È costituita da idrogeno, azoto, metano, etano e propano.]	H K	272-875-9	68919-03-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-160-00-9	gas (petrolio), da stripper di desolforazione di idrotrattamento di distillato pesante Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta per stripping dal prodotto liquido del processo di desolforazione dell'idrotrattamento del distillato pesante. È costituita da idrogeno, idrogeno solforato e idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	272-876-4	68919-04-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-161-00-4	gas (petrolio), dallo stabilizzatore di platforming, frazionamento componenti leggeri Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta per frazionamento dei componenti leggeri dei reattori al platino dell'unità di platforming. È costituita da idrogeno, metano, etano e propano.]	H K	272-880-6	68919-07-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-162-00-X	gas (petrolio), dalla torre di «pre-flash», distillazione del grezzo Gas di raffineria [Combinazione complessa prodotta dalla prima torre usata per la distillazione del grezzo. È costituita da azoto e idrocarburi alifatici saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	272-881-1	68919-08-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-163-00-5	gas (petrolio), dallo stripper del catrame Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta per frazionamento di petrolio grezzo ridotto. È costituita da idrogeno e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	272-884-8	68919-11-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-164-00-0	gas (petrolio), dallo stripper «unifining» Gas di raffineria [Combinazione di idrogeno e metano ottenuta per frazionamento dei prodotti provenienti dall'impianto di.]	H K	272-885-3	68919-12-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-165-00-6	gas di coda (petrolio), da separatore di nafta idrodesolforata cataliticamente Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla idrodesolfurazione di nafta. È costituita da idrogeno, metano, etano e propano.]	H K	273-173-5	68952-79-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-166-00-1	gas di coda (petrolio), da idrodesolfatore di nafta di prima distillazione Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta dalla idrodesolfurazione di nafta di prima distillazione. È costituita da idrogeno e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	273-174-0	68952-80-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-167-00-7	gas (petrolio), da torre di assorbimento a spugna, frazionamento prodotti di testa impianti di cracking a letto fluido e desolforazione gasolio Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta con il frazionamento dei prodotti provenienti dall'impianto di cracking a letto fluido e dal desolforatore del gasolio. È costituita da idrogeno e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	273-269-7	68955-33-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-168-00-2	gas (petrolio), da distillazione e cracking catalitico del grezzo Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta per distillazione del grezzo e con processi di cracking catalitico. È costituita da idrogeno, idrogeno solforato, azoto, ossido di carbonio e idrocarburi paraffinici ed olefinici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	273-563-5	68989-88-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-169-00-8	gas (petrolio), scarico di scrubber di gasolio a dietanolamina Gas di raffineria [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta dalla desolforazione di gasolii con dietanolamina. È costituita da idrogeno solforato, idrogeno ed idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	295-397-2	92045-15-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-170-00-3	gas (petrolio), effluente da idrodesolforazione di gasolio Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta per separazione della fase liquida dall'effluente dalla reazione di idrogenazione. È costituita da idrogeno, idrogeno solforato ed idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₃ .]	H K	295-398-8	92045-16-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-171-00-9	gas (petrolio), spurgo dell'idrodesolforazione del gasolio Gas di raffineria [Combinazione complessa di gas ottenuta dal reformer e dallo spurgo del reattore di idrogenazione. È costituita prevalentemente da idrogeno ed idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	295-399-3	92045-17-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-172-00-4	gas (petrolio), scarico da flash drum di effluente dell'idrogenatore Gas di raffineria [Combinazione complessa di gas ottenuta dal flash degli effluenti dopo la reazione di idrogenazione. È costituita prevalentemente da idrogeno ed idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	295-400-7	92045-18-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-173-00-X	gas (petrolio), residui di cracking con vapore ad alta pressione di nafta Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta come miscela delle parti non condensabili dal prodotto di un processo di cracking con vapore di nafta oltre ai gas residui ottenuti durante la preparazione dei prodotti susseguenti. È costituita prevalentemente da idrogeno ed idrocarburi paraffinici ed olefinici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ con cui può trovarsi miscelato anche del gas naturale.]	H K	295-401-2	92045-19-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-174-00-5	gas (petrolio), residuo visbreaking Gas di raffineria [Combinazione complessa ottenuta dalla riduzione di viscosità dei residui in una fornace. È costituita prevalentemente da idrogeno solforato ed idrocarburi paraffinici ed olefinici con un numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	295-402-8	92045-20-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-177-00-1	gas (petrolio), C ₃₋₄ Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti dal cracking del grezzo. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₃ -C ₄ , prevalentemente propano e propilene, e punto di ebollizione nell'intervallo da -51 °C a -1 °C ca.]	H K	268-629-5	68131-75-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-178-00-7	gas di coda (petrolio), distillato crackizzato cataliticamente e nafta crackizzata cataliticamente, colonna di frazionamento ad assorbimento. Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi della distillazione dei prodotti provenienti dal cracking catalitico di distillati e di nafta. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	269-617-2	68307-98-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-179-00-2	gas di coda (petrolio), nafta di polimerizzazione catalitica, stabilizzante di frazionamento Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dai prodotti di stabilizzazione del frazionamento provenienti dalla polimerizzazione della nafta. È costituita principalmente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	269-618-8	68307-99-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-180-00-8	gas di coda (petrolio), nafta riformata cataliticamente, stabilizzante di frazionamento, privi di idrogeno solforato Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione mediante frazionamento di nafta riformata cataliticamente e dalla quale è stato eliminato l'idrogeno solforato mediante trattamento con ammina. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	269-619-3	68308-00-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-181-00-3	gas di coda (petrolio), distillato crackizzato, stripper di hydro-treating Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta trattando con idrogeno in presenza di un catalizzatore distillati crackizzati termicamente. È costituita prevalentemente da idrocarburi saturi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	269-620-9	68308-01-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-182-00-9	gas di coda (petrolio), distillato di prima distillazione dall'idrodesolforatore, privo di idrogeno solforato Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla idrodesolforazione catalitica di frazioni di prima distillazione e dalla quale è stato separato l'idrogeno solforato mediante trattamento con ammina. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	269-630-3	68308-10-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-183-00-4	gas di coda (petrolio), cracking catalitico di gasolio, torre di assorbimento. Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla distillazione di prodotti del cracking catalitico del gasolio. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	269-623-5	68308-03-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-184-00-X	gas di coda (petrolio), impianto di recupero gas Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla distillazione di prodotti provenienti da correnti di idrocarburi eterogenei. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	269-624-0	68308-04-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-185-00-5	gas di coda (petrolio), impianto di recupero gas, deetanizzatore Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla distillazione di prodotti provenienti da correnti di idrocarburi eterogeni. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	269-625-6	68308-05-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-186-00-0	gas di coda (petrolio), distillato idrodesolfurato e nafta idrodesolforata dal frazionatore, privi di acidi Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal frazionamento di nafta idrodesolforata e correnti idrocarburiche di distillato, trattata per eliminare le impurezze acide. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₅ .]	H K	269-626-1	68308-06-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-187-00-6	gas di coda (petrolio), idrodesolfurato dall'impianto di stripping del gasolio, privi di idrogeno solforato Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione per stripping di gasolio sotto vuoto idrodesolfurato cataliticamente e da cui è stato eliminato l'idrogeno solforato mediante trattamento con ammina. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	269-627-7	68308-07-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-188-00-1	gas di coda (petrolio), nafta di prima distillazione dallo stabilizzatore, privi di idrogeno solforato Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione per frazionamento di bafta di prima distillazione e da cui è stato separato l'idrogeno solforato mediante trattamento con ammina. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ C ₅ .]	H K	269-629-8	68308-09-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-189-00-7	gas di coda (petrolio), alchilazione propano-propilene, preparazione carica deetanizzatore Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla distillazione dei prodotti di reazione del propano con il propilene. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	269-631-9	68308-11-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-190-00-2	gas di coda (petrolio), gasolio sotto vuoto dall'idrodesolfatore, privi di idrogeno solforato Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla idrodesolforazione catalitica di gasolio sotto vuoto e dalla quale è stato separato l'idrogeno solforato mediante trattamento con ammina. È costituita prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₁ -C ₆ .]	H K	269-632-4	68308-12-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-191-00-8	gas (petrolio), frazioni di testa crackizzate cataliticamente Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti dal processo di cracking catalitico. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₃ -C ₅ e punto di ebollizione nell'intervallo da -48 °C a 32 °C ca.]	H K	270-071-2	68409-99-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-193-00-9	alcani, C _{1,2} Gas di petrolio	H K	270-651-5	68475-57-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-194-00-4	alcani, C _{2,3} Gas di petrolio	H K	270-652-0	68475-58-1	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-195-00-X	alcani, C _{3,4} Gas di petrolio	H K	270-653-6	68475-59-2	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-196-00-5	alcani, C ₄₋₅ Gas di petrolio	H K	270-654-1	68475-60-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-197-00-0	gas combustibili Gas di petrolio [Combinazione di gas leggeri. È costituita prevalentemente da idrogeno e/o idrocarburi a basso peso molecolare.]	H K	270-667-2	68476-26-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-198-00-6	gas combustibili, distillati di petrolio grezzo Gas di petrolio [Combinazione complessa di gas leggeri prodotti per distillazione di petrolio grezzo e reforming catalitico di nafta. È costituita da idrogeno e idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ C ₄ e punto di ebollizione nell'intervallo da -217 °C a -12 °C.]	H K	270-670-9	68476-29-9	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-199-00-1	idrocarburi, C _{3,4} Gas di petrolio	H K	270-681-9	68476-40-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-200-00-5	idrocarburi, C _{4,5} Gas di petrolio	H K	270-682-4	68476-42-6	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-201-00-0	idrocarburi, C _{2,4} , arricchiti in C ₃ Gas di petrolio	H K	270-689-2	68476-49-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-202-00-6	gas di petrolio, liquefatti Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta per distillazione del grezzo. E costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₃ -C ₇ e punto di ebollizione nell'intervallo da - 40 °C a 80 °C ca.]	HKS	270-704-2	68476-85-7	F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	F+; T R: 12-45-46 S: 53-45		
649-203-00-1	gas di petrolio, liquefatti, addolciti Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta sottoponendo una miscela di gas di petrolio liquefatti a un processo di addolcimento per la conversione dei mercaptani o per l'eliminazione delle impurezze acide. E costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₃ -C ₇ e punto di ebollizione nell'intervallo da - 40 °C a 80 °C ca.]	HKS	270-705-8	68476-86-8	F+; R12 Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	F+; T R: 12-45-46 S: 45-53		
649-204-00-7	gas (petrolio), C _{3,4} , ricchi di isobutano Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla distillazione di idrocarburi saturi e insaturi, solitamente con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₃ -C ₆ , prevalentemente butano e isobutano. È costituita da idrocarburi saturi e insaturi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C _{3,4} , prevalentemente isobutano.]	H K	270-724-1	68477-33-8	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-205-00-2	distillati (petrolio), C ₃₋₆ , ricchi di piperilene Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla distillazione di idrocarburi alifatici saturi e insaturi, solitamente con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₃ -C ₆ . È costituita da idrocarburi saturi e insaturi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₃ -C ₆ , prevalentemente piperileni.]	H K	270-726-2	68477-35-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-206-00-8	gas (petrolio), frazioni di testa dello splitter del butano Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla distillazione della corrente di butano. È costituita da idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₃ -C ₄ .]	H K	270-750-3	68477-69-0	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-207-00-3	gas (petrolio), C _{2,3} Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta per distillazione di prodotti provenienti da processi di frazionamento catalitico. Contiene prevalentemente etano, etilene, propano e propilene.]	H K	270-751-9	68477-70-3	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-208-00-9	gas (petrolio), da gasolio di cracking catalitico, frazioni di fondo del depropanizzatore, ricchi di C ₄ privi di acido Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dal frazionamento di una corrente idrocarburica di gasolio crackizzata cataliticamente e trattata per eliminare l'idrogeno solforato e altri componenti acidi. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio nell'intervallo C ₃ -C ₅ , prevalentemente C ₄ .]	H K	270-752-4	68477-71-4	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-209-00-4	gas (petrolio), nafta crackizzata cataliticamente, frazioni di fondo del debutanizzatore, ricchi di C ₃₋₅ Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione di nafta di cracking catalitico. È costituita da idrocarburi alifatici con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₃ -C ₅ .]	H K	270-754-5	68477-72-5	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		
649-210-00-X	gas di coda (petrolio), nafta isomerizzata dallo stabilizzatore di frazionamento Gas di petrolio [Combinazione complessa di idrocarburi ottenuta dalla stabilizzazione per frazionamento di prodotti di isomerizzazione di nafta. È costituito prevalentemente da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₁ -C ₄ .]	H K	269-628-2	68308-08-7	Carc. Cat. 1; R45 Muta. Cat. 2; R46	T R: 45-46 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
649-224-00-6	combustibili, diesel Gasolio - non specificato [Combinazione complessa di idrocarburi prodotta per distillazione di petrolio grezzo. È costituita da idrocarburi con numero di atomi di carbonio prevalentemente nell'intervallo C ₉ -C ₂₀ e punto di ebollizione nell'intervallo 163 °C - 357 °C ca.]	H N	269-822-7	68334-30-5	Carc. Cat. 3; R40	Xn R: 40 S: (2-)36/37»		

ALLEGATO 1C

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
«005-009-00-3	butiltrifenilborato di tetrabuttilammonio		418-080-4	120307-06-4	R 43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-56-61		
005-010-00-9	tetrakis(pentafluorofenil)borato di N,N-dimetilanilino		422-050-6	118612-00-3	Carc.Cat.3; R40 Xn; R22 Xi; R38-41	Xn R: 22-38-40-41 S: (2-)22-26-36/37/39		
005-012-00-X	Butiltrifenilborato(1-) di dietil{4-[1,5,5-tris(4-dietilamminofenil)-penta-2,4-dieniliden]cicloesa-2,5-dienilidene}ammonio		418-070-1	141714-54-7	R 43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
011-007-00-3	propossicarbazone-sodico		—	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61	$C \geq 2,5\%$: N; R50/53 $0,25\% \leq C < 2,5\%$: N; R51/53 $0,025 \leq C < 0,25\%$: R52/53	
013-009-00-X	sodio ((n-butil)x(etil)y-1,5-diidro)alluminato), dove $x = 0,5$ e $y = 1,5$		418-720-2	—	F; R11 R14/15 R 17 Xn; R20 C; R35	F; C R: 11-14/15-17-20-35 S: (1/2-)6-16-26-30-36/37/39-43-45		
014-026-00-5	dicloro-(3-(3-cloro-4-fluorofenil)propil)metilsilano		407-180-3	—	C; R35	C R: 35 S: (1/2-)26-36/37/39-45		
014-027-00-0	cloro(3-(3-cloro-4-fluorofenil)propil)dimetilsilano		410-270-5	—	C; R35	C R: 35 S: (1/2-)8-26-28-36/37/39-45		
014-028-00-6	α -[3-(1-ossoprop-2-enil)-1-ossi-propil]dimetossisilossi- ω -[3-(1-ossoprop-2-enil)-1-ossi-propil]dimetossisilil poli(dimetilsilossano)		415-290-8	—	R 43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
014-029-00-1	O,O'-(etenilmetilsililene)di[(4-metilpentan-2-one)ossima]		421-870-1	—	Repr.Cat.3; R62 Xn; R22-48/22	Xn R: 22-48/22-62 S: (2-)36/37		
014-030-00-7	[(dimetilsililene)bis((1,2,3,3a,7a-η)-1H-inden-1-ilidene)dimetil]afnio		422-060-0	137390-08-0	T+; R28	T+ R: 28 S: (1/2-)6-22-28-36/37-45		
014-031-00-2	bis(1-metiletil)-dimetossisilano		421-540-7	18230-61-0	R 10 Xi; R38 R43 R 52-53	Xi R: 10-38-43-52/53 S: (2-)24-37-61		
014-032-00-8	diciclopentildimetossisilano		404-370-8	126990-35-0	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
015-180-00-6	sale di (-)-cinconidina (1:1) dell'acido [R-(R*,S*)]-[[2-metil-1-(1-ossopropossi)propossi]- (4-fenilbutil)fosfinil] acetico		415-820-8	137590-32-0	Xi; R41 R 43 R 52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
015-181-00-1	fosfina		232-260-8	7803-51-2	F+; R12 R17 T+; R26 C; R34 N; R50	F+; T+; N R: 12-17-26-34-50 S: (1/2-)28-36/37-45-61-63		
015-184-00-8	sali di glifosato, esclusi quelli espressamente indicati in questo Allegato		—	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
015-186-00-9	Clorpirifos- metile		227-011-5	5598-13-0	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)36/37-60-61	C ≥ 1 %: N; R43-50-53 0,0025 % ≤ C < 1 %: N; R50-53 0,00025 % ≤ C < 0,0025 %: N; R51-53 0,000025 % ≤ C < 0,00025 %: R52-53	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
015-187-00-4	Miscela di: (((2-idrossietil)immino)bis(metilene))bisfosfonato tetrasodico, N-ossido; ((tetraidro-2-idrossi-4H-1,2,4-ossazafosforin-4-il)-metil)fosfonato trisodico, N-ossido, P-ossido		417-540-1	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
015-189-00-5	fenil bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fosfina ossido		423-340-5	162881-26-7	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61		
016-086-00-8	10-ammino-6,13-dicloro-3-(3-(4-(2,5-disolfonatoanilino)-6-fluoro-1,3,5-triazin-2-ilammino)-prop-3-ilammino)-5,12-diossa-7,14-diazapentacen-4,11-disolfonato di tetrasodio		402-590-9	109125-56-6	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
016-087-00-3	Miscela di: bisesafluorofosfato di tiobis(4,1-fenilene)-S,S',S'-tetrafenildisolfonio esafluorofosfato di difenil(4-feniltiofenil)solfonio propylene carbonate		403-490-8	74227-35-3	Xi; R36 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 36-43-50/53 S: (2-)24-26-37-60-61		
016-088-00-9	acido 4-(bis(4-(dietilammino)fenil)metil)benzen-1,2-dimetano-solfonico		407-280-7	71297-11-5	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
016-089-00-4	Miscela di esteri di 5,5',6,6',7,7'-esaidrossi-3,3,3',3'-tetrametil-1,1'-spirobiindano e 2-diazo-1,2-diidro-1-osso-5-solfonaf-talene		413-840-1	—	E; R2 F; R11 R 53	E R: 2-11-53 S: (2-)33-35-40-61		
016-090-00-X	4-metil-N-(metilsolfonil)benzen-solfonammide		415-040-8	14653-91-9	Xn; R22 Xi; R37-41	Xn R: 22-37-41 S: (2-)26-39		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
016-091-00-5	1-ammino-9,10-diidro-9,10-diosso-4-(2,4,6-trimetilanilinio)-antracen-2-solfonato di C12-14-terz-alchilammonio		414-110-5	—	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
016-093-00-6	Miscela (2:1) di: tris(6-diazo-5,6-diidro-5-ossognaftalen-1-solfonato) di 4-(7-idrossi-2,4,4-trimetil-2-cromanil)resorcinol-4-ile bis(6-diazo-5,6-diidro-5-ossognaftalen-1-solfonato) di 4-(7-idrossi-2,4,4-trimetil-2-cromanil)resorcinolo		414-770-4	140698-96-0	F; R11 Carc.Cat.3; R40	F; Xn R: 11-40 S: (2-)7-36/37		
016-095-00-7	Miscela di: prodotto di reazione di 4,4'-metilenebis[2-(4-idrossibenzi)-3,6-dimetilfenolo] e 6-diazo-5,6-diidro-5-osso-naftalenesolfonato (1:2) Prodotto di reazione di 4,4'-metilenebis[2-(4-idrossibenzi)-3,6-dimetilfenolo] e 6-diazo-5,6-diidro-5-osso-naftalenesolfonato (1:3)		417-980-4	—	F; R11 Carc.Cat.3; R40	F; Xn R: 11-40 S: (2-)7-36/37		
016-096-00-2	thifensulfuron-metile		—	79277-27-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
017-015-00-3	(2-(amminometil)fenil) acetilcloruro cloridrato		417-410-4	61807-67-8	Xn; R22 C; R35 R43	C R: 22-35-43 S: (1/2-)26-36/37/39-45		
017-016-00-9	cloruro di metiltrifenilfosfonio		418-400-2	1031-15-8	Xn; R21/22 Xi; R38-41 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-38-41-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
017-017-00-4	Cloruro di (Z)-13-docosenil-N,N-bis(2-idrossietil)-N-metilammonio		426-210-6	120086-58-0	C; R34 N; R50-53	C; N R: 34-50/53 S: (2-)26-36/37/39-45-60-61		
017-018-00-X	cloruro di N,N,N-trimetil-2,3-bis(stearoilossi)propilammonio		405-660-7	—	N;R51-53	N R: 51/53 S: 61		
017-019-00-5	idrocloreuro di (R)-1,2,3,4-tetraidro-6,7-dimetossi-1-veratriliso-chinolina		415-110-8	54417-53-7	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61		
017-020-00-0	etilpropossiluminocloruro		421-790-7	—	C; R35 F; R14/15	C; F R: 14/15-35 S: (1/2-)16-23-26-30-36/37/39-43-45		
017-021-00-6	cloruro di behenammidopropil-dimetil-(diidrossipropil) ammonio		423-420-1	136920-10-0	Xi; R41 R43 N; R50-53	Xi; N R: 41-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-60-61		
020-003-00-0	Miscela di: (bis(2-idrossi-5-tetra-propenilfenilmetil)metilammina)-diidrossido dicalcico (tris(2-idrossi-5-tetra-propenilfenilmetil)metilammina)tri-idrossido tri-calcico ((2-idrossi-5-tetra-propenil-fenilmetil)metilammina)idrossido policalcico		420-470-4	—	Xi; R36/38 R43	Xi R: 36/38-43 S: (2-)24-26-37		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
024-019-00-9	Componente principale: anilide dell'acido acetacetico / 3-ammino-1-idrossibenzene (ATAN-MAP): {6-[(2 o 3 o 4)-ammino-(4 o 5 o 6)-idrossifenilazo]-5'-(fenilsolfammoil)-3-solfonatonaftalen-2-azobenzen-1,2'-diolato}-{6"-[1-(fenilcarbammoil)etilazo]-5'''-(fenilsolfammoil)-3'''-solfonatonaftalen-2"-azobenzen-1",2'''-diolato} cromato(III) trisodico sottoprodotto 1: anilide dell'acido acetacetico / anilide dell'acido acetacetico (ATAN-ATAN): bis{6-[1-(fenilcarbammoil)etilazo]-5'-(fenilsolfonil)-3-solfonatonaftalen-2-azobenzen-1,2'-diolato} cromato(III) trisodico sottoprodotto 2: 3-ammino-1-idrossibenzene / 3-ammino-1-idrossibenzene (MAP-MAP): bis{6-[(2 o 3 o 4)-ammino-(4 o 5 o 6)-idrossifenilazo]-5'-(fenilsolfammoil)-3-solfonatonaftalen-2-azobenzen-1,2'-diolato} cromato(III) trisodico		419-230-1	—	R 43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
024-020-00-4	bis[(3'-nitro-5'-solfonato(6-ammino-2-[4-(2-idrossi-1-naftilazo)fenilsolfonilammino]pirimidin-5-azo)benzen-2',4-diolato)]-cromato(III) trisodico		418-220-4	—	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
025-005-00-5	Miscela di: [29H, 31H-ftalocianina-C,C,C-trisolfonato (6-)-N29,N30,N31,N32] manganato(3-) trisodico [29H,31H-ftalocianina-C,C,C,C-tetrasolfonato(6-)-N29,N30,N31,N32] manganato (3-) tetrasodico [29H,31H-ftalocianina-C,C,C,C-pentasolfonato (6-)-N29,N30,N31,N32] manganato(3-) pentasodico		417-660-4	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
029-012-00-4	((N-(3-trimetilammoniopropil)-solfamoil)metilsolfonatoftalocianinato)rame(II) di sodio		407-340-2	124719-24-0	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
029-013-00-X	(2-(α-(3-(4-cloro-6-(2-(2-(vinilsolfonil)etossi)etilammino)-1,3,5-triazin-2-ilammino)-2-ossido-5-solfonatofenilazo)benzilidenidrazino)-4-solfonato)benzoato)rame(II) di trisodio		407-580-8	130201-51-3	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)24-37-61		
030-011-00-6	bis(ortofosfato) di trizinc		231-944-3	7779-90-0	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
030-013-00-7	ossido di zinco		215-222-5	1314-13-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
034-003-00-3	sodio selenuro		233-267-9	10102-18-8	T+; R28 T; R23 R31 R43 N; R51-53	T+; N R: 23-28-31-43-51/53 S: (1/2-)28-36/37-45-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
053-005-00-5	tetrachis (4-(1-metiletil)fenil)-(4-metilfenil)iodonio (pentafluorofenil)borato (1-)		422-960-3	178233-72-2	Xn; R21/22-48/22 N; R50-53	Xn; N R: 21/22-48/22-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
601-056-00-4	Miscela di isomeri di: metildifenilmetano dimetildifenilmetano		405-470-4	—	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)37-60-61		
601-057-00-X	Tosilato di N-dodecil-[3-(4-dimetilammino)benzammido]-propil]-dimetilammonio		421-130-8	156679-41-3	Xi; R41 R43 N; R50-53	Xi; N R: 41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		
601-058-00-5	di-L-para-mentene		417-870-6	—	Xi; R38 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)23-24-37-60-61		
601-059-00-0	2-benziliden-3-ossobutirrato di metile		420-940-9	15768-07-7	Xi; R36/38 N; R51-53	Xi; N R: 36/38-51/53 S: (2-)26-37/39-61		
601-060-00-6	1,2-bis[4-fluoro-6-{4-solfo-5-(2-(4-solfonafalen-3-ilazo)-1-idrossi-3,6-disolfo-8-amminonafalen-7-ilazo)fenilammino}-1,3,5-triazin-2-il-ammino]etano; sali di x-sodio e y-potassio, dove x = 7,755 e y = 0,245		417-610-1	155522-09-1	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
601-061-00-1	(etil-1,2-etandiil)[-2-[[[(2-idrossietil)metilammino]acetil]-propil]ω-(nonilfenossi)poli]ossi-(metil-1,2-etandiil)		418-960-8	—	C; R34 R 43 N; R51-53	C; N R: 34-43-51/53 S: (1/2-)26-28-36/37/39-45-61		
601-062-00-7	Miscela di: triacontano ramificato dotriacontano ramificato tetracontano ramificato esatriacontano ramificato		417-030-9	151006-59-6	R 53	R: 53 S: 61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
601-063-00-2	Miscela di isomeri di tetracosano ramificato		417-060-2	151006-61-0	Xn; R20 R53	Xn R: 20-53 S: (2-)61		
601-064-00-8	esatriacontano ramificato		417-070-7	151006-62-1	R53	R: 53 S: 61		
601-065-00-3	Miscela di: (1'- α ,3'- α ,6'- α -2,2,3',7',7'-pentametilspiro(1,3-diossan-5,2'-norcarano) (1' α ,3' β ,6' α)-2,2,3',7',7'-pentametilspiro(1,3-diossan-5,2'-norcarano)		416-930-9	—	Xn; R48/22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 41-48/22-51/53 S: (2-)22-26-37/39-61		
601-066-00-9	1-(4-(trans-4-epitilcicloesil)fenil)etano		426-820-2	78531-60-9	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
601-067-00-4	arseniato trietilico		427-700-2	15606-95-8	Carc.Cat.1; R45 T; R23/25 N; R50-53	T; N R: 45-23/25-50/53 S: 53-45-60-61		
601-068-00-X	1,2-diacetossibut-3-ene		421-720-5	18085-02-4	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)		
601-069-00-5	bromuro di 2-etil-1-(2-(1,3-diossanil)etil)-piridinio		422-680-1	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
601-071-00-6	1-dimetossimetil-2-nitro-benzene		423-830-9	20627-73-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
601-073-00-7	1-bromo-3,5-difluorobenzene		416-710-2	461-96-1	R10 Xn; R22-48/22 Xi; R38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 10-22-38-43-48/22-50/53 S: (2-)24-36/37-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
601-074-00-2	Miscela di: 4-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)-1-metil-2-ossabicyclo[2.2.2]ottano 1-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)-5-metil-6-ossabicyclo[3.2.1]ottano spiro[cicloes-3-en-1-il-(4,5,6,6a-tetraidro-3,6',6',6'a-tetrametil)-1,3'(3'aH)-[2H]ciclopenta[b]furano] spiro[cicloes-3-en-1-il-(4,5,6,6A-tetraidro-4,6',6',6'A-tetrametil)-1,3'(3'AH)-[2H]ciclopenta[B]]furano]		422-040-1	—	Xi; R36/38 N; R51-53	Xi; N R: 36/38-51/53 S: (2-)26-37-61		
602-093-00-9	$\alpha,\alpha,\alpha,4$ -tetraclorotoluene <i>p</i> -clorobenzotricloruro	E	226-009-1	5216-25-1	Carc.Cat.2; R45 Repr.Cat.3; R62 T; R48/23 Xn; R21/22 Xi; R37/38	T R: 45-21/22-37/38-48/ 23-62 S: 53-45		
602-094-00-4	Difeniletero, ottabromoderivato		251-087-9	32536-52-0	Repr.Cat.2; R61 Repr.Cat.3; R62	T R: 61-62 S: 53-45		
602-096-00-5	verde malachite, cloridrato; C.I. Basic Green 4 [1] verde malachite, ossalato [2]		209-322-8 [1] 219-441-7 [2]	569-64-2 [1] 18015-76-4 [2]	Xn; R22 Xi; R41 Repr. Cat. 3; R63 N; R50-53	Xn; N R: 22-41-63-50/53 S: (2-)26-36/37-39-46-60-61		
602-097-00-0	1-bromo-9-(4,4,5,5,5-pentafluoropentiltio)nonano		422-850-5	148757-89-5	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
603-167-00-3	3,3',5,5'-tetra-terz-butilbifenil-2,2'-diolo		407-920-5	6390-69-8	R 53	R: 53 S: 61		
603-168-00-9	3-(2-etilesilossi)propan-1,2-diolo		408-080-2	70445-33-9	Xi; R41 R 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
603-169-00-4	(+/-)-trans-4-(4-fluorofenil)-3-idrossimetil-N-metilpiperidina		415-550-0	109887-53-8	Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)22-26-39-61		
603-170-00-X	Miscela di: 2-metil-1-(6-metilbicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)pent-1-en-3-olo 2-metil-1-(1-metilbicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)-pent-1-en-3-olo 2-metil-1-(5-metilbicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-il)pent-1-en-3-olo		415-990-3	67739-11-1	Xi; R36 N; R51-53	Xi; N R: 36-51/53 S: (2-)26-61		
603-171-00-5	5-thiazolylmethanol		414-780-9	38585-74-9	Xi; R41 R 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		
603-172-00-0	trans-butenedioato di mono-2-[2-(4-dibenzo[b,f][1,4]tiazepin-11-il)piperazinium-1-il]etossi)etanolo		415-180-1	—	Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)22-26-39-61		
603-173-00-6	4,4-dimetil-3,5,8-triossabiciclo[5.1.0]ottano		421-750-9	57280-22-5	Xi; R36 R 43	Xi R: 36-43 S: (2-)26-36/37		
603-174-00-1	4-cicloesil-2-metil-2-butanolo		420-630-3	83926-73-2	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
603-175-00-7	2-(2-esilossietossi)etanolo DEGHE Dietilenglicol monoetero 3,6-diossa-1-decanolo esilcarbitolo		203-988-3	112-59-4	Xn; R21 Xi; R41	Xn R: 21-41 S: (2-)26-36/37-46		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
603-176-00-2	1,2-bis(2-metossietossi)etano TEGDME trietilenglicol dimetiletere triglyme		203-977-3	112-49-2	R19 Repr. Cat.2; R61 Repr. Cat.3; R62	T R: 61-19-62 S: 53-45		
603-177-00-8	1-etossipropan-2-olo 2PG1EE 1-etossi-2-propanolo propilene glicol monoetiletere [1] 2-etossi-1-metiletil acetato 2PG1EEA [2]		216-374-5 [1] 259-370-9 [2]	1569-02-4 [1] 54839-24-6 [2]	R10 R67	R: 10-67 S: (2-)24		
603-178-00-3	2-esilossietanolo etilenglicol monoesiletere n-esilglicol		203-951-1	112-25-4	Xn R21/22 C; R34	C R: 21/22-34 S: (1/2-)26-36/37/39-45		
603-179-00-9	ergocalciferolo		200-014-9	50-14-6	T+; R26 T; R24/25-48/25	T+ R: 24/25-26-48/25 S: (1/2-)28-36/37-45		
603-180-00-4	colecalfiferolo		200-673-2	67-97-0	T+; R26 T; R24/25-48/25	T+ R: 24/25-26-48/25 S: (1/2-)28-36/37-45		
603-181-00-X	terz-butilmetil etere MTBE 2-metossi-2-metilpropano		216-653-1	1634-04-4	F; R11 Xi; R38	F; Xi R: 11-38 S: (2-)9-16-24		
603-183-00-0	2-[2-(2-butossietossi)etossi]etanol TEGBE trietilene glicol monobutil etere butossitrietilen glicol		205-592-6	143-22-6	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39-46	C ≥ 30 %: Xi; R41 20 % ≤ C < 30 %: Xi; R36	

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
603-184-00-6	2-(idrossimetil)-2-[[2-idrossi-3-(isoottadecilossi)propossi]metil]-1,3-propandiolo		416-380-1	146925-83-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
603-185-00-1	2,4-dicloro-3-etil-6-nitrofenolo		420-740-1	99817-36-4	T; R25 Xi; R41 R43 N; R50-53	T; N R: 25-41-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
603-186-00-7	trans-(5RS,6SR)-6-ammino-2,2-dimetil-1,3-diossepan-5-olo		419-050-3	79944-37-9	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24/25-26-37		
603-187-00-2	dicloruro di 2-((4,6-bis(4-(2-(1-metilpiridinio-4-il)vinil)fenilammino)-1,3,5-triazin-2-il)(2-idrossietil)ammino)etanolo		419-360-9	163661-77-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
603-189-00-3	Miscela di complessi di: titanio, 2,2'-ossidietanolo, lattato d'ammonio, nitrilotris(2-propanolo) e glicol etilenico		405-250-8	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
603-191-00-4	2-(4,6-bis(2,4-dimetilfenil)-1,3,5-triazin-2-il)-5-(3-((2-etilesil)ossi)-2-idrossipropossi)fenolo		419-740-4	137658-79-8	R53	R: 53 S: 61		
603-195-00-6	2-[4-(4-metossifenil)-6-fenil-1,3,5-triazin-2-il]-fenolo		430-810-3	154825-62-4	R52-53	R: 52/53 S: 61		
603-196-00-1	2-(7-etil-1H-indol-3-il)etanolo		431-020-1	41340-36-7	Xn; 22-48/22 N; R51-53	Xn; N R: 22-48/22-51/53 S: (2-)36/37/39-61		
603-197-00-7	1-(4-clorofenil)-4,4-dimetil-3-(1,2,4-triazol-1-ilmetil)pentan-3-olo		403-640-2	107534-96-3	Repr.Cat.3; R63 Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53-63 S: (2-)22-36/37-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
603-199-00-8	etoxazol		—	153233-91-1	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61	C ≥ 0.25 %: N; R50/53 0.025 % ≤ C < 0.25 %: N; R51/53 0.0025 % ≤ C < 0.025 %: R52/53	
604-065-00-1	4,4',4''-(1-metilpropan-1-il-3-ili-dene)tris(2-cicloesil-5-metilfenol)		407-460-5	111850-25-0	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
604-066-00-7	Miscela di: 6-(1,1-dimetiletil)-4-tetrapropil-2-[(2-idrossi-5-tetrapropilfenil)metil-fenolo (composto C41) e 2,2'-bis[6-(1,1-dimetiletil-etil)-1-idrossi-4-tetrapropilfenil-metano (composto C45) 2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-tetrapropil-fenolo e 2-(1,1-dimetiletil)-4-tetrapropil-fenolo 2,6-bis[(6-(1,1-dimetiletil)-1-idrossi-4-tetrapropilfenil)metil]-4-(tetrapropil)fenolo e 2-[(6-(1,1-dimetiletil)-1-idrossi-4-tetrapropilfenil)metil]-6-[1-idrossi-4-tetrapropilfenil)metil]-4-(tetrapropil)-fenolo		414-550-8	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
604-067-00-2	Miscela di: 2,2'-[[[2-idrossietil]immino]bis(metilene)bis[4-dodecilfenolo] formaldeide, oligomero con 4-dodecil fenolo e 2-amminoetanolo (n = 2) formaldeide, oligomero con 4-dodecil fenolo e 2-amminoetanolo (n = 3, 4 e superiore)		414-520-4	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-37/39-60-61		
604-068-00-8	(+/-)-4-[2-[[3-(4-idrossifenil)-1-metilpropil]ammino]-1-idrossietil]fenolo idrocloruro		415-170-5	99095-19-9	Xn; R20/22 R 43	Xn R: 20/22-43 S: (2-)24-26-37		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
604-069-00-3	2-(1-metilpropil)-4-terz-butilfenolo		421-740-4	51390-14-8	C; R34 N; R51-53	C; N R: 34-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
604-070-00-9	triclosano		222-182-2	3380-34-5	Xi; R36/38 N; R50-53	Xi; N R: 36/38-50/53 S: 26-39-46-60-61	C ≥ 20 %: Xi, N; R36/38-50/53 0,25 % ≤ C < 20 %: N; R50/53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: N; R51/53 0,0025 % ≤ C < 0,025 %: R52/53	
605-031-00-9	Miscela di: 2,2-dimetossietanale (Questo componente è considerato anidro in termini di identità, struttura e composizione. Comunque, il 2,2-dimetossietanale esiste in forma idrata. 60 % anidro equivale a 70,4 % idrato) acqua (includere acqua libera e l'acqua del 2,2-dimetossietanale idrato)		421-890-0	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
606-062-00-0	tetraidrotiopiran-3-carbossaldeide		407-330-8	61571-06-0	Repr.Cat.2; R61 Xi; R41 R 52-53	T R: 61-41-52/53 S: 53-45-61		
606-063-00-6	(E)-3-(2-clorofenil)-2-(4-fluorofenil)propenale		410-980-5	112704-51-5	Xi; R36 R 43	Xi R: 36-43 S: (2-)24-26-37		
606-064-00-1	pregn-5-en-3,20-dione bis(etilenechetale)		407-450-0	7093-55-2	R 53	R: 53 S: 61		
606-065-00-7	1-(4-morfolinofenil)butan-1-one		413-790-0	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-066-00-2	(E)-5[(4-clorofenil)metilene]-2,2-dimetilciclopentanone		410-440-9	131984-21-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
606-067-00-8	Miscela di: 1-(2,3,6,7,8,9-esaidro-1,1-dimetil-1H-benz(g)inden-4-il)etanone 1-(2,3,5,6,7,8-esaidro-1,1-dimetil-1H-benz(f)inden-4-il)etanone 1-(2,3,6,7,8,9-esaidro-1,1-dimetil-1H-benz(g)inden-5-il)etanone 1-(2,3,6,7,8,9-esaidro-3,3-dimetil-1H-benz(g)inden-5-il)etanone		414-870-8	96792-67-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-068-00-3	2,7,11-trimetil-13-(2,6,6-trimetilcicloes-1-en-1-il)tridecaesaen-2,4,6,8,10,12-ale		415-770-7	1638-05-7	Xn; R48/22 R 43 R 52-53	Xn R: 43-48/22-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
606-069-00-9	spiro[1,3-diossolano-2,5'-(4',4',8',8'-tetrametil-esaidro-3',9'-metanonaftalene)]		415-460-1	154171-77-4	N; R51-53	N R: 51/53 S: 24-61		
606-070-00-4	5-(3-butiril-2,4,6-trimetilfenil)-2-[1-(etossiimino)propil]-3-idrossicicloes-2-en-1-one		414-790-3	138164-12-2	Repr.Cat.3; R62-63 Xn; R22 Xi; R38 N; R50-53	Xn; N R: 22-38-62-63-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
606-071-00-X	17-spiro(5,5-dimetil-1,3-diossan-2-il)androsta-1,4-dien-3-one		421-050-3	13258-43-0	N; R50-53	N R: 50/53 S: 22-60-61		
606-072-00-5	3-acetil-1-fenil-pirrolidin-2,4-dione		421-600-2	719-86-8	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)22-36/37-61		
606-073-00-0	4,4'-bis(dimetilammino)benzofenone chetone di Michler		202-027-5	90-94-8	Carc.Cat.2; R45 Muta.Cat.3; R68 Xi; R41	T R: 45-41-68 S: 53-45		
606-075-00-1	1-benzil-5-etossiimidazolidin-2,4-dione		417-340-4	65855-02-9	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
606-076-00-7	1-((2-chinolinil-carbonil)ossi)-2,5-pirrolidindione		418-630-3	136465-99-1	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)24-26-37/39		
606-077-00-2	(3S,4S)-3-esil-4-[(R)-2-idrossitridecyl]-2-ossietanone		418-650-2	104872-06-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-078-00-8	1-ottilazepin-2-one		420-040-6	59227-88-2	C; R34 R 43 N; R51-53	C; N R: 34-43-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
606-079-00-3	2-n-butyl-benzo[d]isotiazol-3-one		420-590-7	—	C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
606-080-00-9	Prodotto di reazione di: 3-idrossi-5,7-di-terz-butylbenzofuran-2-one con o-xilene		417-100-9	—	R 53	R: 53 S: 61		
606-081-00-4	(3β, 5α, 6β)-3-(acetilossi)-5-bromo-6-idrossi-androstan-17-one		419-790-7	4229-69-0	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-36/37-61		
606-082-00-X	Miscela di: butan-2-onossima sin-O,O'-di(butan-2-onossima)-dietossisilano		406-930-7	96-29-7	T; R48/22 R43 R52-53	T R: 43-48/25-52/53 S: (1/2-)25-36/37-45-61		
606-083-00-5	2-cloro-5-sec-esadecilidrochione		407-750-1	—	Xi; R36/38 R43 R52-53	Xi R: 36/38-43-52/53 S: (2-)24-26-37-61		
606-084-00-0	1-(4-metossi-5-benzofuranil)-3-fenil-1,3-propandione		414-540-3	484-33-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-085-00-6	(1R,4S)-2-azabicyclo[2.2.1]ept-5-en-3-one		418-530-1	79200-56-9	Xn; R22 Xi; R41 R43	Xn R: 22-41-43 S: (2-)24-26-37/39		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
606-086-00-1	1-(3,3-dimetilcicloesile)pent-4-en-1-one		422-330-8	56973-87-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
606-087-00-7	6-etil-5-fluoro-4(3H)-pirimidone		422-460-5	137234-87-8	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)60-61		
606-088-00-2	2,4,4,7-tetrametil-6-otten-3-one		422-520-0	74338-72-0	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
606-089-00-8	Miscela di: 1,4-diammino-2-cloro-3-fenossiantrachinone 1,4-diammino-2,3-bis-fenossiantrachinone		423-220-2	12223-77-7	R53	R: 53 S: 61		
606-091-00-9	6-cloro-5-(2-cloroetil)-1,3-diidroindol-2-one		421-320-0	118289-55-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
606-092-00-4	Miscela di: (E)-ossacicloesadec-12-en-2-one (E)-ossacicloesadec-13-en-2-one a) (Z)-ossacicloesadec-(12)-en-2-one e b) (Z)-ossacicloesadec-(13)-en-2-one		422-320-3	111879-80-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-379-00-7	Miscela di: stearato di 2-[N-(2-idrossietil)stearamido]etile [bis[2-(stearoilossi)etil]ammino]-metilsolfonato di sodio [bis(2-idrossietil)ammino]metilsolfonato di sodio N,N-bis(2-idrossietil)stearamide		401-230-8	55349-70-7	R52-53	R: 52/53 S: 61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-380-00-2	Miscela di: 1,2-bis(esilossicarbonil)etansolfonato di ammonio 1-esilossicarbonil-2-ottilossicarboniletansolfonato di ammonio 2-esilossicarbonil-1-ottilossicarboniletansolfonato di ammonio		407-320-3	—	Xi; R38-41 R 52-53	Xi R: 38-41-52/53 S: (2-)26-37/39-61		
607-381-00-8	Miscela di triesteri di 2,2-bis (idrossimetil)butanolo con acido C7-alcanoico e acido 2-etilesanoico		413-710-4	—	R 53	R: 53 S: 61		
607-382-00-3	acido 2-((4-ammino-2-nitrofenil)ammino)benzoico		411-260-3	117907-43-4	Xi; R41 R 43 R 52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-383-00-9	Miscela di: esadecanoato di 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ile ottadecanoato di 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-4-ile		415-430-8	86403-32-9	Xi; R41 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		
607-384-00-4	Miscela di: esteri di alcoli C14-C15 ramificati con acido 3,5-di-t-butil-4-idrossifenil propionico 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-idrossibenzenpropanoato di alchile C15 ramificato e lineare 3,5-bis(1,1-dimetiletil)-4-idrossibenzenpropanoato di alchile C13 ramificato e lineare		413-750-2	171090-93-0	R 53	R: 53 S: 61		
607-385-00-X	Copolimero di alcol vinilico e acetato di vinile parzialmente acetilato con metilsolfato di 4-(2-(4-formilfenil)etenil)-1-metilpiridinio		414-590-6	125229-74-5	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-386-00-5	Miscela di: acido tetradecanoico (42.5-47.5 %) esteri di poli(1-7)lattato dell'acido tetradecanoico (52.5-57.5 %);		412-580-6	174591-51-6	Xi; R38-41 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		
607-387-00-0	Miscela di: acido dodecanoico (35-40 %) esteri di poli(1-7)lattato dell'acido dodecanoico (60-65 %);		412-590-0	58856-63-6	Xi; R38-41 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		
607-388-00-6	acido 4-etilammino-3-nitrobenzoico		412-090-2	2788-74-1	Xn; R22 R 43 R 52-53	Xn R: 22-43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
607-389-00-1	N,N-bis(carbossimetil)-3-ammino-2-idrossipropionato di trisodio		414-130-4	119710-96-2	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)22		
607-390-00-7	1,2,3,4-tetraidro-6-nitro-chinosalina		414-270-6	41959-35-7	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)22-61		
607-391-00-2	ciclopropan-1,1-dicarbossilato di dimetile		414-240-2	6914-71-2	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
607-392-00-8	2-fenossetil-4-((5-ciano-1,6-diidro-2-idrossi-1,4-dimetil-6-osso-3-piridinil)azo)benzoato		414-260-1	88938-37-8	R 53	R: 53 S: 61		
607-393-00-3	acido 3-(cis-1-propenil)-7-ammino-8-osso-5-tia-1-azabicyclo[4.2.0]ott-2-ene-2-carbossilico		415-750-8	106447-44-3	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-394-00-9	acido 5-metilpirazin-2-carbossilico		413-260-9	5521-55-1	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-395-00-4	Miscela di: sodio 1-tridecil-4-allil-(2 o 3)-solfobutandioato sodio 1-dodecil-4allil-(2 o 3)-solfobutandioato		410-230-7	—	C; R34 R 43 N; R51-53	C; N R: 34-43-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
607-396-00-X	2-(4-metossibenzilidene)malonato di bis(1,2,2,6,6-pentametil-4-piperidinile)		414-840-4	147783-69-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 22-60-61		
607-397-00-5	Miscela di: salicilati di calcio (alchilati con C10-14 e C18-30 ramificati) fenati di calcio (alchilati con C10-14 e C18-30 ramificati) fenati di calcio solforati (alchilati con C10-14 e C18-30 ramificati)		415-930-6	—	R 43	Xi R: 43 S: (2-)36/37		
607-398-00-0	N-(5-cloro-3-(4-(dietilammino)-2-metilfenilimino)-4-metil-6-osso-1,4-cicloesadienil)carbammato di etile		414-820-5	125630-94-6	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-399-00-6	3-metil-3-butenilepropanoato di 2,2-dimetile		415-610-6	104468-21-5	Xi; R38 R52-53	Xi R: 38-52/53 S: (2-)37-61		
607-400-00-X	metil-3-[[[dibutilammino]tiosso-metil]tio]propanoato		414-400-1	32750-89-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-401-00-5	3-idrossi-5-osso-3-cicloesene-1-carbossilato di etile		414-450-4	88805-65-6	Xi; R38-41 R 43	Xi R: 38-41-43 S: (2-)24-26-37/39		
607-402-00-0	N-(fenilossicarbonil)-L-valinato di metile		414-500-5	153441-77-1	R 52-53	R: 52/53 S: 61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-403-00-6	Miscela di: succinato di bis(1S,2S,4S)-(1-benzil-4-terz-butossicarbossammido-2-idrossi-5-fenil)pentilammonio alcol isopropilico		414-810-0	—	Xn; R48/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 41-48/22-50/53 S: (2-)22-26-36/39-60-61		
607-404-00-1	Miscela di: acido ((Z)-3,7-dimetil-2,6-ottadienil)ossicarbonilpropanoico butandioato di di-(E)-3,7-dimetil-2,6-ottadienile) butandioato di di-(Z)-3,7-dimetil-2,6-ottadienile) butandioato di (Z)-3,7-dimetil-2,6-ottadienile acido ((E)-3,7-dimetil-2,6-ottadienil)ossicarbonilpropanoico		415-190-4	—	R 43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-405-00-7	p-idrossibenzoato di 2-esildecile		415-380-7	148348-12-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-406-00-2	2,5-diclorobenzoato di potassio		415-700-5	—	Xn; R22 Xi; R41	Xn R: 22-41 S: (2-)26-39		
607-407-00-8	2-carbossi-3-(2-tienil)propionato di etile		415-680-8	143468-96-6	Xi; R38-41 R 43	Xi R: 38-41-43 S: (2-)24-26-37/39		
607-408-00-3	N-(4-fluorofenil)glicinato di potassio		415-710-1	—	Xn; R48/22 Xi; R41 R 43 R 52-53	Xn R: 41-43-48/22-52/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
607-409-00-9	Miscela di: acido(3R)-[1S-(1 α , 2 α , 6 β -((2S)-2-metil-1-ossobutossi)-8a.gamma.)esaidro-2,6-dimetil-1-naftalen]-3,5-diidrossieptanoico biomassa inerte da Aspergillus terreus		415-840-7	—	R 43 R 52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)36/37-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-410-00-4	2-(esadec-2-enil)butanodioato di mono[2-(dimetilammino)etil]-monoidrogeno e/o 3-(esadec-2-enil)butanodioato di mono[2-(dimetilammino)etil]monoidrogeno		415-880-5	—	Xi; R38-41 R 43 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		
607-411-00-X	4-metilbenzen-solfonato di (S)-ossiranmetanolo		417-210-7	70987-78-9	Carc.Cat.2; R45 Muta.Cat.3; R68 Xi; R41 R43 N; R51-53	T; N R: 45-41-43-51/53 S: 53-45-61		
607-412-00-5	2-(1-cianocicloesil)acetato di etile		415-970-4	133481-10-4	Xn; R22-48/22 R 52-53	Xn R: 22-48/22-52/53 S: (2-)36/37-61		
607-413-00-0	trans-4-fenil-L-prolina		416-020-1	96314-26-0	Repr.Cat.3; R62 R 43	Xn R: 43-62 S: (2-)22-36/37		
607-414-00-6	tris(2-etilesile)-4,4',4''-(1,3,5-triazin-2,4,6-triiltriimino)tribenzoato		402-070-1	88122-99-0	R53	R: 53 S: 61		
607-415-00-1	polimero-(metil metacrilato)-copolimero-(butilmetacrilato)-copolimero-(4-acrilossibutil-isopropenil-.alpha.,.alpha.-dimetilbenzil carbammato)-copolimero-(anidride maleica)		419-590-1	—	F; R11 R 43	F; Xi R: 11-43 S: (2-)24-37-43		
607-416-00-7	4-(2-carbossimetilto)etossi-1-idrossi-5-isobutilossicarbonilammino-N-(3-dodecilossipropil)-2-naftammide		420-730-7	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-418-00-8	4-amminobenzoato di 2-etilesile		420-170-3	26218-04-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-419-00-3	acido (3'-carbossimetil-5-(2-(3-etil-3H-benzotiazol-2-iliden)-1-metil-etiliden)-4,4'-diosso-2'-tiosso-(2,5')bitiazolidiniliden-3-il)- acetico		422-240-9	166596-68-5	Xi; R41 R 43	Xi R: 41-43 S: (2-)26-36/37/39		
607-420-00-9	acido 2,2-bis(idrossimetil)butanoico		424-090-1	10097-02-6	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		
607-421-00-4	cipermetrina cis/trans +/- 40/60 (IRS, 3RS;1RS, 3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropan-carbossilato di (RS)- α -ciano-3-fenossibenzile		257-842-9	52315-07-8	Xn; R20/22 Xi; R37 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-37-50/53 S: (2-)24-36/37/39-60-61		
607-422-00-X	α -cipermetrina		257-842-9	67375-30-8	T; R25 Xn; R48/22 Xi; R37 N; R50-53	T; N R: 25-37-48/22-50/53 S: (2-)36/37/39-45-60-61		
607-423-00-5	Esteri di mecoprop e di mecoprop-P		—	—	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)13-36/37-60-61		
607-424-00-0	trifloxistrobin (ISO) acido(R)-2-[(2,6-dimetilfenil)-metossiacetilamino]propionico-metil estere		—	141517-21-7	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-46-60-61		
607-425-00-6	metalaxil (ISO) metil N-(2,6-dimetilfenil)-N-(metoossiacetil)-DL-alaninato		260-979-7	57837-19-1	Xn; R22 R43 R52-53	Xn R: 22-43-52/53 S: (2-)13-24-37-46-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-426-00-1	Acido 1,2-benzendicarbossilico, dipentilestere, ramificato e lineare [1] n-pentil-isopentilftalato [2] di-n-pentil ftalato [3] diisopentilftalato [4]		284-032-2 [1] - [2] 205-017-9 [3] 210-088-4 [4]	84777-06-0 [1] - [2] 131-18-0 [3] 605-50-5 [4]	Repr. Cat. 2; R60-61 N; R50	T; N R: 60-61-50 S: 53-45-61		
607-427-00-7	bromoxinil eptanoato (ISO) 2,6-dibromo-4-cianofenil eptanoato		260-300-4	56634-95-8	Repr.Cat3; R63 Xn; R20/22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-43-63-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		
607-430-00-3	BBP benzil-butil-ftalato		201-622-7	85-68-7	Repr. Cat.2; R61 Repr. Cat.3; R62 N; R50-53	T; N R: 61-62-50/53 S: 53-45-60-61		
607-431-00-9	pralletrina ETOC 2-metil-4-osso-3-(prop-2-inil)ciclopent-2-en-1-il 2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil)ciclopropan-carbossilato		245-387-9	23031-36-9	T; R23 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 22-23-50/53 S: (1/2-)45-60-61		
607-432-00-4	S-metolaclor Miscela di (S)-2-cloro-N-(2-etil-6-metil-fenil)-N-(2-metossi-1-metil-etil)-acetammide (80-100 %) [1] S-metolaclor (R)-2-cloro-N-(2-etil-6-metil-fenil)-N-(2-metossi-1-metil-etil)-acetammide (0-20 %) [2]		- [1] - [2]	87392-12-9 [1] 178961-20-1 [2]	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-433-00-X	cipermetrina <i>cis/trans</i> +/- 80/20 (RS)- α -ciano-3-fenossibenzil (1RS; 3RS; 1RS, 3SR)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropancarbossilato		257-842-9	52315-07-8	Xn; R22 Xi; R37/38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-37/38-43-50/53 S: (2-)36/37/39-60-61		
607-434-00-5	mecoprop-P [1] e suoi sali (R)-2-(4-cloro-2-acido metilfenossi)propionico		240-539-0	16484-77-8	Xn; R22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-51/53 S: (2-)13-26-37/39-46-61		
607-435-00-0	2,2-diidrossiacetato di 2S-isopropil-5R-metil-1R-cicloesile		416-810-6	111969-64-3	Xn; R48/22 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 41-48/22-51/53 S: (2-)22-26-36/39-61		
607-436-00-6	2-idrossi-3-(2-etil-4-metilimidazol)neodecanoato di propile		417-350-9	—	Xi; R38-41 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-50/53 S: (2-)26-28-37/39-60-61		
607-437-00-1	acido 3-(4-amminofenil)-2-ciano-2-propenoico		417-480-6	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-438-00-7	metil-2-[(amminosolfonil)metil]-benzoato		419-010-5	—	Xn; R22 Xi; R36	Xn R: 22-36 S: (2-)22-26		
607-439-00-2	tetraidro-2-furancarbossilato di metile		420-670-1	37443-42-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-440-00-8	2-amminosolfonil-6-(trifluorometil)piridin-3-carbossilato di metile		421-220-7	144740-59-0	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61		
607-441-00-3	Acido 3-[3-(2-dodecilossi-5-metilfenilcarbammoil)-4-idrossi-1-naftil]propionico		421-490-6	167684-63-1	R53	R: 53 S: 57-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-442-00-9	acetato di benzile e [idrossi-(4-fenilbutil)fosfinile]		416-050-5	87460-09-1	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-36/39		
607-443-00-4	bis(2,4-di-terz-butil-6-metilfenil)etilfosfato		416-140-4	145650-60-8	R 53	R: 53 S: 61		
607-444-00-X	Miscela di: dibenzoato di cis-1,4-dimetilcicloesile dibenzoato di trans-1,4-dimetilcicloesile		416-230-3	35541-81-2	R 53	R: 53 S: 61		
607-445-00-5	tris(4-metilbensolfonato) di ferro (III)		420-960-8	77214-82-5	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)24-26-39		
607-446-00-0	2-[4-(2-cloro-4-nitrofenilazo)-3-(1-ossopropil)ammino]fenilamminopropionato di metile		416-240-8	155522-12-6	R 43 R 53	Xi R: 43-53 S: (2-)22-24-37-61		
607-447-00-6	4-[4-(4-idrossifenilazo)fenilammino]-3-nitrobenzenesolfonato di sodio		416-370-5	156738-27-1	R 43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
607-448-00-1	acido 2,3,5,6-tetrafluorobenzoico		416-800-1	652-18-6	Xi; R38-41	Xi R: 38-41 S: (2-)22-26-37/39		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-449-00-7	Miscela di: 4,4',4''-[(2,4,6-triosso-1,3,5(2H,4H,6H)-triazina-1,3,5-triil)tris[metilene(3,5,5-trimetil-3,1-cicloesandiil)immino-carbonilossi-2,1-etandiil(etil)ammino]]trisbenzodiazoniotri[bis(2-metilpropil)naftalensolfonato] 4,4',4''-[[5,5'-[carbonilbis(immino(1,5,5-trimetil-3,1-cicloesandiil)metilene)]-2,4,6-triosso-1,3,5(2H,4H,6H)-triazina-1,1',3,3'-tetrail]tetrachis(metilene(3,5,5-trimetil-3,1-cicloesandiil)imminocarbonilossi-2,1-etandiil(etil)ammino)]tetrachisbenzodiazoniotetra[bis(2-metilpropil)naftalensolfonato]		417-080-1	—	E; R2 R43 N; R50-53	E; Xi; N R: 2-43-50/53 S: (2-)24-35-37-60-61		
607-450-00-2	2-mercaptobenzotiazolil-(Z)-(2-amminotiazol-4-il)-2-(terz-butossicarbonil) isopropossimminoacetato		419-040-9	89604-92-2	R 53	R: 53 S: 61		
607-451-00-8	sale di sodio dell'acido 4-[4-ammino-5-idrossi-3-(4-(2-solfossietilsolfonil)fenilazo)-2,7-disolfonaft-6-ilazo]-6-[3-(4-ammino-5-idrossi-3-(4-(2-solfossietilsolfonil)fenilazo)-2,7-disolfonaft-6-ilazo)fenilcarbonilammino]benzen-solfonico		417-640-5	161935-19-9	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		
607-453-00-9	4-benzil-2,6-diidrossi-4-aza-eptilene bis(2,2-dimetilottanoato)		418-100-1	172964-15-7	R 43 R 53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-454-00-4	Miscela di: acido trans-2-(1-metiletil)-1,3-diossan-5-carbossilico; acido cis-2-(1-metiletil)-1,3-diossan-5-carbossilico		418-170-3	—	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)25-26-39-61		
607-455-00-X	sale di sodio/litio dell'acido 1-ammino-4-(3-[4-cloro-6-(2,5-disolfofenilammino)-1,3,5-triazin-2-il-ammino]-2,2-dimetil-propilammino)-antrachinon-2-solfonico		419-520-8	172890-93-6	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-456-00-5	estere esadecilico dell'acido 3-ammino-4-clorobenzoico		419-700-6	143269-74-3	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-457-00-0	1,1"-diidrossi-8,8"-[p-fenilbis(immino-{6-[4-(2-amminoetil)pirazina-1-il]}-1,3,5-triazin-4,2-diil-immino)]bis(2,2'-azonaftalen-1',3,6-trisolfonato) diidrogeno tetrasodico		420-350-1	172277-97-3	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
607-458-00-6	Miscela di: 2-etil-[2,6-dibromo-4-[1-[3,5-dibromo-4-(2-idrossietossi)fenil]-1-metiletil]fenossi]-propenoato 2,2'-dietil-[4,4'-bis(2,6-dibromofenossi)-1-metiletiliden]dipropenoato 2,2'-[(1-metiletiliden)bis[[2,6-dibromo-4,1-fenilen)ossi]etanol]]		420-850-1	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-459-00-1	4-(2-[5-ciano-1,2,3,6-tetraidro-1-(2-isopropossietossi-carbonilmetil)-4-metil-2,6-diosso-3-piridilidene]idrazino)benzoato di isopentile		418-930-4	—	R 53	R: 53 S: 61		
607-460-00-7	9-ottadecenoato di 3-tridecilossi-propilammonio		418-990-1	—	Xn; R48/22 Xi; R36/38 N; R50-53	Xn; N R: 36/38-48/22-50/53 S: (2-)23-26-37/39-60-61		
607-461-00-2	Miscela di: 2-{4-[3-metil-4-[6-solfonato-4-(2-solfonato-fenilazo)-naftalen-1-ilazo]-fenilammino]-6-[3-(2-solfato-etansolfonil)-fenilammino]-1,3,5-triazin-2-ilammino}-benzen-1,4-disolfonato pentasodico 2-{4-[3-metil-4-[7-solfonato-4-(2-solfonato-fenilazo)-naftalen-1-ilazo]-fenilammino]-6-[3-(2-solfato-etansolfonil)-fenilammino]-1,3,5-triazin-2-ilammino}-benzen-1,4-disolfonato pentasodico		421-160-1	—	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
607-462-00-8	Miscela di: acetato di 1-esile Acetato di 2-metil-1-pentile Acetato di 3-metil-1-pentile Acetato di 4-metil-1-pentile altre miscele di acetati di C6-alchile lineari e ramificati		421-230-1	88230-35-7	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-463-00-3	acido 3-(fenotiazin-10-il)propionico		421-260-5	362-03-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 24/25-61		
607-464-00-9	Miscela di: acido 7-cloro-1-etil-6-fluoro-1,4-diidro-4-osso-chinolin-3-carbossilico Acido 5-cloro-1-etil-6-fluoro-1,4-diidro-4-osso-chinolin-3-carbossilico		421-280-4	68077-26-9	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
607-465-00-4	7-{4-[4-(2-cianoammino-4-idrossi-6-ossidopirimidin-5-ilazo)-benzammido]-2-etossi-fenilazo}-naftalen-1,3-disolfonato di tris(2-idrossietil)ammonio		421-440-3	—	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
607-466-00-X	Miscela di: 1-(1-[2-cloro-5-(esadecilossicarbonil)fenilcarbammol]-3,3-dimetil-2-ossobutil)-1H-2,3,3a,7a-tetraidrobenzotriazolo-5-carbossilato di fenile 2-(1-(2-cloro-5-(esadecilossicarbonil)fenilcarbammol)-3,3-dimetil-2-ossobutil)-1H-2,3,3a,7a-tetraidrobenzotriazolo-5-carbossilato di fenile 3-(1-(2-cloro-5-(esadecilossicarbonil)fenilcarbammol)-3,3-dimetil-2-ossobutil)-1H-2,3,3a,7a-tetraidrobenzotriazolo-5-carbossilato di fenile		421-480-1	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 37/39-61		
607-467-00-5	1,1,3,3-tetrabutyl-1,3-distagno-ossidicaprillato		419-430-9	56533-00-7	Xn; R21/22-48/22 C; R34 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-48/22-50/53 S: (1/2)-26-36/37/39-45-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-468-00-0	Miscela di 4-((4-(5-solfonato-2-metossifenilammino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)ammino)-2-((1,4-dimetil-6-ossido-2-osso-5-solfonatometil-1,2-diidropiridin-3-il)azo)benzensolfonato di monosodio 4-((4-(5-solfonato-2-metossifenilammino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)ammino)-2-((1,4-dimetil-6-ossido-2-osso-5-solfonatometil-1,2-diidropiridin-3-il)azo)benzensolfonato di disodio 4-((4-(5-solfonato-2-metossifenilammino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)ammino)-2-((1,4-dimetil-6-ossido-2-osso-5-solfonatometil-1,2-diidropiridin-3-il)azo)benzensolfonato di triasodio 4-((4-(5-solfonato-2-metossifenilammino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)ammino)-2-((1,4-dimetil-6-ossido-2-osso-5-solfonatometil-1,2-diidropiridin-3-il)azo)benzensolfonato di tetrasodio		419-450-8	—	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-469-00-6	7-((4,6-bis(3-dietilamminopropilammino)-1,3,5-triazin-2-il)ammino)-4-idrossi-3-(4-(4-solfonatofenilazo)fenilazo)-2-naftalensolfonato di disodio		419-460-2	120029-06-3	R52-53	R: 52/53 S: 61		
607-470-00-1	6,13-dicloro-3,10-bis{2-[4-[3-(2-idrossisolfonilossietansolfonil)fenilammino]-6-(2,5-disolfonatofenilammino)-1,3,5-triazin-2-ilammino]etilammino}-benzo[5,6][1,4]ossazino[2,3-b]fenossazina-4,11-disolfonato di potassio e sodio		414-100-0	—	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)39-22-26-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-472-00-2	trimetilendiamminotetraacetato di ammonio e ferro(III), emiidrato		400-660-3	111687-36-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-474-00-3	acido (4-(4-(4-dimetilamminobenziliden-1-il)-3-metil-5-ossopirazolin-1-il)benzoico		410-430-4	117573-89-4	R53	R: 53 S: 61		
607-475-00-9	Miscela (50/50) di: 7-(4-[4-cloro-6-[metil-(3-solfonato)fenilammino]-1,3,5-triazin-2-ilammino]-2-ureidofenilazo)naftalen-1,3,6-trisolfonato di tetrasodio 7-(4-[4-cloro-6-[metil-(4-solfonato)fenilammino]-1,3,5-triazin-2-ilammino]-2-ureidofenilazo)naftalen-1,3,6-trisolfonato di tetrasodio		412-940-2	148878-18-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
607-476-00-4	N,N-bis(carbossimetil)-β-alanina trisodica		414-070-9	129050-62-0	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
607-478-00-5	ftalato di tetrametilammonio e idrogeno		416-900-5	79723-02-7	T; R25 Xn; R48/22 N; R50	T; N R: 25-48/22-50 S: (1/2-)25-36-45-61		
607-479-00-0	4-cloro-3-[2-(5,5-dimetil-2,4-diosso-1,3-ossazolidin-3-il)-4,4-dimetil-3-ossopentammido]benzoato di esadecile		418-550-9	168689-49-4	R53	R: 53 S: 61		
607-480-00-6	Acido 1,2-benzenedicarbossilico Alchil esteri di-C7-11-ramificati e lineari		271-084-6	68515-42-4	Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62	T R: 61-62 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-487-00-4	Miscela di: 4-(3-etossicarbonil-4-(5-(3-etossicarbonil-5-idrossi-1-(4-solfonatofenil)pirazol-4-il)penta-2,4-dienilidene)-4,5-diidro-5-ossopirazol-1-il)benzenesolfonato di disodio 4-(3-etossicarbonil-4-(5-(3-etossicarbonil-5-ossido-1-(4-solfonatofenil)pirazol-4-il)penta-2,4-dienilidene)-4,5-diidro-5-ossopirazol-1-il)benzenesolfonato di trisodio		402-660-9	—	Repr.Cat.2; R61 R52-53	T R: 61-52/53 S: 53-45-61		
607-488-00-X	(2-acetilammino-5-fluoro-4-isotiocianatofenossi)acetato d'etile		414-210-9	147379-38-2	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
607-489-00-5	Miscela di: linolenato, linoleato e oleato di 2-etilesile epossioleato di 2-etilesile diepossilinoleato di 2-etilesile triepossilinolenato di 2-etilesile		414-890-7	71302-79-9	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-490-00-0	N-[2-idrossi-3-(C12-16-alchilossi)propil]-N-metil glicinato		415-060-7	—	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)24-26-37/39		
607-492-00-1	propanoato di 2-(1-(3',3'-dimetil-1'-cicloesil)etossi)-2-metile e propile		415-490-5	141773-73-1	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
607-493-00-7	(3aR,4R,7aR)-2-metil-4-(1S,2R,3-triacetossipropil)-3a,7a-diidro-4H-pirano[3,4-d]ossazolo-6-carbossilato di metile		415-670-3	78850-37-0	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
607-494-00-2	bis(2-etilesil)ottilfosfonato		417-170-0	52894-02-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-495-00-8	4-solfofenil-6-((1-ossonil)ammino) esanoato di sodio		417-550-6	168151-92-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)24-37		
607-496-00-3	2,2'-metilenebis(4,6-di-terz-butil-fenil)-2-etilesilfosfito		418-310-3	126050-54-2	R53	R: 53 S: 61		
607-497-00-9	ossido di isostearato di cerio		419-760-3	—	R53	R: 53 S: 61		
607-498-00-4	(E)-3,7-dimetil-2,6-ottadienilesadecanoato		421-370-3	3681-73-0	Xi; R38 R53	Xi R: 38-53 S: (2-)37-61		
607-499-00-X	1,2-etandiil-bis(2-esadecenilsuccinato) di bis(dimetil-(2-idrossietil) ammonio)		421-660-1	—	Xi; R41 R43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
607-500-00-3	2,2,bis[(5-tetrapropilen-2-idrossi)fenil]etanoato di calcio		421-670-4	—	Xi; R38 N; R50-53	Xi; N R: 38-50/53 S: (2-)37-60-61		
607-501-00-9	Miscela di: trifeniltiofosfato e derivati terziari butilati di fenile		421-820-9	—	R53	R: 53 S: 61		
607-502-00-4	4-dodecilbenzensolfonato di (N-benzil-N,N,N-tributil)ammonio		422-200-0	—	C; R34 Xn; R22 N; R51-53	C; N R: 22-34-51/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-61		
607-503-00-X	2,4,6-tri-n-propil-2,4,6-triosso-1,3,5,2,4,6-triossatrifosforinano		422-210-5	68957-94-8	C; R34	C R: 34 S: (1/2-)26-36/37/39-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-505-00-0	7-(4-(4-(5-ammino-4-solfonato-2-(4-((2-(solfonato-etossi)solfonil)fenilazo)fenilammino)-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il)ammino-2-ureidofenilazo)naftalen-1,3,6-trisolfonato pentasodico		422-930-1	171599-84-1	R52-53	R: 52/53 S: 22-61		
607-506-00-6	Miscela di: (4-cloro-2-((4,5-diidro-3-metil-5-osso-1-(3-solfonato-fenil)-1H-pirazol-4-il)azo)-5-metil)benzensolfonato di stronzio (4-cloro-2-((4,5-diidro-3-metil-5-osso-1-(3-solfonato-fenil)-1H-pirazol-4-il)azo)-5-metil)benzensolfonato di disodio		422-970-8	136248-04-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 22-61		
607-507-00-1	2,4-diammino-3-[4-(2-solfonatoetossisolfonil)fenilazo]-5-[4-(2-solfonatoetossisolfonil)-2-solfonato-fenilazo]-benzensolfonato di potassio e sodio		422-980-2	187026-95-5	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
607-508-00-7	3,3'-[imminobis[solfonil-4,1-fenilen-(5-idrossi-3-metilpirazol-1,4-diil)azo-4,1-fenilensolfonilimmino-(4-ammino-6-idrossipirimidin-2,5-diil)azo-4,1-fenilensolfonilimmino(4-ammino-6-idrossipirimidin-2,5-diil)azo]bis(benzensolfonato)] disodico		423-110-4	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
607-512-00-9	2,4-diammino-3,5-bis-[4-(2-solfonatoetossi)solfonil)fenilazo]-benzensolfonato trisodico		423-970-0	182926-43-8	R52-53	R: 52/53 S: 22-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-513-00-4	Miscela di: 4-benzoilammino-6-(6-etenosolfonil-1-solfato-naftalen-2-ilazo)-5-idrossinaftalen-2,7-disolfonato, trisodico acido 5-(benzoilammino)-4-idrossi-3-((1-solfo-6-((2-solfoossi)etil)solfonil)-2-naftil)azo)naftalen-2,7-disolfonico, sale di sodio acido 5-(benzoilammino)-4-idrossi-3-((1-solfo-6-((2-solfoossi)etil)solfonil)-2-naftil)azo)naftalen-2,7-disolfonico		423-200-3	—	Xi; R41 R43 R52-53	Xi R: 41-43-52/53 S: 22-26-36/37/39-61		
607-515-00-5	Miscela di: Disolfonato disodico di etere esildifenilico Disolfonato disodico di etere diesildifenilico		429-650-7	147732-60-3	Xi; R36 N; R51-53	Xi; N R: 36-51/53 S: (2-)26-61		
607-516-00-0	N,N'-bis(trifluoroacetil)-S,S'-bis-L-omocisteina		429-670-6	105996-54-1	Xi; R41 R43	Xi R: 41-43 S: (2-)24-26-37/39		
607-517-00-6	Acido (S)- α -(acetiltio)benzenpropanoico		430-300-0	76932-17-7	Xn; R22 Xi; R41 R43	Xn R: 22-41-43 S: (2-)22-26-36/37/39		
607-526-00-5	cartap		—	15263-53-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
607-527-00-0	Miscela di: 1-(1'H,1'H,2'H,2'H-tridecafluoroottil) 12-(1''H,1''H,2''H,2''H-tridecafluoroottil)dodecandioato 1-(1'H,1'H,2'H,2'H-tridecafluoroottil) 12-(1''H,1''H,2''H,2''H-eptdecafluorodecil)dodecandioato 1-(1'H,1'H,2'H,2'H-tridecafluoroottil)-12-(1''H,1''H,2''H,2''H-eneicosafuorododecil)dodecandioato 1-(1'H,1'H,2'H,2'H-tridecafluoroottil) 12-(1''H,1''H,2''H,2''H-pentacosafuorotetradecil)dodecandioato 1-(1'H,1'H,2'H,2'H-eptadecafluorodecil) 12-(1''H,1''H,2''H,2''H-eptadecafluorodecil)dodecandioato 1-(1'H,1'H,2'H,2'H-eptadecafluorodecil) 12-(1''H,1''H,2''H,2''H-eneicosafuorododecil)dodecandioato		423-180-6	—	Xn; R48/22	Xn R: 48/22 S: (2-)36		
608-031-00-7	2-benzil-2-metil-3-butenitrile		407-870-4	97384-48-0	Xn; R22 R 52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
608-033-00-8	N-butil-3-(2-cloro-4-nitrofenilidrazono)-1-ciano-2-metilprop-1-en-1,3-dicarbossimide		407-970-8	75511-91-0	R 43 R 52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)24-37-61		
608-034-00-3	chlorfenapyr 4-bromo-2-(4-clorofenil)-1-etosimetil-5-trifluorometilpirrol-3-carbonitrile		—	122453-73-0	T; R23 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 22-23-50/53 S: (1/2-)13-36/37-45-60-61		
608-035-00-9	(+/-)- α -[(2-acetil-5-metilfenil)-ammino]-2,6-diclorobenzenacetoneitrile		419-290-9	—	R43 R53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
608-036-00-4	3-(2-{4-[2-(4-cianofenil)vinil]fenil}vinil)benzonnitrile		419-060-8	79026-02-1	R 53	R: 53 S: 61		
608-037-00-X	Miscela di: (E)-2,12-tridecadiennitrile (E)-3,12-tridecadiennitrile (Z)-3,12-tridecadiennitrile		422-190-8	124071-40-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-038-00-5	2,2,4-trimetil-4-fenil-butanonitrile		422-580-8	75490-39-0	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
608-039-00-0	2-fenilesanonitrile		423-460-8	3508-98-3	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)23-60-61		
608-040-00-6	4,4'-ditiobis(5-ammino-1-(2,6-dicloro-4-(trifluorometil)fenil)-1H-pirazol-3-carbonitrile)		423-490-1	130755-46-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-041-00-1	4'-((2-butil-4-osso-1,3-diazaspiro[4.4]non-1-en-3-il)metil)(1,1'-bifenil)-2-carbonitrile		423-500-4	138401-24-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
608-043-00-2	3-(cis-3-esenilossi)propanonitrile		415-220-6	142653-61-0	T; R23 Xn; R22 N; R50-53	T; N R: 22-23-50/53 S: (1/2-)13-36/37-45-60-61		
609-064-00-X	mesotrione		—	104206-82-8	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
609-066-00-0	3-ammino-10-{4-(10-ammino-6,13-dicloro-4,11-disolfonato-benzo[5,6][1,4]ossazino[2,3-b]fenossazin-3-ilammino)-6-[metil(2-solfonatoetil)ammino]-1,3,5-triazin-2-ilammino)-6,13-diclorobenzo[5,6][1,4]ossazino[2,3-b]fenossazin-4,11-disolfonato di litio e sodio		418-870-9	154212-58-5	Xn; R20/21/22-68/20/21/22	Xn R: 20/21/22-68/20/21/22 S: (2-)36/37		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
609-067-00-6	4-(3-amminopropilammino)-2,6-bis[3-(4-metossi-2-solfofenilazo)-4-idrossi-2-solfo-7-naftilammino]-1,3,5-triazina di sodio e potassio		416-280-6	156769-97-0	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
609-068-00-1	musk xilene 5- <i>tert</i> -butil-2,4,6-trinitro- <i>m</i> -xilene		201-329-4	81-15-2	Carc. Cat. 3; R40 E; R2 N; R50-53	E; Xn; N R: 2-40-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		
609-070-00-2	1,4-dicloro-2-(1,1,2,3,3,3-esafluoropropossi)-5-nitrobenzene		415-580-4	130841-23-5	Xn; R22 R 43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37/39-60-61		
609-071-00-8	Miscela di: 2-metilsolfanil-4,6-bis-(2-idrossi-4-metossi-fenil)-1,3,5-triazina 2-(4,6-bis-metilsolfanil-1,3,5-triazin-2-il)-5-metossi-fenolo		423-520-3	156137-33-6	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-099-00-0	dicloruro di (metilenbis(4,1-fenilenazo(1-(3-(dimetilammino)propil)-1,2-diidro-6-idrossi-4-metil-2-ossopiridin-5,3-diil)))-1,1'-dipiridinio, dicloridrato		401-500-5	—	Carc.Cat.2; R45 N; R51-53	T; N R: 45-51/53 S: 53-45-61		
611-100-00-4	3,3'-(3(o4)-metil-1,2-fenilenbis(immino(6-cloro)-1,3,5-triazin-4,2-diilimmino(2-acetammido-5-metossi)-4,1-fenilenazo)dinaftalen-1,5-disolfonato di potassio e sodio		403-810-6	140876-13-7	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
611-101-00-X	2'-(4-cloro-3-ciano-5-formil-2-tienil)azo-5'-dietilamminoacetanilide		405-200-5	104366-25-8	R43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-103-00-0	(1-(3-carbossilato-2-ossido-5-solfonato-fenilazo)-5-idrossi-7-solfonato-naftalen-2-amido)nicel(II) di trisodio		407-110-1	—	Xi; R41 R 43 N; R51-53	Xi; N R: 41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
611-104-00-6	Miscela di: (2,4(o 2,6 o 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-ossidofenilazo)-5-idrossifenolato)(2(o 4 o 6)-(3,5-dinitro-2-ossidofenilazo)-5-idrossi-4(o 2 o 6)-(4-(4-nitro-2-solfonatoanilino)fenilazo)fenolato)ferrato(1-) di trisodio bis(2,4(o 2,6 o 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-ossidofenilazo)-5-idrossifenolato)ferrato(1-) di trisodio (2,4(o 2,6 o 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-ossidofenilazo)-5-idrossifenolato)(2(o 4 o 6)-(3,5-dinitro-2-ossidofenilazo)-5-idrossi-4(o 2 o 6)-(4-nitro-2-solfonatofenilazo)fenolato)ferrato(1-) di trisodio (2,4(o 2,6 o 4,6)-bis(3,5-dinitro-2-ossidofenilazo)-5-idrossifenolato)(2(o 4 o 6)-(3,5-dinitro-2-ossidofenilazo)-5-idrossi-4(o 2 o 6)-(3-solfonatofenilazo)fenolato)ferrato(1-) di trisodio 3,3'-(2,4-diidrossi-1,3(o 1,5 o 3,5)-fenilenediazio)dibenzensolfonato di disodio		406-870-1	—	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
611-105-00-1	4-(4-cloro-6-(N-etilanilino)-1,3,5-triazin-2-ilammino)-2-(1-(2-clorofenil)-5-idrossi-3-metil-1H-pirazol-4-ilazo)benzensolfonato di sodio		407-800-2	136213-75-7	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61		
611-106-00-7	4,4'-diidrossi-3,3'-bis[2-solfonato-4-(4-solfonatofenilazo)fenilazo]-7,7'[p-fenilenbis(imino(6-cloro-1,3,5-triazin-4,2-diil)imino)]dinafthalen-2-solfonato di esasodio		410-180-6	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
611-107-00-2	4-(4-cloro-6-(3,6-disolfonato-7-(5,8-disolfonato-naftalen-2-ilazo)-8-idrossi-naftalen-1-ilammino)-1,3,5-triazin-2-ilammino)-5-idrossi-6-(4-(2-solfatoetansolfonil)-fenilazo)-naftalen-1,7-disolfonato di potassio e sodio		412-490-7	—	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-108-00-8	5-(((4-(4-cloro-3-solfonatofenil)azo)-1-naftil)azo)-8-(fenilammino)-1-naftalensolfonato di disodio		413-600-6	6527-62-4	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
611-109-00-3	Prodotti di reazione di: solfato di rame(II) e 2,4-bis[6-(2-metossi-5-solfonatofenilazo)-5-idrossi-7-solfonato-2-naftilammino]-6-(2-idrossietilammino)-1,3,5-triazina di tetrasodio (2:1)		407-710-3	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
611-110-00-9	4,4'-bis-(8-ammino-3,6-disolfonato-1-naftol-2-ilazo)-3-metilazobenzene di tetra-sodio/litio		408-210-8	124605-82-9	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-28-37-61		
611-111-00-4	2-[[4-(2-clorotilsolfonil)fenil]-[(2-idrossi-5-solfo-3-[3-[2-(2-solfosietilsolfonil)etilazo]-4-solfobenzoato(3-)cuprato(1-) di disodio		414-230-8	—	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
611-112-00-X	4-idrossi-5-[4-[3-(2-solfatoetan-solfonil)fenilammino]-6-morfolin-4-il-1,3,5-triazin-2-ilammino]-3-(1-solfonatoftalen-2-ilazo)naftalen-2,7-disolfonato di tetrasodio		413-070-6	—	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-113-00-5	(2-(((5-((2,5-diclorofenil)azo)-2-idrossifenil)metil)ammino)benzoato(2-)) (2-((4,5-diidro-3-metil-5-osso-1-fenil-1H-pirazol-4-il)azo)-5-solfobenzoato(3-)) litio/sodio cromato(2-)		414-280-0	149626-00-6	N; R51-53	N R: 51/53 S: 24/25-61		
611-114-00-0	(4-((5-cloro-2-idrossifenil)azo)-2,4-diidro-5-metil-3H-pirazol-3-onato(2-)) (3-((4,5-diidro-3-metil-1-(4-metilfenil)-5-osso-1H-pirazol-4-il)azo)-4-idrossi-5-nitrobenzensolfonato(3-)) litio/sodio cromato(2-)		414-250-7	149564-66-9	Xn; R22 Xi; R41 R 52-53	Xn R: 22-41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
611-115-00-6	bis(4-((4-(dietilammino)-2-idrossifenil)azo)-3-idrossi-1-naftalen-solfonato(3-))chromato(3-) di trilitio		414-290-5	149564-65-8	Xn; R22 R 52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
611-116-00-1	Miscela di: 5-{4-cloro-6-[2-(2,6-dicloro-5-cianopirimidin-4-il-ammino)-propilammino]-1,3,5-triazin-2-il-ammino}-4-idrossi-3-(1-solfonatonaftalen-2-ilazo)-naftalen-2,7-disolfonato trisodico 5-{4-cloro-6-[2-(2,6-dicloro-5-cianopirimidin-4-il-ammino)-1-metil-etilammino]-1,3,5-triazin-2-il-ammino}-4-idrossi-3-(1-solfonatonaftalen-2-ilazo)-naftalen-2,7-disolfonato trisodico 5-{4-cloro-6-[2-(4,6-dicloro-5-cianopirimidin-2-il-ammino)-propilammino]-1,3,5-triazin-2-il-ammino}-4-idrossi-3-(1-solfonatonaftalen-2-ilazo)-naftalen-2,7-disolfonato trisodico 5-{4-cloro-6-[2-(4,6-dicloro-5-cianopirimidin-2-il-ammino)-1-metil-etilammino]-1,3,5-triazin-2-il-ammino}-4-idrossi-3-(1-solfonatonaftalen-2-ilazo)-naftalen-2,7-disolfonato trisodico		414-620-8	—	Xi; R41 R 43	Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		
611-117-00-7	1,3-bis{6-fluoro-4-[1,5-disolfo-4-(3-amminocarbonil-1-etil-6-idrossi-4-metil-pirid-2-on-5-ilazo)-fenil-2-il-ammino]-1,3,5-triazin-2-il-ammino}propano di litio e sodio		415-100-3	149850-29-3	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		
611-118-00-2	sale sodico del 1,2-bis[4-[4-(4-solfofenilazo)-2-solfofenilazo]-2-ureido-fenil-ammino]-6-fluoro-1,3,5-triazin-2-il-ammino]-propano		413-990-8	149850-31-7	R 43	Xi R: 43 S: (2-)22-24-37		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
611-119-00-8	4-[4-cloro-6-(4-metil-2-solfofenilammino)-1,3,5-triazin-2-ilammino]-6-(4,5-dimetil-2-solfofenilazo)-5-idrossinaftalen-2,7-disolfonato di tetrasodio		415-400-4	148878-22-2	Xi; R41 R 43	Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		
611-120-00-3	sale sodico dell'acido 5-{4-[5-ammino-2-[4-(2-solfossietilsolfonil)fenilazo]-4-solfo-fenilammino]-6-cloro-1,3,5-triazin-2-ilammino}-4-idrossi-3-(1-solfonaftalen-2-ilazo)-naftalen-2,7-disolfonico		418-340-7	157707-94-3	Xi; R41 R 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)22-26-39-61		
611-121-00-9	Componente principale 6 (isomero): Cr(III)-complesso asim. 1:2 di: A: sale sodico dell'acido 3-idrossi-4-(2-idrossi-naftalen-1-ilazo)-naftalen-1-solfonico, e B: 1-[2-idrossi-5-(4-metossi-fenilazo)-fenilazo]-naftalen-2-olo Componente principale 8 (isomero): cromo-complesso asim. 1:2 di: A: sale sodico dell'acido 3-idrossi-4-(2-idrossi-naftalen-1-ilazo)-naftalen-1-solfonico, e B: 1-[2-idrossi-5-(4-metossi-fenilazo)-fenilazo]-naftalen-2-olo		417-280-9	30785-74-1	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
611-122-00-4	(di[N-(3-(4-[5-(5-ammino-3-metil-1-fenilpirazol-4-il-azo)-2,4-disolfo-anilinio]-6-cloro-1,3,5-triazin-2-il-ammino)fenil)-solfammoil](di-solfo)-ftalocianinato)di nichel esasodico		417-250-5	151436-99-6	Xi; R41 R 43	Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		
611-123-00-X	Lattato di 3-(2,4-bis(4-((5-(4,6-bis(2-amminopropilammino)-1,3,5-triazin-2-ilammino)-4-idrossi-2,7-disolfonaftalen-3-il)azo)-fenilammino)-1,3,5-triazin-6-ilammino)propildietilammonio		424-310-4	178452-66-9	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
611-124-00-5	Miscela di: 5-ammino-3-(5-(4-cloro-6-[4-(2-solfossietossisolfonato)fenilammino]-1,3,5-triazin-2-ilammino)-2-solfonato)fenilazo)-6-[5-(2,3-dibromopropionilammino)-2-solfonato)fenilazo]-4-idrossinaftalen-2,7-disolfonato pentasodico 5-ammino-6-[5-(2-bromoacriloilammino)-2-solfonato)fenilazo]-3-(5-(4-cloro-6-[4-(2-solfossietossisolfonato)fenilammino]-1,3,5-triazin-2-ilammino)-2-solfonato)fenilazo)-4-idrossinaftalen-2,7-disolfonato pentasodico 5-ammino-3-[5-(4-cloro-6-[4-(vinilsolfonil)fenilammino]-1,3,5-triazin-2-ilammino)-2-solfonato)fenilazo]-6-[5-(2,3-dibromopropionilammino)-2-solfonato)fenilazo]-4-idrossinaftalen-2,7-disolfonato tetrasodico		424-320-9	180778-23-8	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
611-125-00-0	Miscela di: acido 4-((8-ossido-7-(2-ossido-4-etenilsolfonil-5-(metossifenil)azo)-6-solfonato)naftalen-2-ilazo)-5-osso-1-(4-solfonato)fenil-4,5-diidro-1H-pirazol-3-carbossilico, complesso disodico di rame(II) acido 4-((8-ossido-7-(2-ossido-4-(2-idrossietilsolfonil)-5-(metossifenil)azo)-6-solfonato)naftalen-2-ilazo)-5-osso-1-(4-solfonato)fenil)-4,5-diidro-1H-pirazol-3-carbossilico, complesso disodico di rame(II)		423-940-7	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
611-126-00-6	2,6-bis-(2-(4-(4-ammino-fenilammino)-fenilazo)-1,3-dimetil-3H-imidazolio)-4-dimetilammino-1,3,5-triazina, dicloruro		424-120-1	174514-06-8	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
611-127-00-1	4-ammino-6-(5-(4-(2-etil-fenil-ammino)-6-(2-solfatoetansolfonil)-1,3,5-triazin-2-ilammino)-2-solfonatofenilazo)-5-idrossi-3-(4-(2-solfatoetansolfonil)fenilazo)-naftalen-2,7-disolfonato pentasodico		423-790-2	—	R 5 Xi; R41 R 43 R 52-53	Xi R: 5-41-43-52/53 S: (2-)22-26-36/37/39-41-61		
611-128-00-7	sale sodico dell'acido N,N'-bis(6-cloro-4-[6-(4-vinilsolfonilfenilazo)-2,7-disolfonico-5-idrossinaft-4-il-ammino]-1,3,5-triazin-2-il)-N-(2-idrossietil)etan-1,2-diammina		419-500-9	171599-85-2	Xi; R41 R 43	Xi R: 41-43 S: (2-)22-24-26-37/39		
611-129-00-2	Miscela di: acido 5-[(4-[(7-ammino-1-idrossi-3-solfo-2-naftil)azo]-2,5-dietossifenil)azo]-2-[(3-fosfonofenil)azo]benzoico acido 5-[(4-[(7-ammino-1-idrossi-3-solfo-2-naftil)azo]-2,5-dietossifenil)azo]-3-[(3-fosfonofenil)azo]benzoico		418-230-9	163879-69-4	E; R2 Repr.Cat.3; R62 Xn; R48/22 R 43 N; R51-53	E; Xn; N R: 2-43-48/22-62-51/53 S: (2-)26-35-36/37-61		
611-130-00-8	2-[6-[7-(2-carbossilato-fenilazo)-8-idrossi-3,6-di-solfonato-1-naftilammino]-4-idrossi-1,3,5-triazin-2-il-ammino] benzoato tetraammonico		418-520-5	183130-96-3	Xi; R36 N; R50-53	Xi; N R: 36-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
611-131-00-3	2-[2-idrossi-3-(2-clorofenil)carbamoil-1-naftilazo]-7-[2-idrossi-3-(3-metilfenil)carbamoil-1-naftilazo]fluoren-9-one		420-580-2	—	Repr.Cat.2; R61 R 53	T R: 61-53 S: 53-45-61		
611-132-00-9	bis{7-[4-(1-butyl-5-ciano-1,2-diidro-2-idrossi-4-metil-6-osso-3-piridilazo)fenilsolfonilammino]-5'-nitro-3,3'-disolfonato-naftalen-2-azobenzene-1,2'-diolato} cromato(III) pentasodico		419-210-2	—	Xi; R41 R 52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
611-133-00-4	Complesso di ferro, prodotto da processo, di coloranti azoici ottenuti per copulazione di una miscela di 2-ammino-1-idrossibenzen-4-solfanilide e 2-ammino-1-idrossibenzen-4-solfonammide diazotate con resorcina, e sottoponendo successivamente la miscela così ottenuta a una seconda reazione di copulazione con una miscela di sale sodico dell'acido 3-amminobenzen-1-solfonico (acido metanilico) e di sale sodico dell'acido 4'-ammino-4-nitro-1,1'-difenilammino-2-solfonico diazotati e metallizzazione con cloruro ferrico		419-260-5	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)26-39-61		
611-134-00-X	2- α [2-idrossi-3-[4-cloro-6-[4-(2,3-dibromopropionilammino)-2-solfonatofenilammino]-1,3,5-triazin-2-ilammino]-5-solfonatofenilazo]-benzilidenidrazino}-4-solfonatobenzoato trisodico, complesso di rame		423-770-3	—	Xi; R41 N; R51-53	Xi; N R: 41-51/53 S: (2-)22-26-39-61		
611-135-00-5	Prodotto di reazione di: acido 2-[[4-ammino-2-ureidofenilazo]-5-[(2-(solfossi)etil)solfonil]]benzen-solfonico con 2,4,6-trifluoropirimidina e idrolisi parziale al corrispondente vinilsolfonil derivato, sale misto potassio/sodio		424-250-9	—	Xi; R41 R52-53	Xi R: 41-52/53 S: (2-)26-39-61		
611-136-00-0	2-(4-(2-ammoniopropilammino)-6-[4-idrossi-3-(5-metil-2-metossi-4-solfammoilfenilazo)-2-solfonatonaft-7-ilammino]-1,3,5-triazin-2-ilammino)-2-amminopropilformiato		424-260-3	—	Repr.Cat.3; R62 Xi; R41 N; R51-53	Xn; N R: 41-62-51/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
611-137-00-6	6-terz-butil-7-cloro-3-tridecil-7,7a-diidro-1H-pirazol[5,1-c]-1,2,4-triazolo		419-870-1	159038-16-1	R 53	R: 53 S: 61		
611-138-00-1	2-(4-amminofenil)-6-terz-butil-1H-pirazolo[1,5-b][1,2,4]triazolo		415-910-7	152828-25-6	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)22-24-37-61		
611-140-00-2	azafenidin		—	68049-83-2	T; R48/22 Repr. Cat. 2; R61 Repr. Cat. 3; R62 N; R50-53	T; N R: 61-48/22-62-50/53 S: 53-45-60-61	C ≥ 0.025 %: N; R50/53 0.0025 % ≤ C < 0.025 %: N; R51/53 0.00025 % ≤ C < 0.0025 %: R52/53	
612-184-00-5	6'-(dibutilammino)-3'-metil-2'-(fenilammino)spiro[isobenzofuran-1(3H),9-(9H)-xanten]-3-one		403-830-5	89331-94-2	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
612-185-00-0	ioduro di 1-[3-[4-((eptadecafluoronoil)ossi)-benzamido]propil]-N,N,N-trimetilammonio		407-400-8	59493-72-0	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
612-186-00-6	solfo di bis(N-(7-idrossi-8-metil-5-fenilfenazin-3-ilidene)di-metilammonio)		406-770-8	149057-64-7	Xn; R48/22 Xi; R41 R 43 N; R50-53	Xn; N R: 41-43-48/22-50/53 S: (2-)22-26-36/37/39-60-61		
612-187-00-1	2,3,4-trifluoroanilina		407-170-9	3862-73-5	Xn; R21/22-48/22 Xi; R38-41 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-38-41-48/22-51/53 S: (2-)23-26-36/37/39-61		
612-188-00-7	4,4'-(9H-fluoren-9-ilidene)bis(2-cloroanilina)		407-560-9	107934-68-9	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
612-189-00-2	4-ammino-2-(amminometil)fenolo dicloridrato		412-510-4	135043-64-0	Xn; R22 R 43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)22-24-37-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
612-190-00-8	4,4'-metilenebis(2-isopropil-6-metilanolina)		415-150-6	16298-38-7	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)36-61		
612-191-00-3	Polimero di idrocloruro di allilammina		415-050-2	71550-12-4	Xn; R22 R 43	Xn R: 22-43 S: (2-)36/37		
612-192-00-9	2-isopropil-4-(N-metil)amminometiltiazolo		414-800-6	154212-60-9	Xn; R21/22 Xi; R38-41 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-38-41-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
612-193-00-4	3-metilamminometilfenilammina		414-570-7	18759-96-1	Xn; R21/22 C; R34 R 43 N; R50-53	C; N R: 21/22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
612-194-00-X	cloruro di 2-idrossi-3-[(2-idrossietil)-[2-(1-ossotetradecilammino)etil]ammino]-N,N,N-trimetil-1-propanammonio		414-670-0	141890-30-4	Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
612-195-00-5	1,5-naftalendisolfonato di bis[tributil(4-metilbenzil)ammonio]		415-210-1	—	Xn; R20/22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-41-50/53 S: (2-)26-36/39-60-61		
612-196-00-0	4-cloro- <i>o</i> -toluidina [1] 4-cloro- <i>o</i> -toluidina cloridrato [2]	E	202-441-6 [1] 221-627-8 [2]	95-69-2 [1] 3165-93-3 [2]	Carc.Cat.2; R45 Muta.Cat.3; R68 T; R23/24/25 N; R50-53	T; N R: 45-23/24/25-68-50/53 S: 53-45-60-61		
612-197-00-6	2,4,5-trimetilanilina [1] 2,4,5-trimetilanilina cloridrato [2]	E	205-282-0 [1] - [2]	137-17-7 [1] 21436-97-5 [2]	Carc.Cat.2; R45 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-23/24/25-51/53 S: 53-45-61		
612-198-00-1	4,4'-tiodianilina e suoi sali	E	205-370-9	139-65-1	Carc.Cat.2; R45 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-51/53 S: 53-45-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
612-199-00-7	4,4'-ossidianilina e suoi sali <i>p</i> -amminofenil etere	E	202-977-0	101-80-4	Carc.Cat.2; R45 Muta.Cat.2; R46 Repr.Cat.3; R62 T; R23/24/25 N; R51-53	T; N R: 45-46-23/24/25-62-51/53 S: 53-45-61		
612-200-00-0	2,4-diamminoanisolo 4-metossi- <i>m</i> -fenilendiammina [1] 2,4-diamminoanisolo solfato [2]		210-406-1 [1] 254-323-9 [2]	615-05-4 [1] 39156-41-7 [2]	Carc.Cat.2; R45 Muta.Cat.3; R68 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-22-68-51/53 S: 53-45-61		
612-201-00-6	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-4,4'-metilendianilina		202-959-2	101-61-1	Carc.Cat.2; R45 N; R50-53	T; N R: 45-50/53 S: 53-45-60-61		
612-202-00-1	3,4-dicloroanilina		202-448-4	95-76-1	T; R23/24/25 Xi; R41 R43 N; R50-53	T; N R: 23/24/25-41-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
612-204-00-2	C.I. Violetto basico 3 4-[4,4'-bis(dimetilammino)benzidrilidene]cicloesa-2,5-dien-1-ilidene]dimetilammonio cloruro		208-953-6	548-62-9	Carc.Cat.3; R40 Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 22-40-41-50/53 S: (2-)26-36/37/39-46-60-61		
612-205-00-8	C.I. . Violetto basico 3 con ≥ 0.1 % chetone di Michler (EC no. 202-027-5)	E	208-953-6	548-62-9	Carc.Cat.2; R45 Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53	T; N R: 45-22-41-50/53 S: 53-45-60-61		
612-206-00-3	famoxadone 3-anilino-5-metil-5-(4-fenossifenil)-1,3-ossazolidin-2,4-dione		—	131807-57-3	Xn; R48/22 N; R50-53	Xn; N R: 48/22-50/53 S: (2-)46-60-61		
612-209-00-X	6-metossi- <i>m</i> -toluidina <i>p</i> -cresidina	E	204-419-1	120-71-8	Carc.Cat.2; R45 Xn; R22	T R: 45-22 S: 53-45		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
612-210-00-5	5-nitro- <i>o</i> -toluidina [1] 5-nitro- <i>o</i> -toluidina icloridrato [2]		202-765-8 [1] 256-960-8 [2]	99-55-8 [1] 51085-52-0 [2]	Carc.Cat.3; R40 T; R23/24/25 R52-53	T R: 23/24/25-40-52/53 S: (1/2-)36/37-45-61		
612-211-00-0	N-[(benzotriazolo-1-il)metil]-4-carbossibenzensolfonammide		416-470-9	—	Xi; R36 N; R51-53	Xi; N R: 36-51/53 S: (2-)26-61		
612-212-00-6	2,6-dicloro-4-trifluorometilani- lina		416-430-0	24279-39-8	Xn; R20/22 Xi; R38 R43 N; R50-53	Xn; N R: 20/22-38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
612-213-00-1	isobutiliden-(2-(2-isopropil-4,4-dimetilossazolidin-3-il)-1,1-dime- tilettil)ammina		419-850-2	148348-13-4	C; R34 R52-53	C R: 34-52/53 S: (1/2-)23-26-36/37/39- 45-61		
612-214-00-7	4-(2,2-difeniletetil)-N,N-di-fenil- benzenammina		421-390-2	89114-90-9	R 53	R: 53 S: 61		
612-215-00-2	3-cloro-2-(isopropiltio)anilina		421-700-6	179104-32-6	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
612-217-00-3	1-metossi-2-propilammina		422-550-4	37143-54-7	F; R11 C; R34 Xn; R22 R52-53	F; C R: 11-22-34-52/53 S: (1/2-)9-26-36/37/39- 45-61		
613-181-00-1	5,5-dimetilperidropirimidin-2- one α -(4-trifluorometilstiril)- α - (4-trifluorometil)cinnamilideni- drazone		405-090-9	67485-29-4	T; R48/25 Xn; R22 Xi; R36 N; R50-53	T; N R: 22-36-48/25-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37-45- 60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
613-182-00-7	cloruro di 1-(1-naftilmetil)chinolinio		406-220-7	65322-65-8	Carc.Cat.3; R40 Muta.Cat.3; R68 Xn; R22 Xi; R38-41 R 52-53	Xn R: 22-38-40-41-52/53-68 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
613-183-00-2	Miscela di: 5-(N-metilperfluorottilsolfonammido)metil-3-ottadecil-1,3-ossazolidin-2-one 5-(N-metilperfluoroepilsolfonammido)metil-3-ottadecil-1,3-ossazolidin-2-one		413-640-4	—	Xn; R48/22 N; R50-53	Xn; N R: 48/22-50/53 S: (2-)36-60-61		
613-184-00-8	2-etilesanato di nitrilotrietile-nammoniopropan-2-olo		413-670-8	—	Xi; R36 R 43	Xi R: 36-43 S: (2-)24-26-37		
613-185-00-3	2,3,5,6-tetraidro-2-metil-2H-ciclopenta[d]-1,2-tiazol-3-one		407-630-9	82633-79-2	T; R25 Xi; R41 R 43 N; R50-53	T; N R: 25-41-43-50/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-60-61		
613-186-00-9	acetato di (2R,3R)-3-((R)-1-(terz-butildimetilsilossi)etil)-4-ossoazetidina-2-ile		408-050-9	76855-69-1	Xi; R36 R 43 N; R51-53	Xi; N R: 36-43-51/53 S: (2-)24-26-37-61		
613-188-00-X	1-(3-(4-fluorofenossi)propil)-3-metossi-4-piperidinone		411-500-7	116256-11-2	Xn; R22 Xi; R41 R 43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)22-24-26-37/39-61		
613-189-00-5	1,4,7,10-tetrakis(p-toluensolfonil)-1,4,7,10-tetraazaciclododecano		414-030-0	52667-88-6	R 43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
613-190-00-0	1-ammino-4-(2-(5-cloro-6-fluoro-pirimidin-4-il-amminometil)-4-metil-6-solfo-fenilammino)-9,10-diosso-9,10-diidro-antracen-2-solfonato disodico		414-040-5	149530-93-8	Xn; R22 R 43	Xn R: 22-43 S: (2-)22-24-37		
613-191-00-6	3-etil-2-metil-2-(3-metilbutil)-1,3-ossazolidina		421-150-7	143860-04-2	Repr.Cat.2; R60 C; R34 N; R50-53	T; N R: 60-34-50/53 S: 53-45-60-61		
613-193-00-7	eptalattato di pentakis[3-(dimetilammonio)propilsolfamoil]-[(6-idrossi-4,4,8,8-tetrametil-4,8-diazoniaundecano-1,11-diildisolfamoil)di[rafeftalocianina(II)]]		414-930-3	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
613-194-00-2	sale di litio e sodio dell'acido 6,13-dicloro-3,10-bis[2-[4-fluoro-6-(2-solfofenilammino)-1,3,5-triazin-2-ilammino]propilammino]benzo[5,6][1,4]ossazino[2,3-b.]fenossazin-4,11-disolfonico.		418-000-8	163062-28-0	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
613-195-00-8	2,2-(1,4-fenilen)bis((4H-3,1-benzossazin-4-one)		418-280-1	18600-59-4	R 43 R 53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
613-196-00-3	sale sodico dell'acido 5-[[4-cloro-6-[[2-[[4-fluoro-6-[[5-idrossi-6-[(4-metossi-2-solfofenil)azo]-7-solfo-2-naftalenil]ammino]-1,3,5-triazin-2-il]ammino]-1-metiletil]ammino]-1,3,5-triazin-2-il]ammino]-3-[[4-(etenilsolfonil)fenil]azo]-4-idrossi-naftalen-2,7-disolfonico		418-380-5	168113-78-8	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
613-197-00-9	Miscela di: 2,4,6-tri(butilcarbamoil)-1,3,5-triazina 2,4,6-tri(metilcarbamoil)-1,3,5-triazina [(2-butil-4,6-dimetil)tricarbamoil]-1,3,5-triazina [(2,4-dibutil-6-metil)tricarbamoil]-1,3,5-triazina		420-390-1	187547-46-2	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
613-199-00-X	Miscela di: 1,3,5-tris(3-amminometilfenil)-1,3,5-(1H,3H,5H)-triazin-2,4,6-trione Miscela di oligomeri di 3,5-bis(3-amminometilfenil)-1-poli[3,5-bis(3-amminometilfenil)-2,4,6-triosso-1,3,5-(1H,3H,5H)-triazin-1-il]-1,3,5-(1H,3H,5H)-triazin-2,4,6-trione		421-550-1	—	Carc.Cat.2; R45 Repr.Cat.2; R61 R 43 R 52-53	T R: 45-61-43-52/53 S: 53-45-61		
613-200-00-3	Prodotti di reazione di: (29H,31H-ftalocianinato(2-)-N29,N30,N31,N32) di rame, acido clorosolforico e 3-(2-solfosietilsolfonil)anilina, sali di sodio		420-980-7	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)22-26-39		
613-201-00-9	(R)-5-bromo-3-(1-metil-2-pirroli-dinilmetil)-1H-indolo		422-390-5	143322-57-0	Repr.Cat.3; R62 T; R39-48/25 Xn; R20/22 Xi; R41 R 43 N; R50-53	T; N R: 20/22-39-41-43-48/ 25-62-50/53 S: (1/2-)53-45-60-61		
613-202-00-4	pimetrozina (ISO) (E)-4,5-diidro-6-metil-4-(3-piridilmetilenamino)-1,2,4-triazin-3(2H)-one		—	123312-89-0	Carc.Cat3; R40 R52-53	Xn R: 40-52/53 S: (2-)36/37-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
613-203-00-X	piraflufen-etile [1] piraflufen [2]		- [1] - [2]	129630-19-9 [1] 129630-17-7 [2]	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-204-00-5	oxadiargil (ISO) 3-[2,4-dicloro-5-(2-propinilossi)- fenil]-5-(1,1-dimetiletil)-1,3,4- ossadiazol-2(3H)-one 5-terz-butil-3-[2,4-dicloro-5- (prop-2-inilossi)pifenil]-1,3,4- ossadiazol-2(3H)-one		254-637-6	39807-15-3	Repr.Cat3; R63 Xn; R48/22 N; R50-53	Xn; N R: 48/22-63-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		
613-205-00-0	propiconazolo (+)-1-[2-(2,4-diclorofenil)-4-pro- pil-1,3-diossolan-2-ilmetil]-1H- 1,2,4-triazolo		262-104-4	60207-90-1	Xn; R22 R43 N; R50-53	Xn; N R: 22-43-50/53 S: (2-)36/37-46-60-61		
613-206-00-6	fenamidone (ISO) (S)-5-metil-2-metiltio-5-fenil-3- fenilamino-3,5-diidroimidazol-4- one		—	161326-34-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-207-00-1	imazalil solfato, soluzione acquosa idrogenosolfato di 1-[2- (allilos- sietil)-2-(2,4-diclorofenil)]-1H- imidazolio idrogenosolfato di (±)-1-[2- (alli- lossietil)-2-(2,4-diclorofenil)]-1H- imidazolio		261-351-5 281-291-3	58594-72-2 83918-57-4	Xn; R22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-50/53 S: (2-)26-36/37/39-45- 60-61	C 50 %: C, Xn, N; R22-34-43-50-53 30 % < C ≤ 50 %: Xn, N; R22-38-41-43- 50-53 25 % ≤ C ≤ 30 %: Xn, N; R22-41-43-50- 53 15 % < C < 25 %: Xi, N; R41-43-51-53 5 % ≤ C ≤ 15 %: Xi, N; R36-43-51-53 2,5 % ≤ C < 5 %: Xi, N; R43-51-53 1 % ≤ C < 2,5 %: Xi; R43-52-53 0,25 % ≤ C < 1 %: R52-53	
613-208-00-7	imazamox		—	114311-32-9	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
613-209-00-2	cis-1-(3-cloropropil)-2,6-dimetilpiperidina cloridrato		417-430-3	63645-17-0	T; R25 Xn; R48/22 R43 N; R51-53	T; N R: 25-43-48/22-51/53 S: (1/2-)22-36/37-45-61		
613-210-00-8	2-(3-cloropropil)-2,5,5-trimetil-1,3-diossano		417-650-1	88128-57-8	Xn; R48/22 R52-53	Xn R: 48/22-52/53 S: (2-)23-25-36-61		
613-211-00-3	metilsolfato di N-metil-4-(p-formilstiril)piridinio		418-240-3	74401-04-0	R43 R52-53	Xi R: 43-52/53 S: (2-)22-24-37-61		
613-212-00-9	4-[4-(2-etilesilossi)fenil](1,4-tiazinan-1,1-diossido)		418-320-8	133467-41-1	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)22-60-61		
613-213-00-4	cis-1-benzoil-4-[(4-metilsolfonil)ossi]-L-prolina		416-040-0	120807-02-5	R 52-53	R: 52/53 S: 61		
613-214-00-X	N,N-di-n-butil-2-(1,2-diidro-3-idrossi-6-isopropil-2-chinolilidene)-1,3-diossoindan-5-carbosammide		416-260-7	147613-95-4	R 53	R: 53 S: 61		
613-215-00-5	cloruro di 2-clorometil-3,4-dimetossipiridinio		416-440-5	72830-09-2	Xn; R21/22-48/22 Xi; R38-41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 21/22-38-41-43-48/ 22-51/53 S: (2-)26-36/37/39-61		
613-216-00-0	6-terz-butil-7-(6-dietilammino-2-metil-3-piridilimino)-3-(3-metilfenil)pirazolo[3,2-c][1,2,4]triazolo		416-490-8	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-217-00-6	4-[3-(3,5-di-terz-butil-4-idrossifenil)propionilossi]-1-[2-[3-(3,5-di-terz-butil-4-idrofenil)propionilossi]etil]-2,2,6,6-tetrametilpiperidina		416-770-1	73754-27-5	R 53	R: 53 S: 61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
613-218-00-1	6-idrossiindolo		417-020-4	2380-86-1	Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53	Xn; N R: 22-41-43-51/53 S: (2-)24-26-37/39-61		
613-219-00-7	7a-etil-3,5-bis(1-metiletil)-2,3,4,5-tetraidroossazolo[3,4-c]-2,3,4,5-tetraidroossazolo		417-140-7	79185-77-6	Xi; R38 N; R51-53	Xi; N R: 38-51/53 S: (2-)37-61		
613-220-00-2	trans-(4S,6S)-5,6-diidro-6-metil-4H-tieno[2,3-b]tiopiran-4-olo 7,7-diossido		417-290-3	147086-81-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)36		
613-221-00-8	2-cloro-5-metil-piridina		418-050-0	18368-64-4	Xn; R21/22 Xi; R38 R52-53	Xn R: 21/22-38-52/53 S: (2-)23-25-36/37-61		
613-222-00-3	4-(1-osso-2-propenil)-morfolina		418-140-1	5117-12-4	Xn; R22-48/22 Xi; R41 R43	Xn R: 22-41-43-48/22 S: (2-)23-26-36/37/39		
613-223-00-9	N-isopropil-3-(4-fluorofenil)-1H-indolo		418-790-4	93957-49-4	R 53	R: 53 S: 61		
613-224-00-4	2,5-dimercaptometil-1,4-ditiano		419-770-8	136122-15-1	Xn; R22 C; R34 R43 N; R50-53	C; N R: 22-34-43-50/53 S: (1/2-)26-36/37/39-45-60-61		
613-225-00-X	Miscela di:[2-(antrachinon-1-ilammino)-6-[(5-benzoilammino)-antrachinon-1-ilammino]-4-fenil]-1,3,5-triazina 2,6-bis-[(5-benzoilammino)-antrachinon-1-ilammino]-4-fenil-1,3,5-triazina.		421-290-9	—	Xn; R48/22 R53	Xn R: 48/22-53 S: (2-)22-36-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
613-226-00-5	dicloruro di 1-(2-(etil(4-(4-(4-(etil(2-piridinoetil)ammino)-2-metilfenilazo)benzoilammino)-fenilazo)-3-metilfenil)ammino)etil-piridinio		420-950-3	163831-67-2	Xi; R41 N; R50-53	Xi; N R: 41-50/53 S: (2-)26-39-60-61		
613-227-00-0	(+/-)-[(R*,R*) e (R*,S*)]-6-fluoro-3,4-diidro-2-ossiranil-2H-1-benzopirano		419-600-2	—	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-28-36/37-61		
613-228-00-6	(+/-)-(R*,S*)-6-fluoro-3,4-diidro-2-ossiranil-2H-1-benzopirano		419-630-6	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 24-61		
613-230-00-7	florasulam (ISO) 2',6',8-trifluoro-5-metossi-5-triazolo[1,5-c] pirimidin-2-sulfonanilide		—	145701-23-1	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
613-233-00-3	4,4'-(ossi-(bismetilen))-bis-1,3-diossolano		423-230-7	56552-15-9	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
614-028-00-1	Miscela di: mono-D-glucopiranoside di 2-etilesile di-D-glucopiranoside di 2-etilesile		414-420-0	—	Xi; R41	Xi R: 41 S: (2-)26-39		
614-029-00-7	Isomeri strutturalidel penta-O-allil-β-D-fruttofuranosil-α-D-glucopiranoside Isomeri strutturalidel'esa-O-allil-β-D-fruttofuranosil-α-D-glucopiranoside Isomeri strutturalidel'epta-O-allil-β-D-fruttofuranosil-α-D-glucopiranoside		419-640-0	68784-14-5	Xn; R22	Xn R: 22 S: (2-)		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
615-030-00-5	alcali, sali di terre alcaline e altri sali dell'acido tiocianico non presenti altrove in questo Allegato	A	—	—	Xn; R20/21/22 R32 R52-53	Xn R: 20/21/22-32-52/53 S: (2-)13-61		
615-031-00-0	tallio sali dell'acido tiocianico	A	222-571-7	3535-84-0	Xn; R20/21/22 R32 N; R51-53	Xn; N R: 20/21/22-32-51/53 S: (2-)13-61		
615-032-00-6	Sali metallici dell'acido tiocianico non presenti altrove in questo Allegato	A	—	—	Xn; R20/21/22 R32 N; R50-53	Xn; N R: 20/21/22-32-50/53 S: (2-)13-60-61		
616-092-00-6	Prodotto di reazione polimerica di biciclo[2.2.1]hepta-2,5-diene, etene, 1,4-esadiene, 1-propene con N,N-di-2-propenilformamide		404-035-6	—	R 43 R 53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
616-093-00-1	Prodotti di reazione di: condensato di anilina, tereftalaldeide e o-toluidina con anidride maleica		406-620-1	129217-90-9	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
616-094-00-7	3,3'-dicicloesil-1,1'-metilene-bis(4,1-fenilene)diurea		406-370-3	58890-25-8	R 43 R 53	Xi R: 43-53 S: (2-)24-37-61		
616-095-00-2	3,3'-diottadecil-1,1'-metilene-bis(4,1-fenilene)diurea		406-690-3	43136-14-7	R 53	R: 53 S: 61		
616-096-00-8	N-(3-esadecilossi-2-idrossiprop-1-il)-N-(2-idrossietil)palmitamide		408-110-4	110483-07-3	R 53	R: 53 S: 61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
616-097-00-3	N,N'-1,4-fenilenebis(2-((2-metossi-4-nitrofenil)azo)-3-osso-butanammide		411-840-6	83372-55-8	R 53	R: 53 S: 61		
616-098-00-9	1-[4-cloro-3-((2,2,3,3,3-pentafluoroproossi)metil)fenil]-5-fenil-1H-1,2,4-triazol-3-carbosammide		411-750-7	119126-15-7	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
616-099-00-4	2-[4-[(4-idrossifenil)solfonil]fenossi]-4,4-dimetil-N-[5-[(metilsolfonil)amino]-2-[4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenossi]fenil]-3-ossopentanammide		414-170-2	135937-20-1	R 53	R: 53 S: 61		
616-100-00-8	1,3-dimetil-1,3-bis(trimetilsilil) urea		414-180-7	10218-17-4	Xn; R22 Xi; R38	Xn R: 22-38 S: (2-)36/37		
616-101-00-3	(S)-N-terz-butil-1,2,3,4-tetraidro-3-isochinolincarbosammide		414-600-9	149182-72-9	Xn; R22 R 52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)61		
616-102-00-9	Miscela di: α-[3-(3-mercaptopropanossicarbonilammino)metilfenilamminocarbonil]-ω-[3-(3-mercaptopropanossicarbonilammino)metilfenilamminocarbonil]-poli-(ossietilene-copolimero-ossipropilene) 1,2-(o 1,3-)bis[α-(3-mercaptopropanossicarbonilammino)metilfenilamminocarbonil]-ω-ossi-poli-(ossietilene-copolimero-ossipropilene)]-3-(o 2-)propanolo 1,2,3-tris[α-(3-mercaptopropanossicarbonil-ammino)metilfenilamminocarbonil]-ω-ossi-poli-(ossietilene-copolimero-ossipropilene)]propano]		415-870-0	—	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)36/37-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
616-103-00-4	(S,S)-trans-4-(acetilammino)-5,6-diidro-6-metil-7,7-diosso-4H-tieno[2,3-b]tiopiran-2-solfonamide		415-030-3	120298-38-6	R43 N; R50-53	Xi; N R: 43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
616-104-00-X	benalaxyl metil N-(2,6-dimetilfenil)-N-(fenilacetil)-DL-alaninato		275-728-7	71626-11-4	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-105-00-5	clorotoluron 3-(3-cloro-p-tolil)-1,1-dimetilurea		239-592-2	15545-48-9	Carc. Cat. 3; R40 Repr. Cat. 3; R63 N; R50-53	Xn; N R: 40-63-50/53 S: (2-)36/37-26-46-60-61		
616-106-00-0	fenmedifam (ISO) metil 3-(3-metilcarbanilossi)-carbanilato		237-199-0	13684-63-4	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-108-00-1	iodosulfuron-metil-sodio		—	144550-36-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-109-00-7	sulfosulfuron 1-(4,6-dimetossipirimidin-2-il)-3-(2-etilsulfonilimidazo[1,2-a]piridin-3-il)sulfonilurea		—	141776-32-1	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-110-00-2	ciclanilide acido 1-(2,4-dicloroanilinocarbo-nil)ciclopropancarbossilico		419-150-7	113136-77-9	Xn; R22 N; R51-53	Xn; N R: 22-51/53 S: (2-)61		
616-111-00-8	fenhexamid		422-530-5	126833-17-8	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
616-112-00-3	oxasulfuron ossetan-3-il 2-[(4,6-dimetilpirimidin-2-il)-carbamoilsulfamoil]-benzoato		—	144651-06-9	Xn; R48/22 N; R50-53	Xn; N R: 48/22-50/53 S: (2-)46-60-61		
616-113-00-9	desmedipham ethyl 3-fenilcarbamoilossifenil-carbammato		237-198-5	13684-56-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61	C ≥ 2,5 %: N; R50/53 0,25 % ≤ C < 2,5 %: N; R51/53 0,025 % ≤ C < 0,25 %: R52/53	
616-114-00-4	N,N'-(9,9',10,10'-tetraidro-9,9',10,10'-tetraosso(1,1'-biantracen)-4,4'-diil)-bis-dodecanamide		418-010-2	136897-58-0	R53	R: 53 S: 22-61		
616-115-00-X	N-(3-acetil-2-idrossifenil)-4-(4-fenilbutossi)benzammide		416-150-9	136450-06-1	R 53	R: 53 S: 61		
616-116-00-5	N-(4-dimetilamminopiridinio)-3-metossi-4-(1-metil-5-nitroindol-3-ilmetil)-N-(o-tolilsolfonil)benzamidato		416-790-9	—	R 53	R: 53 S: 61		
616-117-00-0	N-[2-(3-acetil-5-nitrotiofen-2-ilazo)-5-dietilamminofenil]acetammide		416-860-9	—	Repr.Cat.3; R62 R43 N; R50-53	Xn; N R: 43-62-50/53 S: (2-)22-36/37-60-61		
616-118-00-6	cloridrato di N-(2',6'-dimetilfenil)-2-piperidincarbossammide		417-950-0	65797-42-4	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61		
616-119-00-1	2-(1-butil-3,5-diosso-2-fenil-(1,2,4)-triazolidin-4-il)-4,4-dimetil-3-osso-N-(2-metossi-5-(2-(dodecil-1-solfonil))propionilammino)-fenil-pentanammide		418-060-5	118020-93-2	R 53	R: 53 S: 61		
616-120-00-7	Miscela di: N-(3-dimetilammino-4-metil-fenil)-benzammide N-(3-dimetilammino-2-metil-fenil)-benzammide N-(3-dimetilammino-3-metil-fenil)-benzammide		420-600-1	—	Xn; R48/22 N; R51-53	Xn; N R: 48/22-51/53 S: (2-)36/37-61		
616-121-00-2	2,4-diidrossi-N-(2-metossifenil)-benzammide		419-090-1	129205-19-2	R 43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
616-123-00-3	N-[3-[[4-(dietilammino)-2-metilfenil]imino]-6-osso-1,4-cicloesa-dienil]acetammide		414-740-0	96141-86-5	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-124-00-9	bis(trifluorometilsolfonil)imide di litio		415-300-0	90076-65-6	T; R24/25 C; R34 R 52-53	T R: 24/25-34-52/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-61		
616-125-00-4	3-ciano-N-(1,1-dimetil)androsta-3,5-diene-17-β-carbossammide		415-730-9	151338-11-3	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		
616-127-00-5	Miscela di: N,N'-etan-1,2-diilbis(decanamamide) 12-idrossi-N-[2-[1-ossidecilammino]etil]ottadecanamamide N,N'-etan-1,2-diilbis(12-idrossiottadecanamamide)		430-050-2	—	R43 N; R51-53	Xi; N R: 43-51/53 S: (2-)24-37-61		
616-128-00-0	N-(2-(1-allil-4,5-dicianoimidazol-2-ilazo)-5-(dipropilammino)fenil)-acetammide		417-530-7	123590-00-1	R53	R: 53 S: 61		
616-129-00-6	N,N'-bis(2,2,6,6-tetrametil-4-piperidil)isofaltammide		419-710-0	42774-15-2	Xn; R22 Xi; R36	Xn R: 22-36 S: (2-)22-25-26		
616-130-00-1	N-(3-(2-(4,4-dimetil-2,5-diossoimidazolin-1-il)-4,4-dimetil-3-osso-pentanoilammino)-4-metossi-fenil)- ottadecanamamide		421-780-2	150919-56-5	R53	R: 53 S: 61		
616-132-00-2	N-[4-(4-ciano-2-furfuriliden-2,5-diidro-5-osso-3-furil)fenil]butan-1-solfonammide		423-250-6	130016-98-7	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
616-133-00-8	N-cicloesil-S,S-diossobenzo[b]-tiofen-2-carbossammide		423-990-1	149118-66-1	Xn; R22 Xi; R41 N; R50-53	Xn; N R: 22-41-50/53 S: (2-)22-26-39-60-61		
616-134-00-3	3,3'-bis(diottilossitiofosfinoilto)-N,N'-ossibis(metilen)dipropionammide		401-820-5	—	R52-53	R: 52/53 S: 61		
616-135-00-9	(3S,4aS,8aS)-2-[(2R,3S)-3-ammino-2-idrossi-4-fenilbutil]-N-terz-butildecaidroisochinolina-3-carbossammide		430-230-0	136522-17-3	Xn; R22 R52-53	Xn R: 22-52/53 S: (2-)22-61		
616-142-00-7	1,3-bis(vinilsolfonilacetammido)propano		428-350-3	93629-90-4	Muta.Cat.3; R68 Xi; R41 R 43 R 52-53	Xn R: 41-43-68-52/53 S: (2-)22-26-36/37/39-61		
616-143-00-2	N,N'-diesadecil-N,N'-bis(2-idrossietil)propandiammide		422-560-9	149591-38-8	Xn; Repr. Cat. 3; R62 Xi; R36 R53	Xn R: 62-36-53 S: (2-)26-36/37-61		
617-018-00-5	Miscela di: perossido di 1-metil-1-(3-(1-metiletil)fenil)etil-1-metil-1-feniletil, 63 % in peso perossido di 1-metil-1-(4-(1-metiletil)fenil)etil-1-metil-1-feniletil, 31 % in peso		410-840-3	71566-50-2	O; R7 N; R51-53	O; N R: 7-51/53 S: (2-)3/7-14-36/37/39-61		
617-019-00-0	acido 6-(ftalimmido)perossiesanoico		410-850-8	128275-31-0	O; R7 Xi; R41 N; R50	O; Xi; N R: 7-41-50 S: (2-)3/7-14-26-36/37/39-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
617-020-00-6	bis(neodecanoilperossido) di 1,3-di(prop-2,2-diil)benzene		420-060-5	117663-11-3	R10 O; R7 N; R51-53	O; N R: 7-10-51/53 S: (2-)7-14-36/37/39-47-61		
650-042-00-4	Prodotti di reazione di: polietilen-poliammmina-(C16-C18)-alchilammidi con monotio-(C2)-alchil fosfonati		417-450-2	—	Xi; R36/38 R43 R52-53	Xi R: 36/38-43-52/53 S: (2-)24-26-37-61		
650-043-00-X	Prodotti di reazione di: acido 3,5-bis-terz-butilsalicilico e solfato di alluminio		420-310-3	—	Xn; R22 N; R50-53	Xn; N R: 22-50/53 S: (2-)22-56-60-61		
650-044-00-5	miscela di alcoli C14-15 lineari e ramificati etossilati, prodotto di reazione con epicloridrina		420-480-9	158570-99-1	Xi; R38 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-43-50/53 S: (2-)24-37-60-61		
650-045-00-0	Prodotto di reazione di: acido 1,2,3-propantricarbossilico, 2-idrossi, estere dietilico, 1-propanolo e zirconio tetra-n-propossido		417-110-3	—	F; R11 Xi; R38-41 N; R51-53	F; Xi; N R: 11-38-41-51/53 S: (2-)9-16-26-37/39-61		
650-046-00-6	derivati (29H,31H-N29,N30,N31,N32) disolfonamido ftalocianin-disolfonato cuprato(2-)complesso di(tetrametilammonio)		416-180-2	—	Xn; R22-48/22 N; R51-53	Xn; N R: 22-48/22-51/53 S: (2-)22-36-61		
650-047-00-1	esafluoroantimoniato di dibenzilfenilsolfonio		417-760-8	134164-24-2	T; R48/25 Xn; R22 Xi; R41 R43 N; R51-53	T; N R: 22-41-43-48/25-51/53 S: (1/2-)22-26-36/37/39-45-61		

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
650-048-00-7	Prodotto di reazione di: borace, perossido di idrogeno, anidride acetica e acido acetico		420-070-1	—	O; R7 Xn; R20/21/22 C; R35 N; R50	O; C; N R: 7-20/21/22-35-50 S: (1/2-3)/7-14-26-36/ 37/39-45-61		
650-049-00-2	2-alcossi-ossietil-idrogenomaleato, dove l'alcossile è rappresentato (in peso) dal 70 al 85 % di ottadecanolato insaturo, dallo 0.5 al 10 % di ottadecanolato saturo, e dal 2 al 18 % di esadecanolato saturo		417-960-5	—	Xi; R38-41 R43 N; R50-53	Xi; N R: 38-41-43-50/53 S: (2-)24-26-37/39-60-61		
650-050-00-8	Miscela di: 1-metil-3-idrossipropil 3,5-[1,1-dimetiletil]-4-idrossidiidro-cinnammato e/o 3-idrossibutil 3,5-[1,1-dimetiletil]-4-idrossidiidrocinnammato Isomeri di 1,3-butandiolo bis[3-(3'-(1,1-dimetiletil)4'-idrossifenil)propionato] isomeri di 1,3-butandiolo bis[3-(3',5'-(1,1-dimetiletil)-4'-idrossifenil)propionato]		423-600-8	—	N; R51-53	N R: 51/53 S: 61		
650-055-00-5	idrogenofosfato di argento sodio e zirconio		422-570-3	—	N; R50-53	N R: 50/53 S: 60-61»		

ALLEGATO 1D

Index No	nome della sostanza chimica	Note relative alle sostanze	EC No	CAS No	Classificazione	Etichettatura	Limiti di concentrazione	Note relative ai preparati
«048-002-00-0	cadmio (stabilizzata) [1] cadmio ossido (stabilizzata) [2]	E	231-152-8 [1] 215-146-2 [2]	7440-43-9 [1] 1306-19-0 [2]	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62-63 T; R48/23/25 T+; R26 N; R50-53	T+; N R: 45-26-48/23/25-62-63-68-50/53 S: 53-45-60-61		
048-011-00-X	cadmio (piroforico)	E	231-152-8	7440-43-9	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 3; R68 Repr. Cat. 3; R62-63 T; R48/23/25 T+; R26 F; R17 N; R50-53	F; T+; N R: 45-17-26-48/23/25-62-63-68-50/53 S: 53-45-7/8-43-60-61		
609-006-00-3	4-nitrotoluene p-nitrotoluolo	C	202-808-0	99-99-0	T; R23/24/25 R33 N; R51/53	T; N R: 23/24/25-33-51/53 S: (1/2-)28-37-45-61		
609-065-00-5	2-nitrotoluene o-nitrotoluolo	E	201-853-3	88-72-2	Carc. Cat. 2; R45 Muta. Cat. 2; R46 Repr. Cat. 3; R62 Xn; R22 N; R51-53	T; N R: 45-46-22-62-51/53 S: 53-45-61		
612-039-00-6	2-etossianilina o-fenetidina	C	202-356-4	94-70-2	T; R23/24/25 R33	T R: 23/24/25-33 S: (1/2-)28-36/37-45		
612-207-00-9	4-etossianilina p-fenetidina		205-855-5	156-43-4	Muta. Cat. 3; R68 Xn; R20/21/22 Xi; R36 R43	Xn R: 20/21/22-36-43-68 S: (2-)36/37-46»		

ALLEGATO 2A

«A.21. PROPRIETÀ COMBURENTI (LIQUIDI)

1. METODO

1.1 INTRODUZIONE

Il presente metodo di test è disegnato per misurare il potenziale che una sostanza liquida ha di aumentare la velocità o l'intensità di combustione di una sostanza combustibile, o di formare con una sostanza combustibile una miscela capace di autoaccensione, quando le due sostanze vengono perfettamente miscelate. Il metodo si basa sul test ONU per i liquidi comburenti (1) ed è equivalente ad esso. Poiché tuttavia il presente metodo A.21 deve fundamentalmente soddisfare i requisiti della direttiva 67/548/CEE, esso può limitarsi a richiedere solo un confronto con un'unica sostanza di riferimento. L'analisi e il confronto con altre sostanze di riferimento possono risultare necessari quando occorre utilizzare i risultati del test per altri scopi (1).

Non occorre eseguire questo test quando l'esame della formula di struttura conferma oltre ogni ragionevole dubbio che la sostanza non è in grado di reagire esotermicamente con un materiale combustibile.

Prima di eseguire il test è utile possedere informazioni preliminari su eventuali potenziali proprietà esplosive della sostanza.

Il test non è applicabile a solidi, gas, sostanze esplosive o altamente infiammabili, né a perossidi organici.

L'esecuzione di questo test può essere evitata qualora la sostanza in esame sia già stata analizzata con il test ONU sui liquidi comburenti (1).

1.2 DEFINIZIONI E UNITÀ

Per **tempo medio di aumento della pressione** si intende la media dei tempi misurati perché una miscela in esame produca un aumento della pressione da 690 kPa a 2 070 kPa in autoclave.

1.3 SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Come sostanza di riferimento si utilizza acido nitrico acquoso al 65 % (p/p) (grado analitico) (2).

A scelta, se lo sperimentatore prevede che i risultati di questo test possano alla fine essere impiegati per altri scopi (1), può risultare appropriato eseguire il test anche con altre sostanze di riferimento (3).

1.4 PRINCIPIO DEL METODO UTILIZZATO

Il liquido da sottoporre a test viene miscelato con cellulosa fibrosa in rapporto 1:1 (per massa) e introdotto in un recipiente a pressione. Se durante la miscelatura o il riempimento si verifica un'accensione spontanea non occorre proseguire il test.

Se non si verifica un'accensione spontanea il test va eseguito interamente. Dopo aver riscaldato la miscela in un recipiente a pressione si misura il tempo medio di aumento della pressione da 690 kPa a 2 070 kPa in autoclave, infine si confronta il risultato con il tempo medio di aumento della pressione rilevato per la miscela 1:1 della/e sostanza/e di riferimento con cellulosa.

(1) Come, per esempio, nell'ambito della normativa ONU sui trasporti.

(2) L'acido va titolato prima del test per confermarne la concentrazione.

(3) Ad es.: nello studio di cui alla voce bibliografica 1 vengono usati acido perclorico al 50 % (p/p) e clorato di sodio al 40 % (p/p).

1.5 CRITERI DI QUALITÀ

In una serie di cinque prove eseguite su un'unica sostanza i risultati non devono differire di oltre il 30 % dalla media aritmetica; in caso contrario vanno scartati. Se ciò dovesse succedere, occorre provvedere a migliorare la procedura di miscelazione e di riempimento prima di ripetere il test.

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO

1.6.1 **Preparazione**1.6.1.1 *Sostanza combustibile*

Come materiale combustibile viene impiegata cellulosa essiccata fibrosa con fibre di lunghezza compresa fra 50 e 250 μm e diametro medio di 25 μm ⁽⁴⁾. L'essiccazione avviene a peso costante formando uno strato di spessore non superiore a 25 mm, ad una temperatura di 105 °C per un periodo di 4 ore. La sostanza viene dunque conservata in un essiccatore in presenza di un essiccante nella fase di raffreddamento e comunque fino al momento del suo utilizzo. Il tenore di acqua della cellulosa essiccata deve essere inferiore allo 0,5 % della massa secca ⁽⁵⁾, eventualmente, se necessario, prolungando il tempo di essiccazione ⁽⁶⁾. Per tutto il test va utilizzato un unico lotto di cellulosa.

1.6.1.2 *Apparecchiatura*1.6.1.2.1 *Recipiente a pressione*

Si utilizza un recipiente a pressione formato da un cilindro di acciaio lungo 89 mm e avente un diametro esterno di 60 mm (vedi figura 1). Sui lati opposti occorre lavorare due superfici piane (che riducono la sezione trasversale del recipiente a 50 mm) per facilitare la presa mentre si preparano la spina di accensione e il tappo-sfiatatoio. Il recipiente, che ha un diametro interno di 20 mm, presenta alle due estremità una smussatura interna per una profondità di 19 mm ed è filettato in modo da accomodare filettature British Standard Pipe (BSP) da 1" o l'equivalente metrico. Un limitatore di pressione, formato da un braccio laterale, è avvitato sul lato curvo del recipiente a pressione a 35 mm da una delle estremità e a 90° rispetto alle superfici piane lavorate. L'incavo per il limitatore è perforato per una profondità di 12 mm e filettato in modo da accomodare il filo del BSP da 1/2" (o l'equivalente metrico) all'estremità del braccio laterale. Se necessario si inserisce un sigillo di materiale inerte per assicurare la tenuta stagna contro la fuoriuscita di gas. Il braccio laterale si estende per 55 mm oltre il corpo del recipiente a pressione e presenta un foro di 6 mm. L'estremità del braccio laterale è smussata e filettata in modo da accomodare un trasduttore di pressione del tipo a membrana. È possibile utilizzare qualunque tipo di misuratore di pressione, a condizione che non sia sensibile alla temperatura dei gas o ai prodotti della decomposizione e che sia in grado di rilevare l'aumento di pressione tra 690 e 2 070 kPa in meno di 5 millisecondi.

L'estremità del recipiente a pressione più lontana dal braccio laterale è chiusa con la spina di accensione provvista di due elettrodi, uno isolato dal corpo della spina e l'altro collegato a massa. L'altra estremità del recipiente a pressione è chiusa da un disco di rottura (pressione di scoppio di circa 2 200 kPa) mantenuto in sede con un tappo di ritenuta provvisto di un'apertura di 20 mm. Se necessario la spina di accensione può essere dotata di un sigillo di materiale inerte per assicurare la tenuta stagna contro la fuoriuscita di gas. Una base appoggio (figura 2) mantiene l'assemblato nella posizione corretta durante l'utilizzo. In genere si ricorre ad una piastra di base in acciaio dolce di 235 mm x 184 mm x 6 mm provvista di un profilato cavo di 185 mm di lunghezza a sezione quadra di dimensioni di 70 mm x 70 mm x 4 mm.

Da ciascuno dei lati opposti di un'estremità del profilato viene tagliata una sezione, in modo da formare una struttura a due gambe con i lati piatti sormontata da un tratto di profilato a sezione intatta della lunghezza di 86 mm. Le estremità di questi lati piatti sono tagliate ad angolo di 60° in orizzontale e sono saldate alla piastra di base. In un lato dell'estremità superiore della sezione della base viene eseguita una scanalatura di 22 mm di larghezza x 46 mm di profondità tale che, quando l'assemblato del recipiente a pressione viene calato dal lato dell'estremità della spina di accensione nel supporto del profilato squadrato, il braccio laterale possa inserirsi nella scanalatura. Un pezzo di acciaio largo 30 mm e spesso 6 mm viene saldato al lato inferiore interno della sezione quadra per fungere da distanziatore. Due viti a testa piatta da 7 mm inserite nella faccia opposta servono a mantenere fisso in posizione il recipiente a pressione. Due strisce d'acciaio larghe 12 mm e spesse 6 mm, saldate alle parti laterali lungo la base della sezione quadra, sostengono il recipiente a pressione dal di sotto.

⁽⁴⁾ Ad es. Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, numero catalogo 4021 050.

⁽⁵⁾ Confermato (ad esempio) con titolazione di Karl-Fisher.

⁽⁶⁾ In alternativa è possibile ottenere questo livello di umidità mediante (ad esempio) riscaldamento a 105 °C sotto vuoto per 24 h.

1.6.1.2.2 *Sistema di accensione*

Il sistema di accensione è formato da un filo in Ni/Cr lungo 25 cm con diametro di 0,6 mm e resistenza di 3,85 ohm/m. Mediante un'asta del diametro di 5 mm, il filo è arrotolato a formare una bobina ed è collegato agli elettrodi della spina di accensione. La bobina deve avere una delle configurazioni mostrate nella figura 3. La distanza fra il fondo del recipiente e la parte inferiore della bobina di accensione deve essere preferibilmente di 20 mm. Se gli elettrodi non sono regolabili, le estremità del filo di accensione fra la bobina e il fondo del recipiente vanno isolate con una guaina in ceramica. Il filo è riscaldato da un alimentatore a corrente continua di almeno 10 A.

1.6.2 **Esecuzione del test** ⁽⁷⁾

L'apparecchiatura, assemblata con il trasduttore di pressione e il sistema di riscaldamento ma senza il disco di rottura posizionato, viene appoggiata con il lato della spina di accensione verso il basso. In un bicchiere di vetro si mescolano 2,5 g del liquido da esaminare con 2,5 g di cellulosa essiccata, utilizzando un agitatore in vetro ⁽⁸⁾. Per sicurezza, quando si mescolano le due sostanze occorre inserire uno schermo di protezione fra l'operatore e la miscela. Se la miscela si incendia durante il mescolamento o il riempimento, non occorre proseguire il test. La miscela va versata nel recipiente a pressione in piccole quantità, tamburellando sul contenitore e facendo in modo che essa si concentri intorno alla bobina di accensione e sia perfettamente a contatto con essa. È importante che durante questo processo di impaccamento la bobina non venga deformata per evitare risultati falsati ⁽⁹⁾. Il disco di rottura viene messo in posizione e il tappo di ritenuta viene avvitato saldamente. Il recipiente carico viene trasferito sulla base di appoggio per l'accensione, con il disco di rottura in alto e il tutto viene sistemato in un apposito armadio aspirato corazzato da laboratorio o in una camera di scoppio. L'alimentatore viene collegato ai terminali esterni della spina di accensione e impostato su 10 A. Il tempo fra l'inizio della miscelazione e l'accensione dell'alimentatore non deve superare i 10 minuti.

Il segnale prodotto dal trasduttore di pressione viene registrato mediante sistema apposito che consenta sia la valutazione dei dati, sia la generazione di un registro permanente del profilo tempo-pressione ottenuto (ad esempio un registratore di segnali transitori unito a un registratore su carta). La miscela viene scaldata fino a rottura del disco o finché siano trascorsi almeno 60 s. Se la rottura del disco non si verifica, occorre lasciare raffreddare la miscela prima di smontare con cautela l'apparecchiatura, prendendo precauzioni per tenere conto dell'eventuale pressurizzazione. In totale vengono eseguite cinque prove con la sostanza in esame e la/le sostanza/e di riferimento. Si rileva e registra il tempo impiegato dalla pressione per aumentare da 690 kPa a 2 070 kPa in autoclave. Infine si calcola il tempo medio di aumento della pressione.

In alcuni casi le sostanze possono generare un aumento di pressione eccessivamente alto o basso dovuto a reazioni chimiche che non caratterizzano le proprietà comburenti della sostanza in questione. In tali casi può essere necessario ripetere il test con una sostanza inerte, come la diatomite (terra a diatomee), in luogo della cellulosa, allo scopo di chiarire la natura della reazione.

2. **DATI**

Tempi di aumento della pressione sia per la sostanza in esame che per la/le sostanze di riferimento.

Tempi di aumento della pressione per la sostanza inerte eventualmente utilizzata.

2.1 **TRATTAMENTO DEI RISULTATI**

Si calcolano i tempi medi di aumento della pressione, sia per la sostanza in esame che per la/le sostanze di riferimento.

Si calcola il tempo medio di aumento della pressione per la sostanza inerte eventualmente utilizzata.

⁽⁷⁾ Le miscele di ossidanti con cellulosa vanno trattate come potenzialmente esplosive e maneggiate con la dovuta cautela.

⁽⁸⁾ In pratica occorre preparare una miscela 1:1 di liquido da esaminare e cellulosa in una quantità superiore a quella necessaria per il test e poi trasferirne 5 ± 0,1 g nel recipiente a pressione. La miscela deve essere preparata fresca per ciascun test.

⁽⁹⁾ In particolare occorre evitare il contatto fra le spire adiacenti della bobina.

La tabella 1 mostra alcuni esempi di risultati.

Tabella 1

Esempi di risultati ^(d)

Sostanza ^(c)	Tempo medio di aumento della pressione per una miscela 1:1 con cellulosa (ms)
Dicromato di ammonio, soluzione acquosa satura	20 800
Nitrato di calcio, soluzione acquosa satura	6 700
Nitrato di ferro, soluzione acquosa satura	4 133
Perclorato di litio, soluzione acquosa satura	1 686
Perclorato di magnesio, soluzione acquosa satura	777
Nitrato di nickel, soluzione acquosa satura	6 250
Acido nitrico, 65 %	4 767 ^(a)
Acido perclorico, 50 %	121 ^(a)
Acido perclorico, 55 %	59
Nitrato di potassio, soluzione acquosa al 30 %	26 690
Nitrato di argento, soluzione acquosa satura	— ^(b)
Clorato di sodio, soluzione acquosa al 40 %	2 555 ^(a)
Nitrato di sodio, soluzione acquosa al 45 %	4 133
<i>Sostanza inerte</i>	
Acqua:cellulosa	— ^(b)

^(a) Valore medio da studi comparativi interlaboratorio
^(b) Pressione massima di 2 070 kPa non raggiunta
^(c) Le soluzioni sature vanno preparate a 20 °C
^(d) Vedi voce bibliografica (1) per la classificazione in base al regime di trasporto ONU

3. **RELAZIONE**

3.1 RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

- identità, composizione, purezza, ecc. della sostanza di prova
- concentrazione della sostanza di prova
- procedura di essiccazione della cellulosa
- contenuto di acqua della cellulosa
- risultati delle misurazioni
- risultati degli eventuali test con sostanza inerte
- tempi medi calcolati di aumento della pressione
- eventuali deviazioni dal metodo descritto e motivazioni
- qualunque informazione od osservazione rilevante per l'interpretazione dei risultati

3.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI ⁽¹⁰⁾

I risultati del test devono essere valutati in base ai seguenti criteri:

- a) eventuale accensione spontanea della miscela formata dalla sostanza di prova e dalla cellulosa;
- b) confronto del tempo medio impiegato dalla pressione per aumentare da 690 kPa a 2 070 kPa con quello della/e sostanza/e di riferimento.

Una sostanza liquida è considerata comburente quando:

- a) una miscela 1:1, per massa, di sostanza e cellulosa prende fuoco spontaneamente; oppure
- b) una miscela 1:1, per massa, di sostanza e cellulosa presenta un tempo medio di aumento della pressione inferiore o uguale al tempo medio di aumento della pressione di una miscela 1:1, per massa, di acido nitrico acquoso al 65 % (p/p) e cellulosa.

Allo scopo di evitare un risultato falso positivo, in sede di interpretazione dei risultati occorre, se necessario, tenere conto anche dei risultati ottenuti testando la sostanza con un materiale inerte.

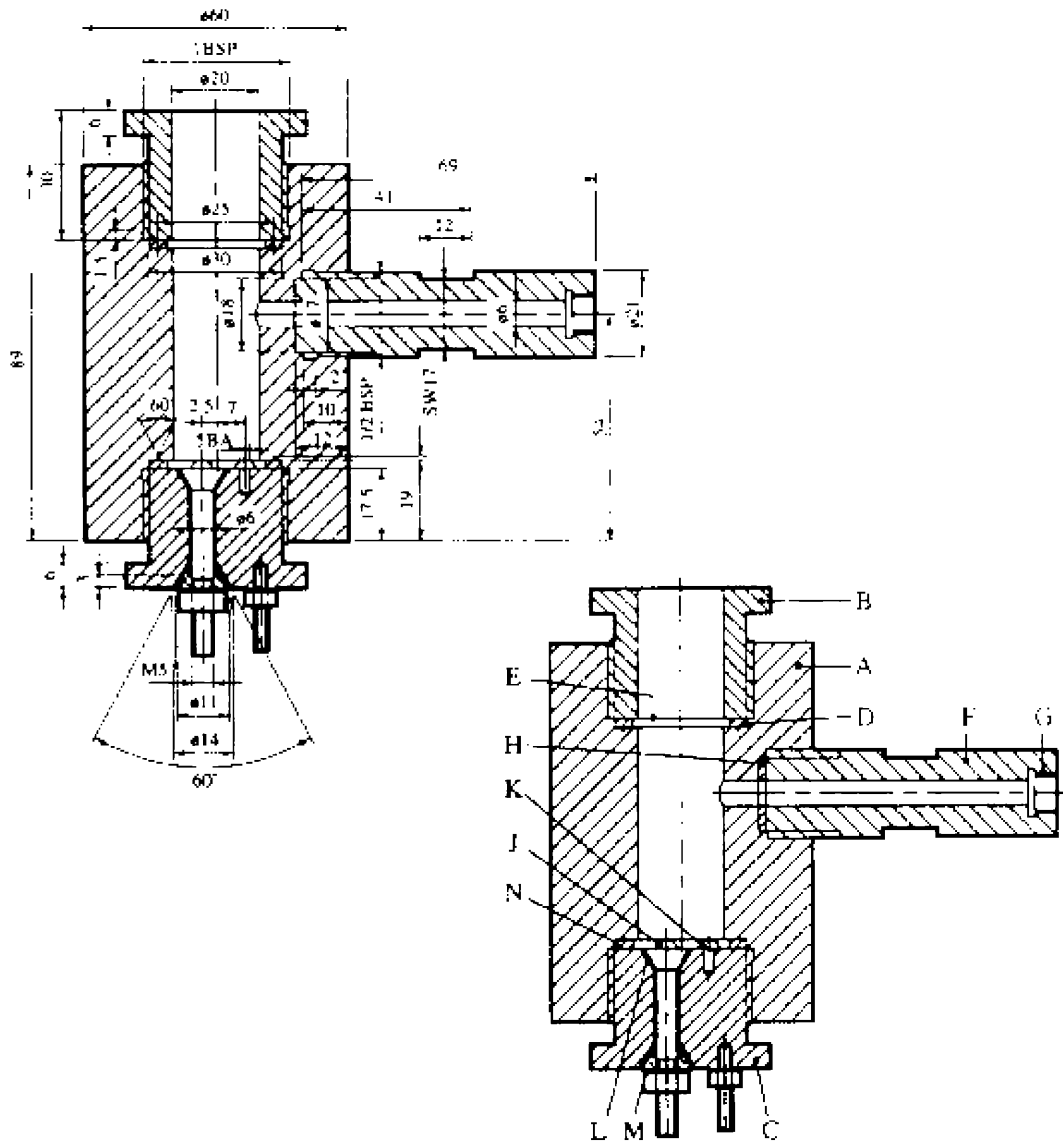
4. **BIBLIOGRAFIA**

- (1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, page 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

⁽¹⁰⁾ Vedi voce bibliografica 1 per l'interpretazione dei risultati in base alla normativa ONU sui trasporti con varie sostanze di riferimento.

Figura 1

Recipiente a pressione



- | | | |
|---|--|-------------------------|
| (A) Corpo del recipiente a pressione | (B) Tappo di ritenuta del disco di rottura | (C) Spina di accensione |
| (D) Rondella di piombo dolce | (E) Disco di rottura | (F) Braccio laterale |
| (G) Testa del trasduttore di pressione | (H) Rondella | (J) Elettrodo isolato |
| (K) Elettrodo collegato a terra | (L) Isolante | (M) Cono d'acciaio |
| (N) Scanalatura per deformazione rondella | | |

Figura 2

Base d'appoggio

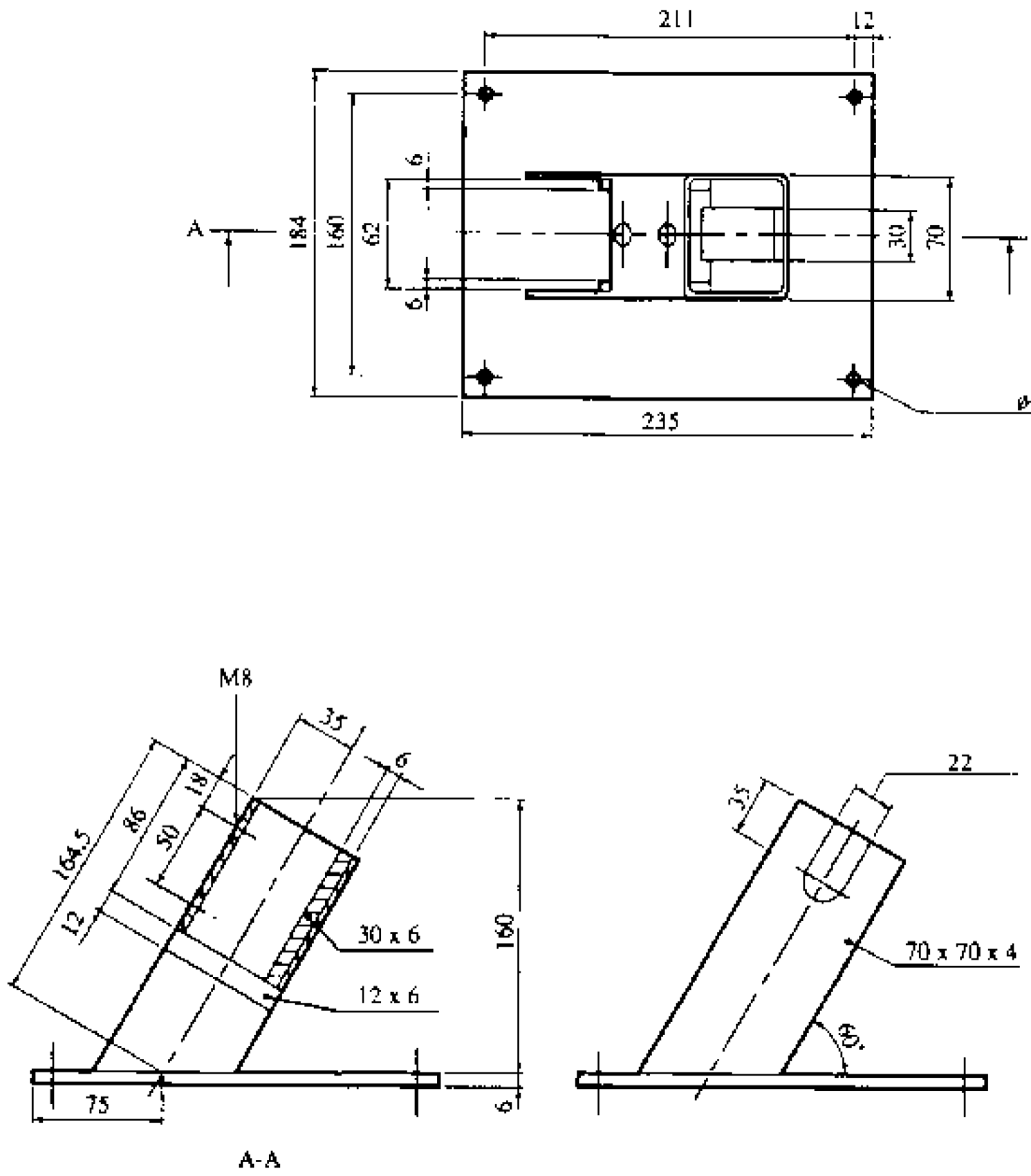
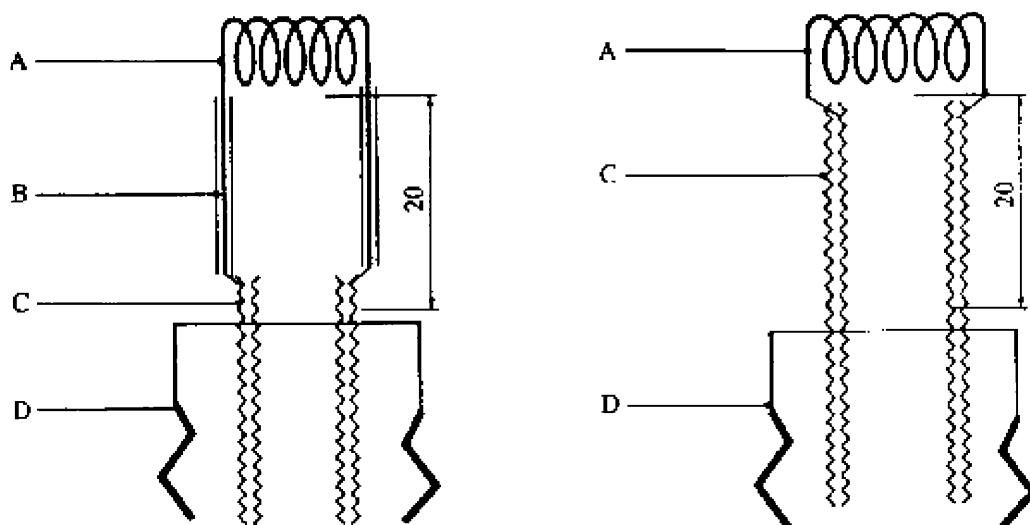


Figura 3

Sistema di accensione



(A) Bobina di accensione

(B) Isolante

(C) Elettrodi

(D) Spina di accensione

Nota: entrambe queste configurazioni possono essere utilizzate.»

ALLEGATO 2B

«B.1 bis. TOSSICITÀ ORALE ACUTA – METODO A DOSE FISSA

1. METODO

Questo metodo di prova è equivalente al metodo OCSE TG 420 (2001).

1.1 INTRODUZIONE

I metodi tradizionali di valutazione della tossicità acuta utilizzano come *endpoint* la morte degli animali. Nel 1984, la *British Toxicology Society* ha proposto un nuovo metodo, basato sulla somministrazione di una serie di dosi fisse (1), che invece di utilizzare come *endpoint* la morte degli animali prevede l'osservazione di segni evidenti di tossicità in seguito alla somministrazione di una dose facente parte di una serie prestabilita. In seguito a studi di validazione *in vivo* eseguiti nel Regno Unito (2) e a livello internazionale (3), il procedimento è stata adottato come metodo di prova nel 1992. Successivamente, le proprietà statistiche del metodo a dose fissa sono state oggetto di valutazione in una serie di studi basati sull'impiego di modelli matematici (4)(5)(6). Sia gli studi *in vivo* sia quelli di modellizzazione hanno dimostrato che il procedimento è riproducibile, utilizza un minor numero di animali provocando meno sofferenze rispetto ai metodi tradizionali, e permette di classificare le sostanze in maniera analoga agli altri metodi di prova della tossicità acuta.

Per indicazioni sulla scelta del metodo di prova più adatto per un determinato scopo, si rimanda alle linee guida OCSE sui test di tossicità orale acuta (7), che contengono ulteriori informazioni sull'esecuzione e sull'interpretazione del metodo di prova B.1bis.

Il metodo prevede che nello studio principale si utilizzino solo dosi a moderata tossicità, evitando di somministrare dosi che possano avere un effetto letale. Inoltre non è necessario somministrare dosi che provochino notoriamente dolore e sofferenze gravi per effetto dell'azione corrosiva o fortemente irritante. Gli animali moribondi o che manifestano dolore evidente o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e ai fini dell'interpretazione dei risultati devono essere assimilati agli animali morti durante lo svolgimento del test. I criteri da applicare per decidere la soppressione degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di specifiche linee guida, che indicano anche come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (8).

Il metodo fornisce informazioni sulla pericolosità della sostanza esaminata, permettendone la classificazione secondo il GHS (*Global Harmonized System*), sistema armonizzato su scala mondiale per la classificazione delle sostanze chimiche che causano tossicità acuta (9).

Prima di effettuare lo studio, il laboratorio che esegue il test deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza di prova, tra cui l'identità e la struttura chimica, le proprietà chimico-fisiche, i risultati di eventuali altri test di tossicità *in vitro* o *in vivo* eseguiti sulla sostanza, i dati tossicologici su sostanze strutturalmente affini, l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per provare a tutti i soggetti interessati l'adeguatezza del test per la protezione della salute umana e servono a scegliere la giusta dose iniziale.

1.2 DEFINIZIONI

Tossicità orale acuta: effetti avversi che si verificano in seguito alla somministrazione orale di una singola dose o di più dosi di una sostanza nell'arco di 24 ore.

Morte tardiva: termine usato per indicare che l'animale non muore né appare moribondo nelle 48 ore successive alla somministrazione, ma muore successivamente, durante il periodo di osservazione di 14 giorni.

Dose: quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso della sostanza di prova per unità di peso dell'animale sottoposto al test (ad es. mg/kg).

Tossicità manifesta: termine generale che indica la presenza di chiari segni di tossicità in seguito alla somministrazione della sostanza di prova [per alcuni esempi, cfr. (3)], tali da far prevedere alla dose fissa immediatamente superiori manifestazioni di dolore intenso e segni persistenti di grave sofferenza, uno stato di agonia [i criteri che definiscono tale stato sono illustrati nelle linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)] o la morte della maggior parte degli animali.

GHS (Globally Harmonized System): sistema armonizzato globale per la classificazione delle sostanze e delle miscele chimiche. Si tratta di un'iniziativa congiunta dell'OCSE (salute umana e ambiente), del Comitato di esperti delle Nazioni Unite sul trasporto delle merci pericolose (proprietà fisico-chimiche) e dell'Organizzazione internazionale del lavoro (comunicazione del rischio), coordinata dal programma IOMC per la gestione ottimale delle sostanze chimiche (*Inter-organization programme for the sound management of chemicals*).

Morte imminente: stato in cui si prevede l'agonia o la morte dell'animale prima della successiva osservazione in programma. Per i roditori tra i segni indicativi di morte imminente figurano le convulsioni, la posizione laterale o prona e il tremore [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)].

DL₅₀ (dose letale 50): la singola dose di sostanza, determinata statisticamente, capace di provocare la morte del 50 % degli animali a cui viene somministrata per via orale. Il valore della DL₅₀ viene espresso in peso della sostanza di prova per unità di peso dell'animale usato per il saggio (mg/kg).

Dose limite: dose corrispondente al limite superiore fissato per il test (2 000 o 5 000 mg/kg).

Stato di agonia: fase in cui l'animale è moribondo o non è in grado di sopravvivere, nemmeno se sottoposto a trattamento [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)].

Morte prevedibile: presenza di segni clinici, come ad esempio l'incapacità di raggiungere il cibo o l'acqua, che indicano che l'animale morirà prima della conclusione programmata dell'esperimento [per maggiori indicazioni, cfr. le linee guida OCSE citate in bibliografia al n. (8)].

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

La sostanza viene somministrata a gruppi di animali dello stesso sesso seguendo un procedimento articolato in più fasi successive che prevede la somministrazione di dosi fisse di 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg (in casi eccezionali può essere prevista una dose fissa aggiuntiva di 5 000 mg/kg; cfr. punto 1.6.2). Il livello di dose iniziale è scelto sulla base di uno studio di osservazione, ed è la dose alla quale si prevede che si manifestino alcuni segni di tossicità, senza tuttavia causare effetti tossici gravi o la morte degli animali. I segni clinici e le condizioni associate a dolore, sofferenza e morte imminente sono descritti in apposite linee guida OCSE (8). A seconda della presenza o dell'assenza di segni di tossicità o mortalità, la sostanza in esame può essere somministrata ad altri gruppi di animali a dosi superiori o inferiori. La procedura prosegue fino a quando viene identificata la dose che causa tossicità manifesta o la morte di un solo animale o fino alla somministrazione della dose più elevata, se non vengono riscontrati effetti, mentre viene immediatamente interrotta se si verificano decessi alla dose più bassa.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.4.1 Scelta delle specie animale

È preferibile utilizzare il ratto, ma è possibile ricorrere anche ad altre specie di roditori. Normalmente vengono utilizzati animali di sesso femminile (7), perché la letteratura esistente sui test convenzionali DL₅₀ indica che, pur non essendovi grandi differenze di sensibilità tra i due sessi, nei casi in cui sono state osservate differenze in genere le femmine sono risultate leggermente più sensibili (10). Tuttavia se le informazioni disponibili sulle proprietà tossicologiche o tossicocinetiche di sostanze chimiche strutturalmente affini indicano la probabilità che i maschi siano più sensibili delle femmine, si devono utilizzare animali di sesso maschile. In quest'ultimo caso, occorre fornire un'adeguata giustificazione.

Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani, appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. All'inizio del trattamento ciascun animale deve avere un'età compresa tra 8 e 12 settimane ed un peso compreso tra l'80 ed il 120 % del peso medio degli animali a cui è già stata somministrata la sostanza.

1.4.2 Condizioni di stabulazione e di alimentazione

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso non deve essere inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale, alternando 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per l'alimentazione si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua *ad libitum*. Nelle gabbie, gli animali possono essere raggruppati in funzione della dose somministrata, ma il numero di animali per gabbia non deve impedire la corretta osservazione di ciascun esemplare.

1.4.3 Preparazione degli animali

Gli animali sono scelti in modo casuale, marchiati per consentire l'individuazione dei singoli esemplari e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del trattamento, in modo da consentirne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

1.4.4 Preparazione delle dosi

In genere la sostanza di prova va somministrata a volume costante per tutte le dosi, variando la concentrazione del preparato da somministrare. Tuttavia, se il test viene eseguito su prodotti o miscele allo stato liquido, ai fini della valutazione del rischio può essere opportuno usare la sostanza non diluita, cioè a concentrazione costante; alcune autorità di regolamentazione impongono obbligatoriamente l'uso della sostanza non diluita. In ogni caso, non deve essere superato il volume massimo della dose somministrabile. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale, e nei roditori non deve di norma superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere 2 ml/100 g di peso corporeo. Quanto alla formulazione del preparato da somministrare, si raccomanda di usare ove possibile una soluzione/sospensione/emulsione acquosa, seguita in ordine di preferenza da una soluzione/sospensione/emulsione in olio (per esempio olio di mais) e infine da una soluzione in altri veicoli. Per i veicoli diversi dall'acqua devono essere note le caratteristiche tossiche. Le dosi devono essere preparate poco prima della somministrazione, tranne nel caso in cui la stabilità del preparato nell'arco del periodo di utilizzo sia nota e ritenuta accettabile.

1.5 PROCEDIMENTO

1.5.1 Somministrazione delle dosi

La sostanza da esaminare viene somministrata in un'unica dose mediante sonda gastrica o apposita cannula per intubazione. Nel remoto caso in cui non sia possibile somministrare l'intera quantità in un'unica dose, quest'ultima può essere frazionata e somministrata in un arco di tempo non superiore a 24 ore.

Prima della somministrazione della sostanza gli animali devono essere tenuti a digiuno (ad esempio, l'alimentazione, a esclusione dell'acqua, deve essere sospesa a partire dalla sera precedente per i ratti e per 3-4 ore nei topi). Dopo il periodo di digiuno, si pesano gli animali e si somministra la sostanza da esaminare. A somministrazione avvenuta, l'alimentazione può essere sospesa per altre 3-4 ore nei ratti o 1-2 ore nei topi. Qualora la dose venga frazionata e somministrata nell'arco di un certo periodo di tempo, a seconda della durata del periodo di somministrazione può essere necessario alimentare e abbeverare gli animali.

1.5.2 Studio di osservazione

Lo scopo dello studio di osservazione è di consentire la scelta della giusta dose iniziale per lo studio principale. La sostanza in esame viene somministrata in maniera sequenziale a singoli animali, secondo il diagramma di flusso riportato all'allegato 1. Lo studio di osservazione si conclude quando è possibile decidere la dose iniziale da utilizzare nello studio principale (o se la dose fissa più bassa provoca la morte di un animale).

La dose iniziale da utilizzare nello studio di osservazione, scelta tra i livelli di dose fissi di 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg, è la dose che si prevede possa provocare tossicità manifesta sulla base, ove possibile, di dati *in vivo* e *in vitro* relativi alla stessa sostanza chimica e a sostanze di struttura affine. In mancanza di questi dati, si utilizza una dose iniziale di 300 mg/kg.

Tra le somministrazioni a ciascun animale devono trascorrere almeno 24 ore. Tutti gli animali devono essere tenuti in osservazione per almeno 14 giorni.

In casi eccezionali, e solo se giustificato da specifiche esigenze normative, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso pari a 5 000 mg/kg (cfr. allegato 3). Per il benessere degli animali, si sconsiglia di effettuare sperimentazioni su animali alla dose stabilita per la categoria GHS 5 (2 000-5 000 mg/kg); l'utilizzo di questa dose va preso in considerazione solo se vi è una probabilità elevata che i risultati del test abbiano rilevanza diretta per la tutela della salute umana o animale o per la protezione dell'ambiente.

Se la somministrazione della dose fissa più bassa (5 mg/kg) provoca la morte dell'animale nel corso dello studio di osservazione, la procedura normale prevede l'interruzione dello studio e l'assegnazione della sostanza alla categoria GHS 1 (cfr. allegato 1). Tuttavia, qualora sia necessaria un'ulteriore conferma della classificazione, può essere utilizzata la seguente procedura supplementare facoltativa: la sostanza viene somministrata a un secondo animale alla dose di 5 mg/kg; se questo secondo animale muore, viene confermata la classificazione nella categoria GHS 1 e lo studio viene immediatamente interrotto; se invece sopravvive, la sostanza viene somministrata alla dose di 5 mg/kg a non più di altri tre animali. A causa dell'elevato rischio di mortalità, per proteggere gli animali la sostanza esaminata deve essere somministrata in

maniera sequenziale. L'intervallo di tempo tra le somministrazioni ai diversi animali deve essere sufficiente ad accertare che l'animale trattato in precedenza riesca a sopravvivere. Se si verifica un secondo decesso, la sequenza deve essere immediatamente interrotta e la sostanza non deve essere somministrata ad altri animali. Dal momento che il verificarsi di un secondo decesso (indipendentemente dal numero di animali a cui è già stata somministrata la sostanza al momento dell'interruzione) rientra nel risultato A (2 o più decessi), si applica la regola di classificazione di cui all'allegato 2 alla dose fissa di 5 mg/kg (categoria 1 se vi sono 2 o più morti o categoria 2 se c'è un'unica morte). L'allegato 4 riporta la classificazione prevista dal sistema UE in attesa dell'applicazione del nuovo sistema GHS.

1.5.3 Studio principale

1.5.3.1 Numero di animali e livelli di dose

I diagrammi di flusso di cui all'allegato 2 illustrano le tappe da seguire dopo la somministrazione del livello di dose iniziale. Vi sono tre possibilità: interrompere il test e assegnare la sostanza alla classe di rischio appropriata; effettuare il test a una dose fissa superiore; effettuare il test a una dose fissa inferiore. Tuttavia, per salvaguardare gli animali, se un livello di dose ha causato la morte di un animale durante lo studio di osservazione, questo livello non deve più essere utilizzato nello studio principale (cfr. allegato 2). L'esperienza indica che dopo la somministrazione del livello di dose iniziale in genere è possibile classificare la sostanza senza bisogno di effettuare ulteriori test.

Per ciascun livello di dose, normalmente si usano in tutto cinque animali dello stesso sesso: l'animale a cui nello studio di osservazione è stato somministrato lo stesso livello di dose, più altri quattro animali (tranne nel caso remoto in cui un livello di dose utilizzato nello studio principale non sia stato incluso nello studio di osservazione).

L'intervallo di tempo tra le somministrazioni dei vari livelli di dose ai diversi animali viene determinato in funzione della comparsa, della durata e della gravità dei segni di tossicità, avendo cura di procedere alla somministrazione della dose successiva solo una volta accertata la sopravvivenza degli animali trattati precedentemente. Si consiglia di far trascorrere, se necessario, 3 o 4 giorni tra le somministrazioni per consentire l'osservazione di eventuali segni di tossicità tardiva. L'intervallo di tempo può essere modificato secondo necessità, ad esempio in caso di risposte non convincenti.

Quando si prevede di utilizzare una dose fissa superiore di 5 000 mg/kg, è necessario attenersi alla procedura descritta nell'allegato 3 (cfr. anche punto 1.6.2).

1.5.3.2 Saggio limite

Il saggio limite viene utilizzato principalmente quando lo sperimentatore dispone di informazioni che indicano che la sostanza in esame non è probabilmente tossica, cioè causa tossicità solo in dosi superiori alle dosi limite previste per legge. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da test su composti, miscele o prodotti simili, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Se le informazioni sulla tossicità della sostanza sono scarse o nulle o si prevede che la sostanza in esame sia tossica occorre eseguire lo studio principale.

Ai fini delle presenti linee-guida, per il saggio limite si utilizza, seguendo il procedimento normale, una dose iniziale di 2 000 mg/kg (o in casi eccezionali 5 000 mg/kg) nello studio di osservazione, quindi si somministra la stessa dose ad altri quattro animali.

1.6 OSSERVAZIONE

Dopo la somministrazione, gli animali sono esaminati individualmente almeno una volta nei primi 30 minuti, quindi periodicamente nelle prime 24 ore, prestando particolare attenzione alle prime 4 ore, e successivamente una volta al giorno per 14 giorni, a meno che non muoiano o non sia necessario ritirarli dallo studio e sottoporli a eutanasia per risparmiare loro sofferenze eccessive. Tuttavia, la durata del periodo di osservazione non è tassativa, ma va stabilita in funzione della natura delle reazioni tossiche, del momento della loro comparsa e dei tempi di recupero e può quindi essere prolungata in caso di necessità. Un parametro importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se questi ultimi tendono ad apparire tardivamente (11). Tutte le osservazioni devono essere sistematicamente registrate su schede individuali per ogni animale.

Qualora gli animali presentino segni persistenti di tossicità sono necessarie ulteriori osservazioni, che devono riguardare le modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività somatomotoria e del comportamento. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nelle linee guida OCSE

citare in bibliografia al punto (8). Gli animali agonizzanti o che manifestano dolore intenso o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia. Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, occorre registrare con la massima precisione possibile il momento del decesso.

1.6.1 **Peso corporeo**

I singoli animali devono essere pesati poco prima della somministrazione della sostanza di prova e in seguito almeno una volta alla settimana. Occorre calcolare e registrare le variazioni ponderali. Al termine del test, gli animali sopravvissuti devono essere pesati prima di essere sottoposti a eutanasia.

1.6.2 **Esame patologico**

Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso del test e quelli che sono ritirati dallo studio per risparmiare loro eccessive sofferenze) devono essere sottoposti a necropsia macroscopica. Per ogni animale devono essere registrate tutte le modificazioni patologiche di rilievo. Per gli animali sopravvissuti almeno 24 ore, può essere opportuno l'esame microscopico degli organi recanti alterazioni patologiche evidenti, che potrebbe fornire indicazioni utili.

2. **DATI**

Occorre fornire risultati individuali per ciascun animale. Tutti i dati devono essere riassunti in una tabella nella quale devono essere indicati per ciascun gruppo sottoposto al test il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante il test o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici, il loro decorso e l'eventuale reversibilità e i risultati della necropsia.

3. **PRESENTAZIONE DEI DATI**

3.1 Rapporto di prova

Il rapporto di prova deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Sostanza di prova:

- natura fisica, purezza e (se pertinenti) proprietà fisico-chimiche (compresa l'isomerizzazione);
- dati identificativi, compreso il numero CAS.

Veicolo (se pertinente):

- motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali da esperimento:

- specie/ceppo utilizzato;
- condizioni microbiologiche degli animali, qualora siano note;
- numero, età e sesso degli animali (compresa l'eventuale giustificazione dell'uso di esemplari maschi anziché femmine);
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

Condizioni del test:

- informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza di prova, comprese informazioni sullo stato fisico del preparato somministrato;
- modalità di somministrazione della sostanza di prova, compreso il volume delle dosi e l'orario di somministrazione;
- informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo di dieta/provenienza degli alimenti, provenienza dell'acqua);
- motivazione della scelta della dose iniziale.

Risultati:

- tabella con risposta e livello di dose per ciascun animale (animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa; natura, gravità e durata degli effetti);
- tabella del peso corporeo e delle variazioni ponderali;
- peso dei singoli animali nel giorno della somministrazione, e in seguito ad intervalli di una settimana e al momento della morte o del sacrificio;
- data e ora della morte, se questa avviene prima del sacrificio programmato;
- momento della comparsa dei segni di tossicità, decorso ed eventuale reversibilità per ciascun animale;
- referto necroscopico e referto istopatologico per ciascun animale, se disponibili.

Discussione e interpretazione dei risultati.

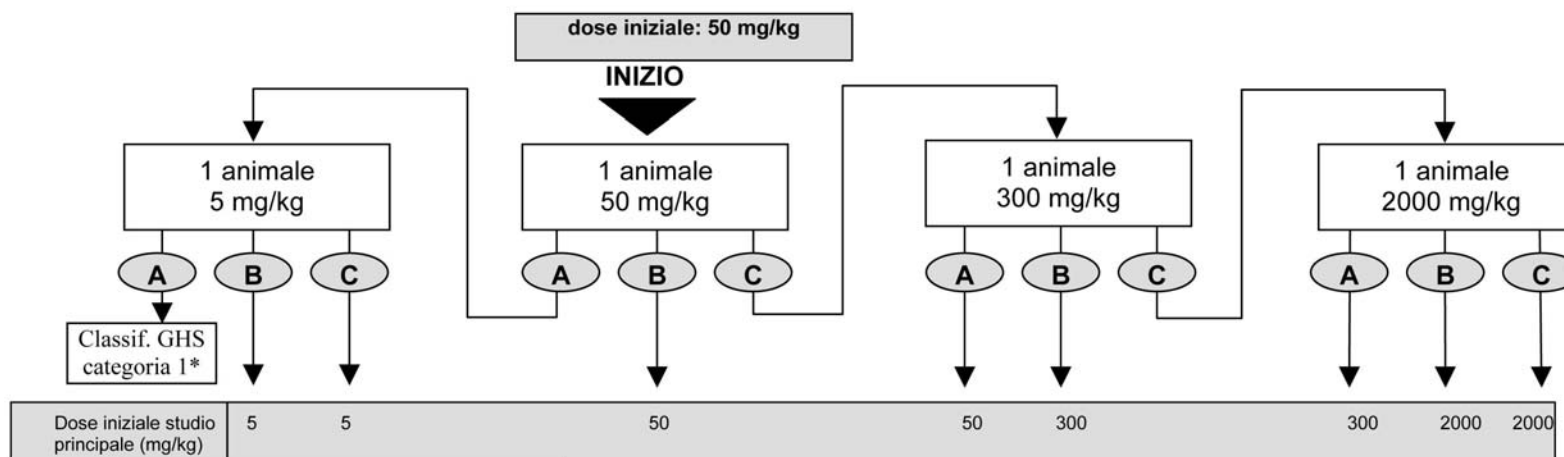
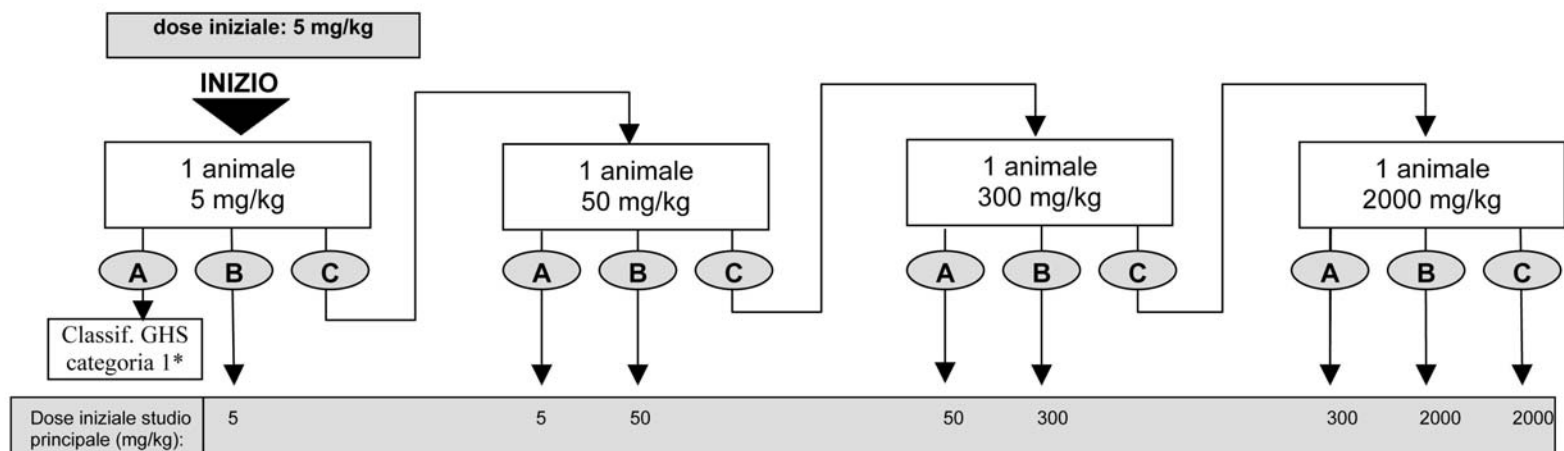
Conclusioni.

4.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

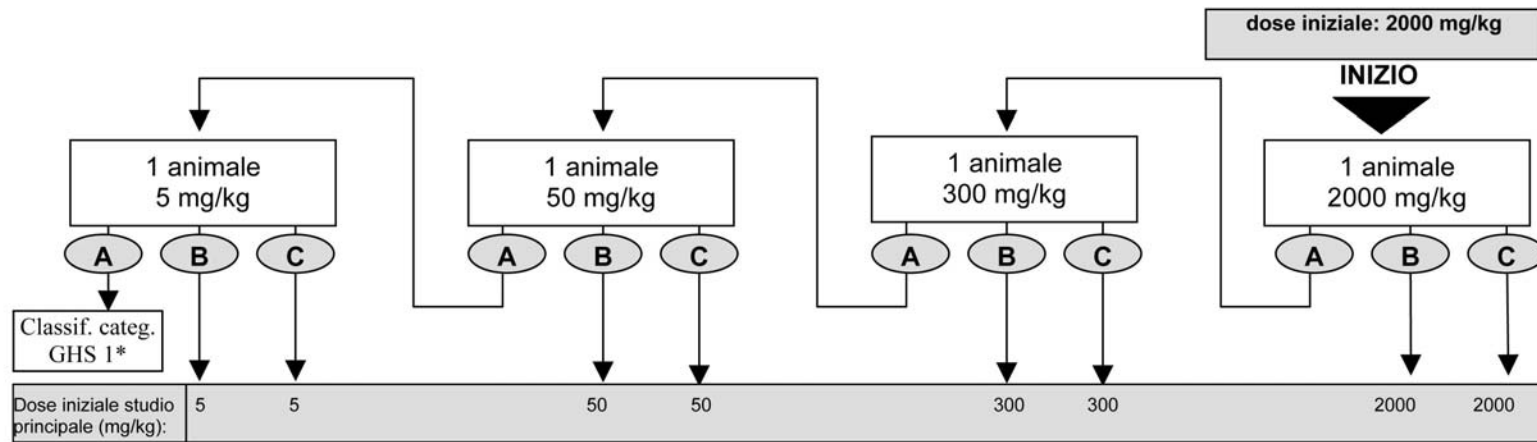
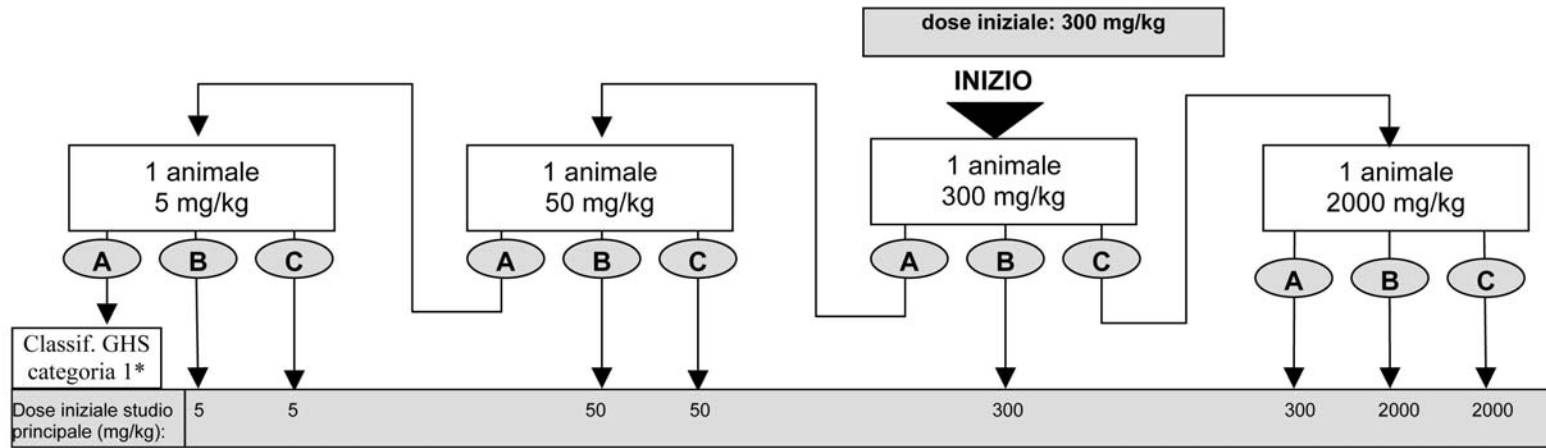
ALLEGATO 1: DIAGRAMMA DI FLUSSO DELLO STUDIO DI OSSERVAZIONE



Esito

A	decesso
B	tossicità manifesta
C	nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso

* per l'esito **A** a 5 mg/kg è prevista una procedura facoltativa supplementare per la conferma della classificazione GHS: cfr. punto 1.5.2

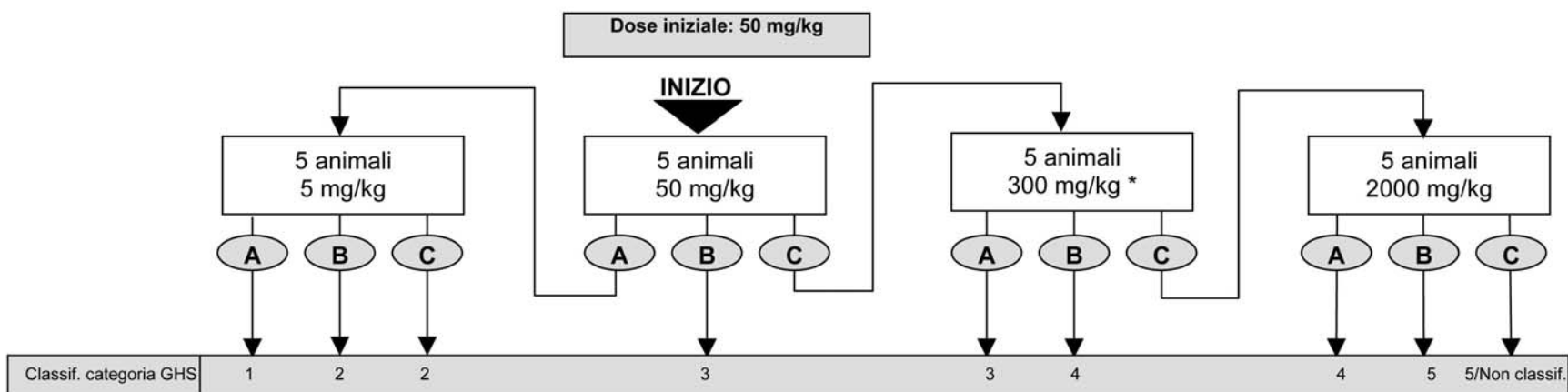
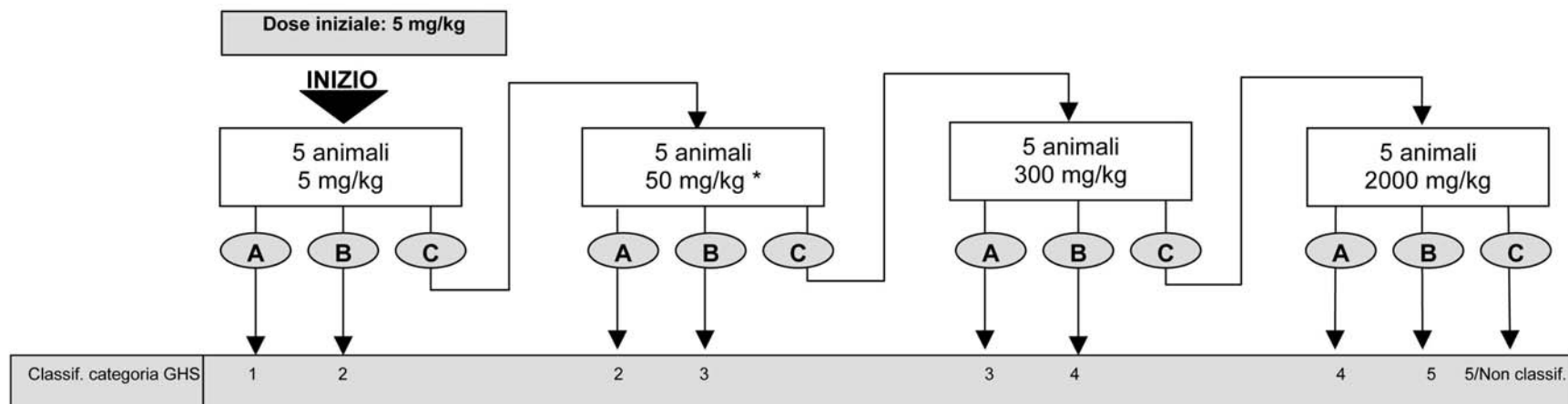


Esito

A	decesso
B	tossicità manifesta
C	nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso

* per l'esito **A** a 5 mg/kg è prevista una procedura facoltativa supplementare per la conferma della classificazione GHS: cfr. punto 1.5.2.

ALLEGATO 2: DIAGRAMMA DI FLUSSO DELLO STUDIO PRINCIPALE



Esito

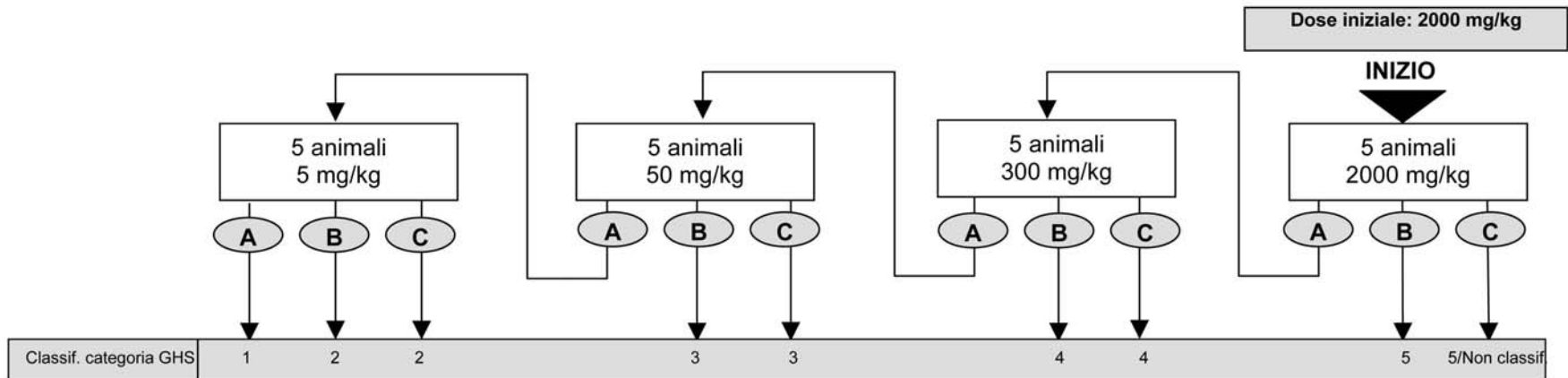
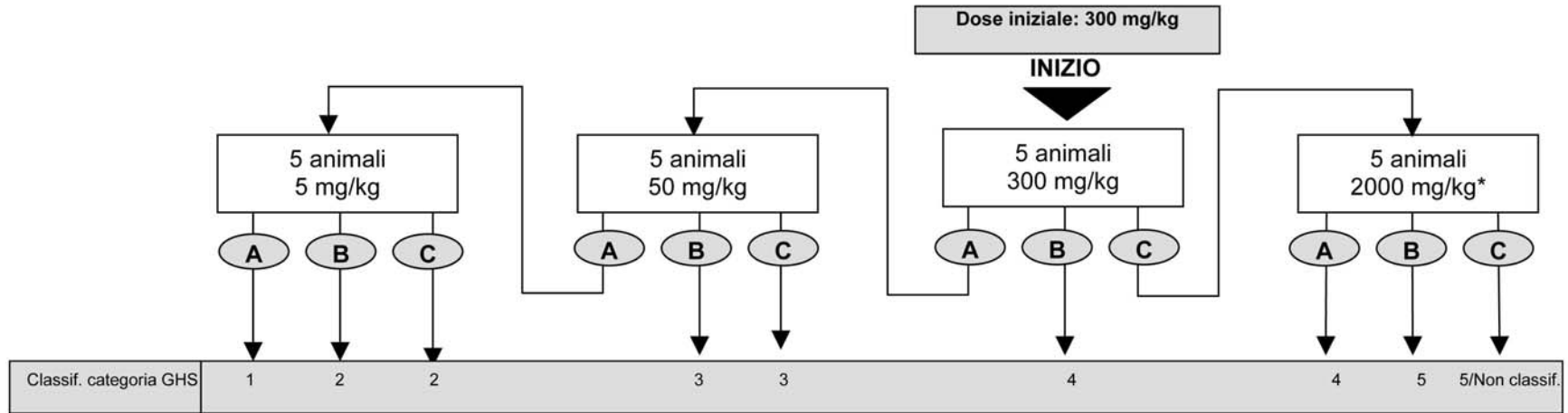
A	≥ 2 decessi
B	≥ 1 con tossicità manifesta e / o 1 decesso
C	nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso

Dimensione del gruppo

Nei 5 animali di ciascun gruppo dello studio principale sarà compreso l'animale a cui è stato somministrato lo stesso livello di dose nello studio di osservazione

***Interruzione per il benessere degli animali**

Se questa dose ha causato la morte di un animale nello studio di osservazione, non deve essere somministrata ad altri animali. Esito **A**

Esito

- A** ≥ 2 decessi
- B** ≥ 1 con tossicità manifesta e / o 1 decesso
- C** nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso

Dimensione del gruppo

Nei 5 animali di ciascun gruppo dello studio principale sarà compreso l'animale a cui è stato somministrato lo stesso livello di dose nello studio di osservazione

*Interruzione per il benessere degli animali

Se questa dose ha causato la morte di un animale nello studio di osservazione, non deve essere somministrata ad altri animali. Esito **A**

ALLEGATO 3

CRITERI PER LA CLASSIFICAZIONE DI SOSTANZE CON VALORI PREVISTI DI DL₅₀ SUPERIORI A 2 000 MG/KG PER LE QUALI NON È NECESSARIO ESEGUIRE IL TEST DI TOSSICITÀ

I criteri relativi alla categoria di rischio 5 servono a consentire l'identificazione di sostanze che presentano un rischio di tossicità acuta relativamente basso ma che in determinate circostanze possono rappresentare un pericolo per popolazioni vulnerabili. Si tratta di sostanze per le quali è prevista una DL₅₀ orale o cutanea compresa fra 2 000 e 5 000 mg/kg o dosi equivalenti per altre vie di somministrazione. Una sostanza può essere classificata nella categoria di rischio definita da: 2 000 mg/kg < DL₅₀ < 5 000 mg/kg (categoria 5 nel GHS) nei seguenti casi:

- a) se uno qualsiasi degli schemi di cui all'allegato 2 porta a inserire tale sostanza in questa categoria, sulla base delle incidenze di mortalità;
- b) se sono già disponibili prove attendibili che indicano che la DL₅₀ si situa nell'intervallo di valori della categoria 5 o se altri studi su animali o sugli effetti tossici nell'uomo indicano un rischio di tossicità acuta per la salute umana;
- c) per estrapolazione, stima o misurazione di dati se non è giustificata l'assegnazione ad una classe di rischio superiore, e se:
 - sono disponibili informazioni attendibili che indicano effetti tossici significativi nell'uomo, o
 - si osserva mortalità nei test eseguiti fino ai valori della categoria 4 per via orale, o
 - i pareri degli esperti confermano segni clinici significativi di tossicità nei test eseguiti fino ai valori della categoria 4, a esclusione di diarrea, piloerezione o aspetto non tolettato, o
 - i pareri degli esperti confermano l'esistenza di informazioni attendibili, ricavate dagli altri studi su animali, che indicano potenziali effetti acuti significativi.

ESECUZIONE DEL TEST A DOSI SUPERIORI A 2 000 MG/KG

In casi eccezionali, e solo se specifiche esigenze normative lo giustificano, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso superiore pari a 5 000 mg/kg. Al fine di proteggere gli animali, si sconsiglia di utilizzare la dose di 5 000 mg/kg, che va presa in considerazione solo nel caso in cui sia molto probabile che i risultati del test abbiano rilevanza diretta per la protezione della salute degli animali o degli esseri umani.

Studio di osservazione

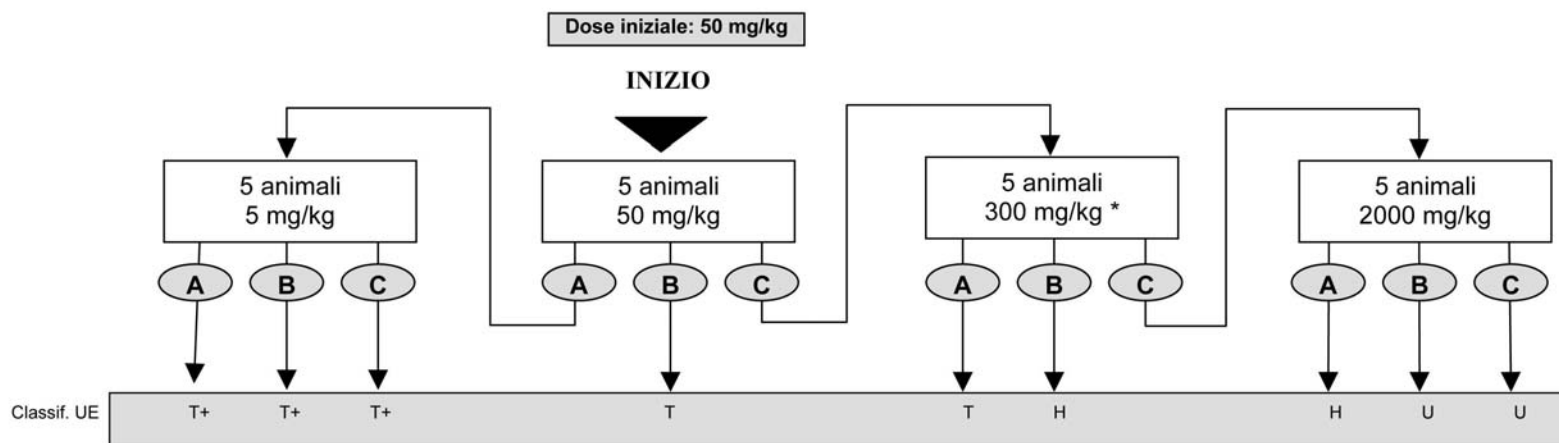
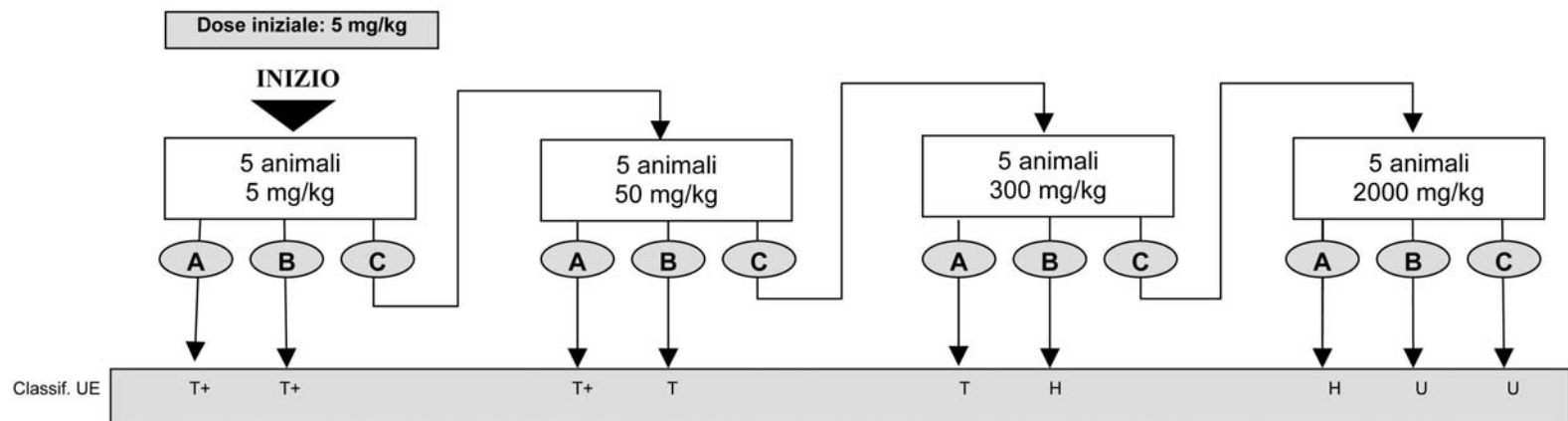
Ai criteri decisionali che regolano la procedura sequenziale di cui all'allegato 1 viene aggiunto un livello di dose di 5 000 mg/kg. Di conseguenza, quando nello studio di osservazione si utilizza una dose iniziale di 5 000 mg/kg, in caso di esito A (decesso) si effettua il test su un secondo animale a 2 000 mg/kg; in caso di esito B o C (tossicità manifesta o nessun segno di tossicità) si può scegliere la dose di 5 000 mg/kg come dose iniziale per lo studio principale. Analogamente, se si utilizza una dose iniziale diversa da 5 000 mg/kg, in caso di esito B o C a 2 000 mg/kg si procede con la dose di 5 000 mg/kg; a tale dose, in caso di esito A si utilizza la dose di 2 000 mg/kg come dose iniziale per lo studio principale; in caso di esito B o C si utilizza la dose di 5 000 mg/kg.

Studio principale

Ai criteri decisionali che regolano la procedura sequenziale di cui all'allegato 2 viene aggiunto un livello di dose di 5 000 mg/kg. Di conseguenza, quando nello studio principale si utilizza una dose iniziale di 5 000 mg/kg, in caso di esito A (≥ 2 decessi) è necessario effettuare il test su un secondo gruppo a 2 000 mg/kg; in caso di esito B (tossicità evidente e/o ≤ 1 decesso) o C (nessun segno di tossicità) la sostanza non viene classificata nel sistema GHS. Analogamente, se si utilizza una dose iniziale diversa da 5 000 mg/kg, in caso di esito C a 2 000 mg/kg si procede con la dose di 5 000 mg/kg; a tale dose, in caso di esito A la sostanza è assegnata alla categoria 5 GHS, in caso di esito B o C la sostanza non è classificata.

ALLEGATO 4:

METODO DI PROVA B.1 bis – Guida alla classificazione transitoria UE in attesa dell'effettiva attuazione del sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (GHS)
[cfr. riferimento bibliografico n. (8)]



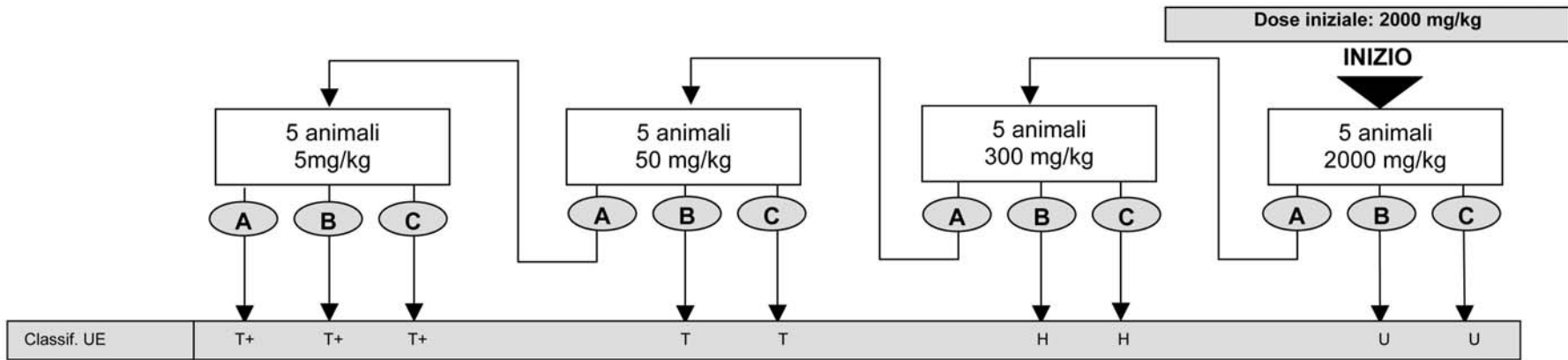
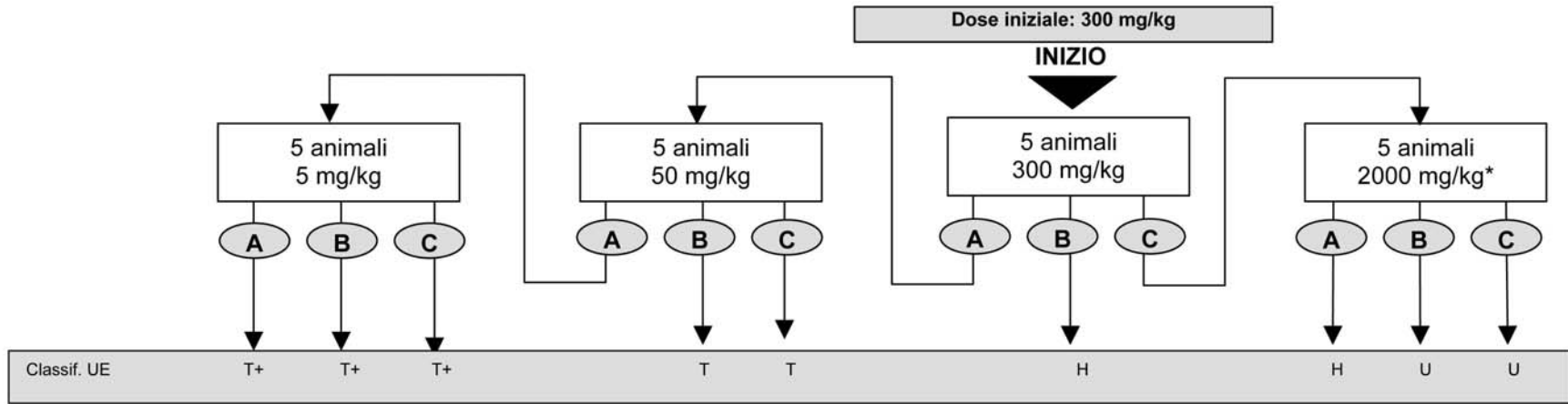
Esito

A	≥ 2 decessi
B	≥ 1 con tossicità manifesta e/o 1 decesso
C	nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso

T+	= molto tossico
T	= tossico
H	= nocivo
U	= non classificato

* **Benessere degli animali** Se questa dose ha causato la morte di un animale nello studio di osservazione, non deve essere somministrata ad altri animali. Esito **A**

Dimensione del gruppo Nei 5 animali di ciascun gruppo dello studio principale sarà compreso l'animale a cui è stato somministrato lo stesso livello di dose nello studio di osservazione.



Esito

A ≥ 2 decessi

B ≥ 1 con tossicità manifesta e/o 1 decesso

C nessun segno di tossicità manifesta e nessun decesso

T+ = molto tossico
T = tossico
H = nocivo
U = non classificato

Dimensione del gruppo
 Nei 5 animali di ciascun gruppo dello studio principale sarà compreso l'animale a cui è stato somministrato lo stesso livello di dose nello studio di osservazione.

***Interruzione per il benessere degli animali**
 Se questa dose ha causato la morte di un animale nello studio di osservazione, non deve essere somministrata ad altri animali. Esito **A**

»

ALLEGATO 2C

«B.1 ter. TOSSICITÀ ACUTA PER VIA ORALE – METODO DELLA CLASSE DI TOSSICITÀ ACUTA

1. METODO

Questo metodo di saggio è equivalente al metodo OCSE TG 423 (2001).

1.1 INTRODUZIONE

Il metodo della classe di tossicità acuta (1) qui descritto è un procedimento articolato in più fasi successive che prevede l'uso di 3 animali dello stesso sesso in ogni fase. In media, per valutare la tossicità acuta di una sostanza sono necessarie 2-4 fasi, in funzione del numero di animali morti e/o moribondi. Il procedimento è riproducibile, utilizza un numero molto limitato di animali e permette di classificare le sostanze in maniera analoga agli altri metodi di determinazione della tossicità acuta. Il metodo della classe di tossicità acuta si basa su valutazioni biometriche (2)(3)(4)(5) e utilizza dosi fisse, opportunamente separate, per consentire la classificazione della sostanza ai fini dell'assegnazione a una particolare categoria e della valutazione dei rischi. Il metodo, adottato nel 1996, è stato ampiamente convalidato *in vivo* mediante dati sulla DL_{50} ricavati dalla letteratura esistente, sia a livello nazionale (6) che a livello internazionale (7).

Per indicazioni sulla scelta del metodo di prova più adatto per scopi specifici, si rimanda al documento orientativo sui saggi di tossicità acuta per via orale dell'OCSE (8). Tale documento contiene anche ulteriori informazioni sull'applicazione e sull'interpretazione del metodo di saggio B.1 ter.

Non è necessario somministrare le sostanze da esaminare in dosi che provocano notoriamente dolore e sofferenze gravi per effetto delle proprietà corrosive o fortemente irritanti delle sostanze stesse. Ai fini dell'interpretazione dei risultati del saggio, gli animali moribondi o che manifestano segni evidenti di dolore o di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia e assimilati agli animali morti spontaneamente nel corso dell'esperimento. I criteri da applicare per decidere in merito al sacrificio degli animali moribondi o in stato di grave sofferenza sono oggetto di uno specifico documento orientativo, che riporta anche indicazioni su come riconoscere i segni di morte prevedibile o imminente (9).

Il metodo utilizza dosi prestabilite e i risultati che se ne ricavano permettono di classificare la sostanza esaminata conformemente al sistema armonizzato su scala mondiale (GHS) per la classificazione delle sostanze chimiche che causano tossicità acuta (10).

In linea di principio, il metodo non ha lo scopo di determinare una DL_{50} precisa, ma consente di stabilire range di esposizione verosimilmente letali: la morte di una certa percentuale di animali, infatti, costituisce ancora l'endpoint principale di questo saggio. Il metodo consente di determinare un valore di DL_{50} solo quando almeno due dosi provocano una mortalità superiore allo 0 % e inferiore allo 100 %. L'uso di dosi prestabilite, indipendentemente dalla sostanza in esame, e la classificazione esplicitamente legata al numero di animali osservati in diversi stati favoriscono la congruenza e la ripetibilità dei dati presentati dai vari laboratori.

Il laboratorio che esegue il saggio deve consultare tutte le informazioni disponibili sulla sostanza in esame prima di effettuare lo studio. Tali informazioni devono riguardare quantomeno l'identità e la struttura chimica; le proprietà chimico-fisiche; i risultati di eventuali altri saggi di tossicità *in vitro* o *in vivo* eseguiti sulla sostanza; i dati tossicologici su sostanze di struttura affine; l'impiego o gli impieghi previsti. Queste informazioni sono necessarie per provare a tutti i soggetti interessati la rilevanza del saggio per la protezione della salute degli esseri umani, e sono utili per la scelta della dose iniziale più appropriata.

1.2 DEFINIZIONI

Tossicità acuta per via orale: effetti avversi che si verificano in seguito alla somministrazione orale di una singola dose di una sostanza o di più dosi nell'arco di 24 ore.

Morte tardiva: termine usato per indicare che l'animale non muore né appare moribondo nelle 48 ore successive alla somministrazione, ma muore successivamente nei 14 giorni del periodo di osservazione.

Dose: quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (p. es. mg/kg).

GHS: sistema armonizzato su scala mondiale per la classificazione delle sostanze chimiche e dei relativi miscugli. Si tratta di un'iniziativa congiunta dell'OCSE (salute degli esseri umani e ambiente), del Comitato di esperti delle Nazioni Unite sul trasporto delle sostanze pericolose (proprietà fisico-chimiche) e dell'ILO (comunicazione dei rischi), coordinata dal programma inter-organizzazioni per una gestione responsabile delle sostanze chimiche (IOMC).

Morte imminente: stato in cui si prevede che l'animale sarà moribondo o morto prima della successiva osservazione in programma. Nei roditori, tra i segni indicativi di morte imminente sono compresi convulsioni, posizione laterale o prona e tremore [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

DL₅₀ (dose letale mediana): la singola dose di sostanza, determinata statisticamente, che si prevede causi la morte del 50 % degli animali a cui viene somministrata per via orale. Il valore della DL₅₀ viene espresso in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (mg/kg).

Dose limite: dose corrispondente al limite superiore fissato per il saggio (2 000 o 5 000 mg/kg).

Moribondo: che sta morendo o non è in grado di sopravvivere, nemmeno se sottoposto a trattamento [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

Morte prevedibile: presenza di segni clinici, ad esempio incapacità di raggiungere il cibo o l'acqua, che indicano che l'animale morirà prima della conclusione programmata dell'esperimento [per maggiori indicazioni, vedi il documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9)].

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

Il metodo prevede l'applicazione di un procedimento articolato in fasi successive che richiede l'uso di un numero minimo di animali in ciascuna fase e permette di ricavare informazioni sufficienti per la classificazione della tossicità acuta della sostanza in esame. La sostanza viene somministrata per via orale a un gruppo di animali da laboratorio in una delle dosi prestabilite. Il saggio viene effettuato seguendo un procedimento in fasi successive; in ciascuna fase vengono utilizzati tre animali dello stesso sesso (normalmente femmine). In funzione della presenza o assenza di mortalità riferibile alla sostanza in esame tra gli animali trattati, per ciascuna fase si possono avere tre esiti diversi:

- interruzione del saggio
- somministrazione della sostanza ad altri tre animali, alla stessa dose
- somministrazione della sostanza ad altri tre animali al livello di dose immediatamente superiore o inferiore.

Lo schema dettagliato del procedimento è riportato nell'allegato 1. Il metodo consente di valutare la sostanza allo scopo di assegnarla a una delle classi di tossicità definite da valori discriminanti fissi di DL₅₀.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 Scelta delle specie di animali

La specie di roditori da preferirsi è rappresentata dal ratto, ma è possibile utilizzare anche altre specie di roditori. Normalmente vengono utilizzati animali di sesso femminile (9), perché la letteratura esistente circa i saggi convenzionali sulla DL₅₀ indica che, pur non essendovi grandi differenze di sensibilità tra i due sessi, nei casi in cui sono state osservate differenze in genere le femmine sono risultate leggermente più sensibili (11). Peraltro, se le informazioni disponibili sulle proprietà tossicologiche o tossicocinetiche di sostanze chimiche di struttura affine indicano che i maschi sono verosimilmente più sensibili delle femmine, si devono usare animali di sesso maschile. Qualora vengano usati animali di sesso maschile, se ne deve fornire un'adeguata motivazione.

Si devono utilizzare animali adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Ciascun animale, all'inizio del trattamento, deve essere di età compresa fra 8 e 12 settimane e di peso compreso fra l'80 % e il 120 % del peso medio di eventuali animali a cui è stata precedentemente somministrata la sostanza in esame.

1.4.2 Condizioni di stabulazione e di alimentazione

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (\pm 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale e alternare 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. Per l'alimentazione si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua ad libitum. Nelle gabbie, gli animali possono essere raggruppati in funzione della dose, ma il numero di animali per gabbia non deve essere tale da impedire la corretta osservazione di ciascun esemplare.

1.4.3 Preparazione degli animali

Gli animali devono essere scelti in modo casuale, marchiati per consentire l'individuazione dei singoli esemplari e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del trattamento, in modo da consentire l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

1.4.4 Preparazione delle dosi

In genere le somministrazioni delle sostanze in esame devono avere un volume costante per tutte le dosi oggetto del saggio; a questo scopo, si varia la concentrazione del preparato da somministrare. Tuttavia, se il saggio viene eseguito su prodotti o miscugli che si presentano in forma liquida, ai fini della successiva valutazione del rischio può essere opportuno usare la sostanza non diluita, cioè a concentrazione costante; peraltro, l'uso della sostanza non diluita è prescritto da alcune autorità di regolamentazione. In ogni caso, non si deve superare il volume massimo somministrabile. Il volume massimo di liquido somministrabile in una sola volta dipende dalla taglia dell'animale. Nei roditori, di norma non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere 2 ml/100 g di peso corporeo. Quanto alla formulazione del preparato da somministrare, si raccomanda di usare ove possibile una soluzione/sospensione/emulsione acquosa oppure, in ordine di preferenza, una soluzione/sospensione/emulsione in olio (per esempio olio di mais) o una soluzione in altri veicoli. Nel caso in cui si utilizzino veicoli diversi dall'acqua, devono essere note le caratteristiche di tossicità degli stessi. Le dosi devono essere preparate poco prima della somministrazione, tranne nel caso in cui la stabilità del preparato nell'arco del periodo di utilizzo sia nota e si sia dimostrata accettabile.

1.5 PROCEDIMENTO**1.5.1 Somministrazione delle dosi**

La sostanza da saggiare viene somministrata in un'unica dose mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Nel caso infrequente in cui non sia possibile somministrare l'intera quantità in un'unica dose, si può procedere al frazionamento della stessa e alla somministrazione delle varie frazioni nell'arco di un periodo non superiore a 24 ore.

Gli animali devono essere tenuti a digiuno prima della somministrazione della sostanza (p. es. l'alimentazione, a esclusione dell'acqua, deve essere sospesa a partire dalla sera precedente nei ratti e per 3-4 ore nei topi). Dopo il periodo di digiuno, si pesano gli animali e si somministra la sostanza da esaminare. A somministrazione avvenuta, il cibo può essere sospeso per altre 3-4 ore nei ratti o 1-2 ore nei topi. Qualora la dose venga frazionata e somministrata nell'arco di un certo periodo di tempo, può essere necessario alimentare e abbeverare gli animali in misura adeguata alla durata del periodo di somministrazione.

1.5.2 Numero di animali e livelli di dose

Si utilizzano tre animali in ciascuna fase. La dose iniziale viene scelta fra quattro livelli fissi: 5, 50, 300 e 2 000 mg/kg di peso corporeo. Il livello di dose iniziale deve essere quello che con maggior probabilità provoca la morte di una parte degli animali trattati. I diagrammi di flusso dell'allegato 1 illustrano il procedimento da seguire per ciascuna delle dosi iniziali, mentre l'allegato 4 riporta indicazioni sulla classificazione secondo il sistema UE in attesa dell'applicazione del nuovo sistema GHS.

Qualora, alla luce delle informazioni disponibili, la mortalità risulti improbabile al livello di dose iniziale più elevato (2 000 mg/kg di peso corporeo), si deve fare ricorso a un saggio limite. In mancanza di informazioni su una sostanza da esaminare, per il benessere degli animali si raccomanda di utilizzare la dose iniziale di 300 mg/kg di peso corporeo.

L'intervallo di tempo tra il trattamento dei diversi gruppi viene determinato in funzione dell'esordio, della durata e della gravità dei segni di tossicità, avendo cura di procedere al trattamento degli animali alla dose successiva solo una volta accertata la sopravvivenza degli animali trattati precedentemente.

In casi eccezionali, e solo se specifiche esigenze normative lo giustificano, può essere previsto un ulteriore livello di dose fisso superiore pari a 5 000 mg/kg (vedi allegato 2). Per il benessere degli animali, si sconsiglia di effettuare sperimentazioni su animali alle dosi stabilite per la categoria GHS 5 (2 000-5 000 mg/kg); l'utilizzo di tali dosi è da prevedere solo se vi è una probabilità elevata che i risultati del saggio abbiano rilevanza diretta per la tutela della salute degli animali o dell'uomo o per la salvaguardia dell'ambiente.

1.5.3 Saggio limite

Il saggio limite viene utilizzato principalmente quando lo sperimentatore dispone di informazioni che indicano che la sostanza in esame è verosimilmente non tossica, cioè causa tossicità solo in dosi superiori alle dosi limite previste per legge. Le informazioni sulla tossicità della sostanza in esame possono essere ricavate da conoscenze su composti, miscugli o prodotti simili esaminati, tenendo conto dell'identità e della percentuale dei componenti dei quali è nota la rilevanza tossicologica. Nel caso in cui le informazioni sulla tossicità della sostanza siano scarse o nulle, o in cui ci si attenda che la sostanza in esame sia tossica, il saggio principale deve essere eseguito.

Il saggio limite si effettua con un unico livello di dose di 2 000 mg/kg di peso corporeo su sei animali (tre animali per fase). In casi eccezionali, si può utilizzare un unico livello di dose di 5 000 mg/kg su tre animali (vedi allegato 2). Se si osservano decessi riferibili alla sostanza in esame, può essere necessario eseguire un altro saggio al livello di dose immediatamente inferiore.

1.6 OSSERVAZIONE

Dopo la somministrazione, gli animali sono esaminati individualmente almeno una volta nei primi 30 minuti, quindi periodicamente nelle prime 24 ore, ponendo particolare attenzione nelle prime 4 ore, e successivamente una volta al giorno per 14 giorni in tutto, tranne nel caso in cui sia necessario ritirarli dallo studio e sottoporli a eutanasia per motivi legati al loro benessere, o nel caso in cui vengano rinvenuti morti. Tuttavia, la durata dell'osservazione non è tassativa, e va stabilita in funzione delle reazioni tossiche, del momento della loro insorgenza e della durata del periodo di recupero; se necessario, quindi, è possibile prolungarla. Un parametro importante è rappresentato dal momento della comparsa e della scomparsa dei segni di tossicità, soprattutto se negli animali è rilevabile una tendenza a manifestare segni di tossicità tardiva (12). Tutte le osservazioni devono essere sistematicamente registrate su schede individuali per ogni animale.

Ulteriori osservazioni sono necessarie qualora gli animali presentino segni persistenti di tossicità. Dette osservazioni devono comprendere le modificazioni della cute e del pelo, degli occhi e delle mucose, del sistema respiratorio e circolatorio, del sistema nervoso autonomo e centrale, dell'attività e del comportamento somatomotori. Particolare attenzione deve essere rivolta all'osservazione di tremori, convulsioni, salivazione, diarrea, letargia, sonno e coma. Si devono tenere in considerazione i principi e i criteri riassunti nel documento orientativo sugli endpoint non crudeli (9). Gli animali moribondi o che manifestano dolore intenso o segni di sofferenza grave e persistente devono essere sottoposti a eutanasia. Nel caso di animali sottoposti a eutanasia o rinvenuti morti, il momento del decesso deve essere registrato con la massima precisione possibile.

1.6.1 Peso corporeo

I singoli animali devono essere pesati poco prima della somministrazione della sostanza da saggiare e in seguito almeno una volta alla settimana. Le variazioni ponderali devono essere calcolate e registrate. Al termine del saggio, gli animali sopravvissuti devono essere pesati e sottoposti a eutanasia.

1.6.2 Esame patologico

Tutti gli animali utilizzati (compresi quelli che muoiono nel corso del saggio e quelli che sono ritirati dallo studio per motivi legati al loro benessere) devono essere sottoposti a necropsia macroscopica. Per ogni animale devono essere registrate tutte le modificazioni patologiche di rilievo. Per gli animali sopravvissuti almeno 24 ore, l'esame microscopico degli organi recanti alterazioni patologiche evidenti potrebbe fornire indicazioni utili ed essere quindi opportuno.

2. DATI

Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo del saggio, il numero di animali utilizzati, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, il numero di animali rinvenuti morti durante il saggio o sottoposti a eutanasia, il momento del decesso di ciascun animale, la descrizione degli effetti tossici con indicazioni sul decorso e sulla reversibilità, e i risultati della necropsopia.

3. RELAZIONE**3.1 Relazione sul saggio**

La relazione sul saggio deve contenere le seguenti informazioni, a seconda dei casi:

Sostanza in esame:

- natura fisica, purezza e, se del caso, proprietà fisico-chimiche (compresa l'isomerizzazione);
- dati identificativi, compreso il numero CAS.

Veicolo (se del caso):

- motivazione della scelta del veicolo utilizzato, se diverso dall'acqua.

Animali da esperimento:

- specie/ceppo utilizzato;
- condizioni microbiologiche degli animali, qualora siano note;
- numero, età e sesso degli animali (compresa, se del caso, la motivazione dell'uso di esemplari maschi anziché femmine);
- provenienza, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;

Condizioni sperimentali:

- informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza in esame, comprese informazioni sulla forma fisica del preparato somministrato;
- modalità precise di somministrazione della sostanza in esame, compresi volumi e orari delle somministrazioni;
- informazioni dettagliate sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo di dieta/provenienza, provenienza dell'acqua);
- motivazione della scelta della dose iniziale.

Risultati:

- tabella con risposta e livello di dose per ciascun animale (vale a dire animali che manifestano segni di tossicità, mortalità compresa; natura, gravità e durata degli effetti);
- tabella del peso corporeo e delle relative modificazioni;
- peso dei singoli animali il giorno della somministrazione, quindi a intervalli di una settimana, e infine al momento della morte o del sacrificio;
- data e ora della morte, se questa avviene prima del sacrificio programmato
- momento della comparsa dei segni di tossicità, loro decorso ed eventuale reversibilità, per ciascun animale;
- reperti necroscopici ed eventuali reperti istopatologici per ciascun animale.

Discussione e interpretazione dei risultati.

Conclusioni.

4.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- (1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. *Toxicol. Lett.*, Suppl. 31, 86
- (2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. *Bundesgesundheitsblatt* 32, 336-341.
- (3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 68, 559-610
- (4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 729-734.
- (5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 16, 129-134
- (6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD₅₀ Test. *Arch. Toxicol.* 66, 455-470.
- (7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659-670.
- (8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- (10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- (11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223-231.
- (12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.»

ALLEGATO 1

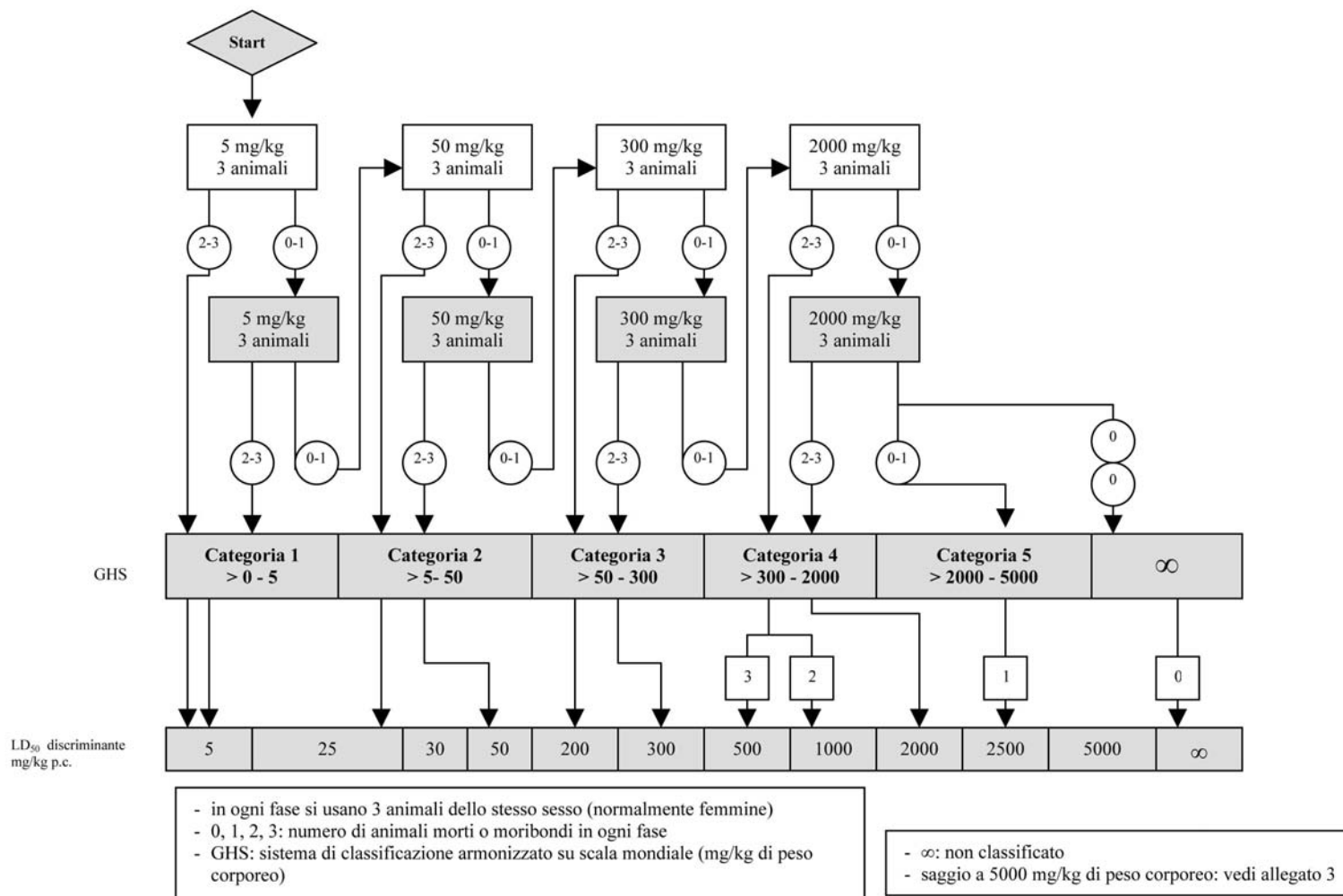
PROCEDIMENTO DA SEGUIRE PER CIASCUNA DELLE DOSI INIZIALI*OSSERVAZIONI GENERALI*

Il procedimento da seguire per ciascuna dose iniziale è indicato nei diagrammi di questo allegato.

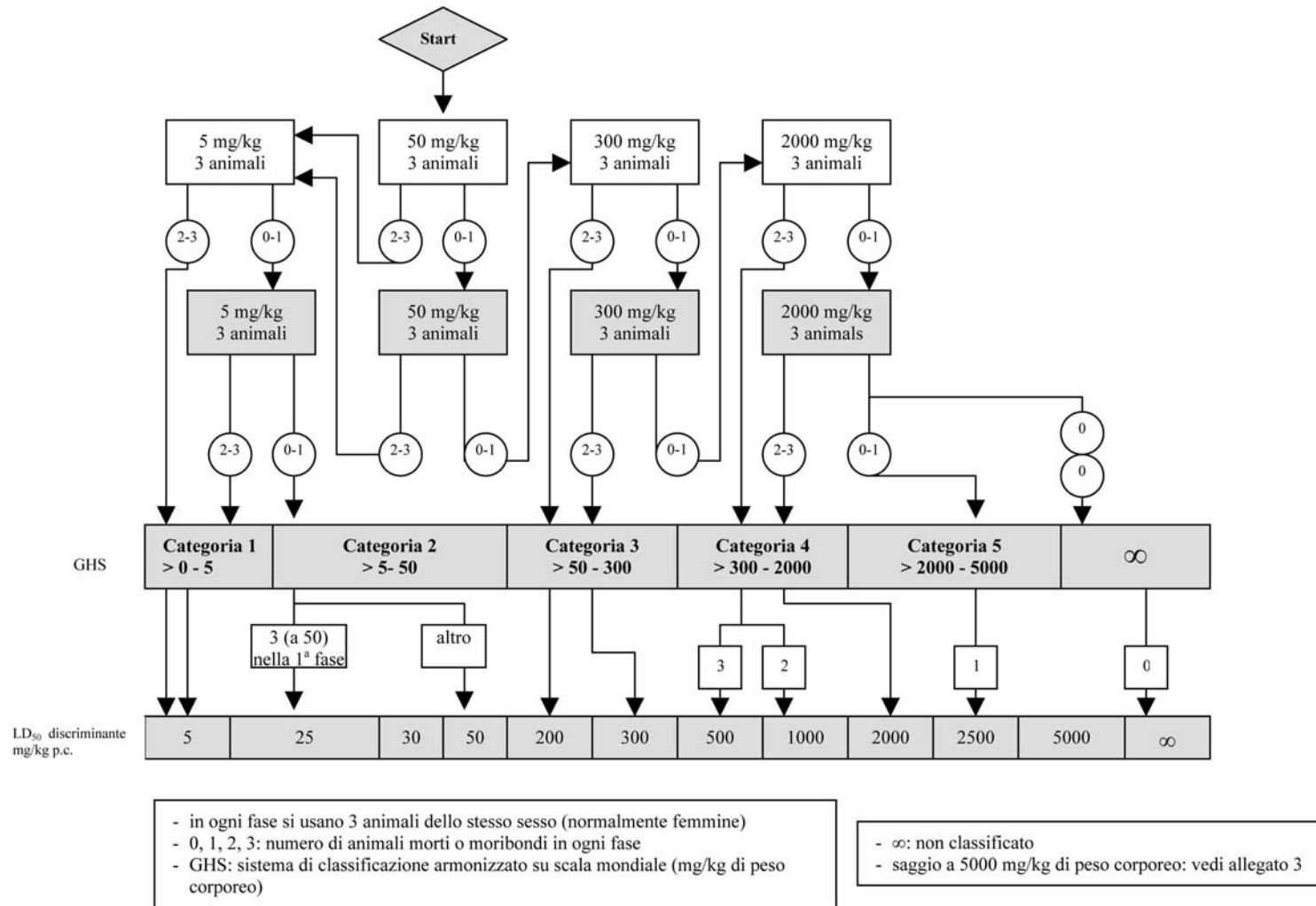
- Allegato 1a: dose iniziale 5 mg/kg di peso corporeo
- Allegato 1b: dose iniziale 50 mg/kg di peso corporeo
- Allegato 1c: dose iniziale 300 mg/kg di peso corporeo
- Allegato 1d: dose iniziale 2 000 mg/kg di peso corporeo

Il procedimento segue le frecce indicate, in funzione del numero di animali sottoposti a eutanasia o morti spontaneamente.

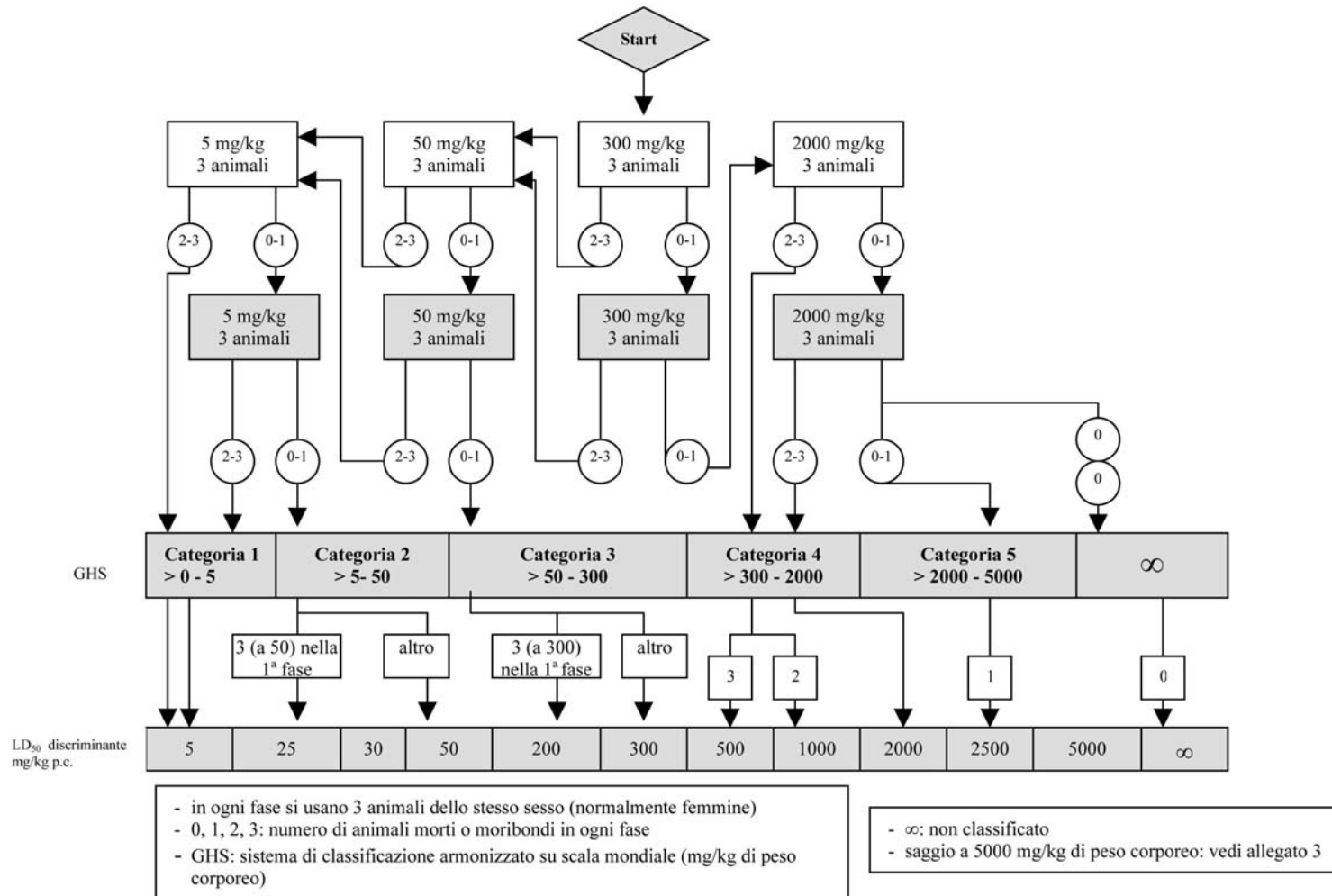
PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 5 MG/KG DI PESO CORPOREO



PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 50 MG/KG DI PESO CORPOREO

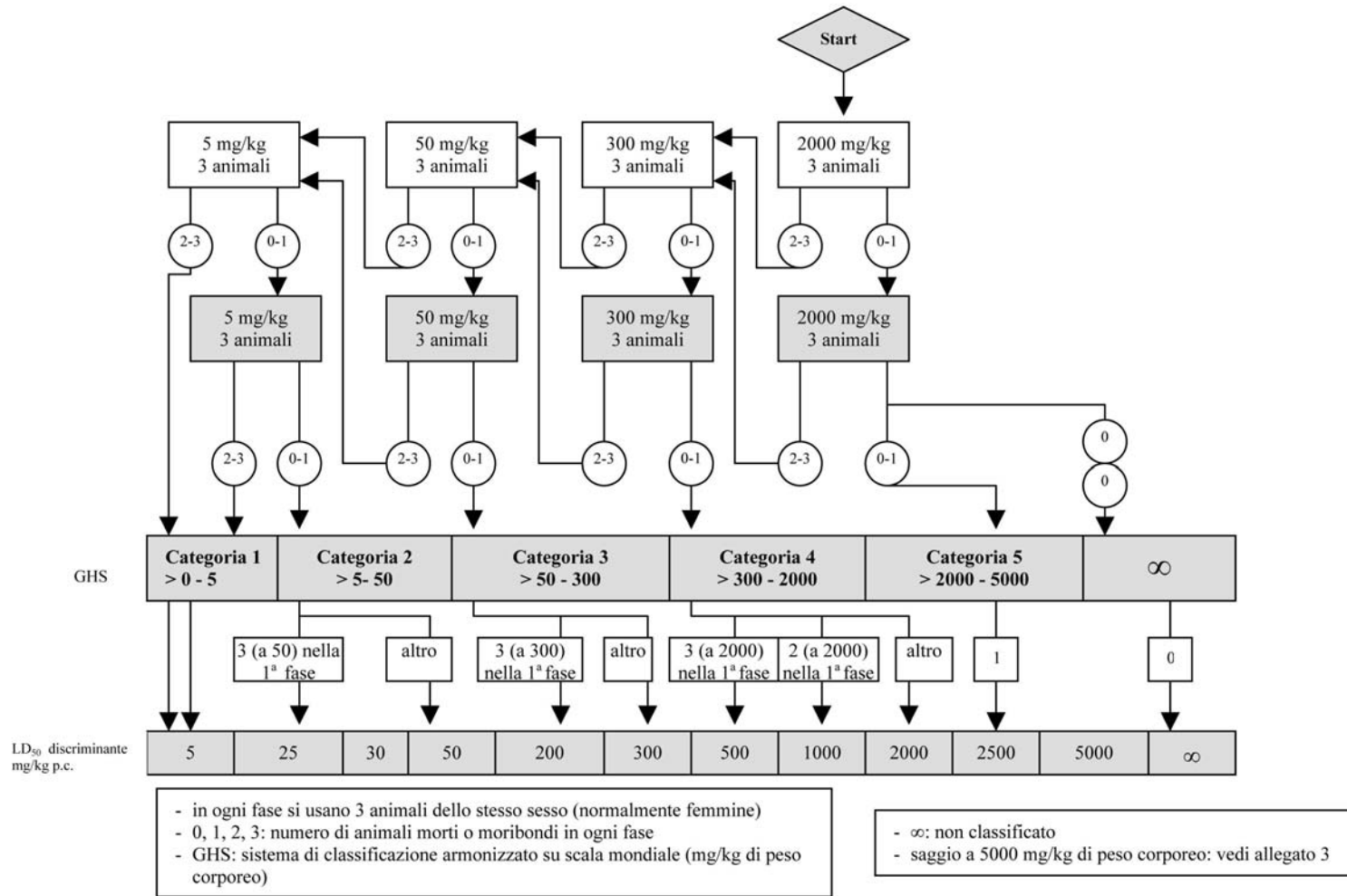


PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 300 MG/KG DI PESO CORPOREO



ALLEGATO 1 D

PROCEDIMENTO CON DOSE INIZIALE DI 2 000 MG/KG DI PESO CORPOREO



ALLEGATO 2

CRITERI PER LA CLASSIFICAZIONE DI SOSTANZE CON VALORI DI DL₅₀ ATTESI SUPERIORI A 2 000 MG/KG SENZA BISOGNO DI ESEGUIRE UN SAGGIO DI TOSSICITÀ

I criteri relativi alla categoria di rischio 5 hanno lo scopo di consentire l'identificazione di sostanze che presentano un rischio di tossicità acuta relativamente basso ma che, in determinate situazioni, possono rappresentare un pericolo per popolazioni vulnerabili. Si tratta di sostanze che si prevede abbiano una DL₅₀ orale o cutanea compresa fra 2 000 e 5 000 mg/kg o dosi equivalenti per altre vie di somministrazione. Una sostanza può essere classificata nella categoria di rischio definita da: $2\ 000\ \text{mg/kg} < DL_{50} < 5\ 000\ \text{mg/kg}$ (categoria 5 nel GHS) nei casi seguenti:

- a) se uno qualsiasi degli schemi di cui all'allegato 1a-1d porta a inserire tale sostanza in questa categoria, sulla base delle incidenze di mortalità;
- b) se sono già disponibili dati obiettivi attendibili che indicano che la DL₅₀ si situa nell'intervallo di valori della categoria 5, o se altri studi su animali o effetti tossici nell'uomo indicano un rischio di tossicità acuta per l'uomo;
- c) per estrapolazione, stima o misurazione di dati se non è giustificata l'assegnazione a una classe di rischio maggiore, e se
 - sono disponibili informazioni attendibili che indicano effetti tossici significativi nell'uomo, o
 - si osserva mortalità nei saggi eseguiti fino ai valori della categoria 4 per via orale, o
 - valutazioni di esperti confermano segni clinici significativi di tossicità nei saggi eseguiti fino ai valori della categoria 4, a esclusione di diarrea, piloerezione o aspetto non tolettato, o
 - valutazioni di esperti confermano informazioni attendibili, ricavate dagli altri studi su animali, che indicano potenziali effetti acuti significativi.

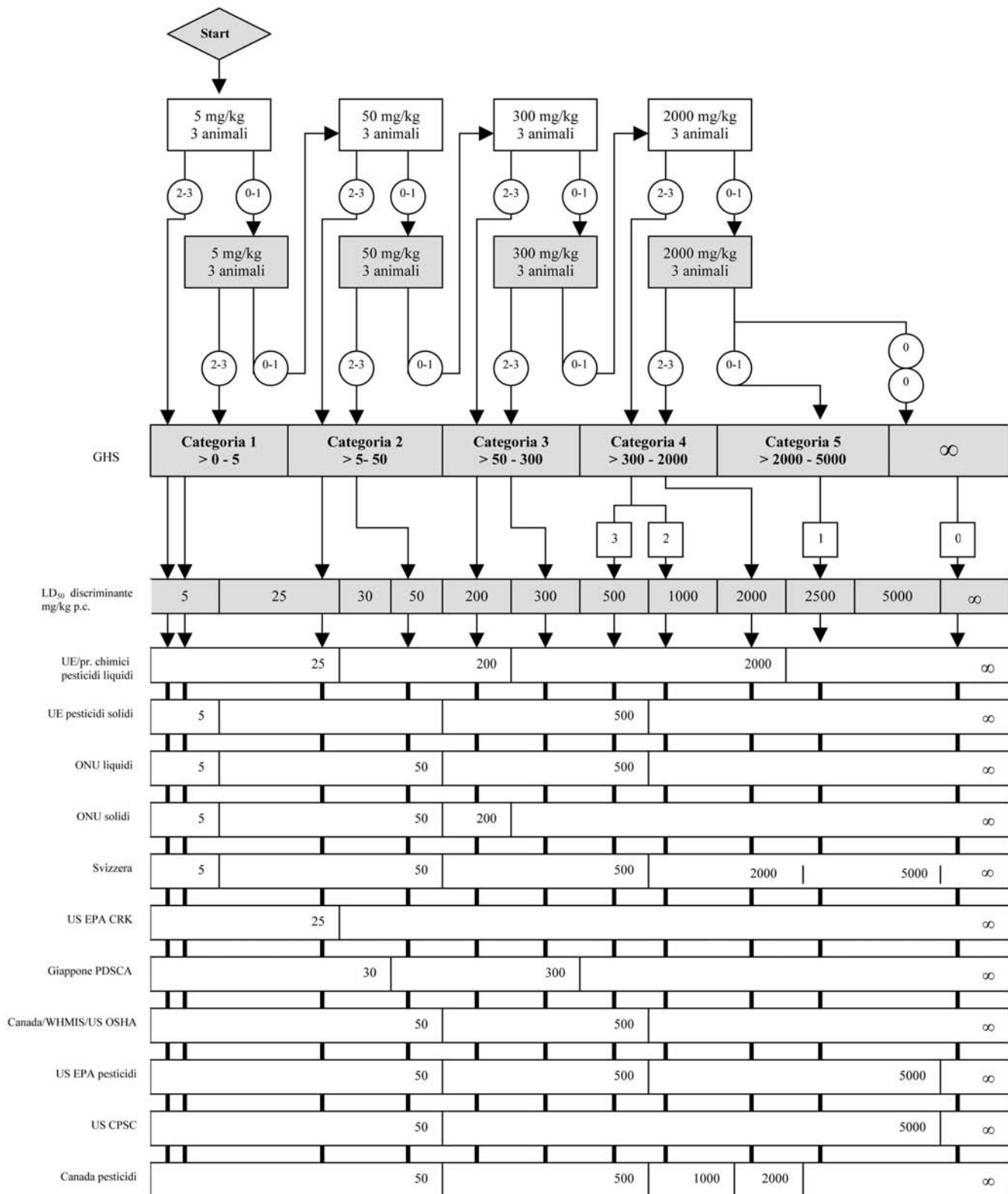
ESECUZIONE DEL SAGGIO A DOSI SUPERIORI A 2 000 MG/KG

Data la necessità di tutelare il benessere degli animali, si sconsiglia di utilizzare la dose prevista per la categoria 5 (5 000 mg/kg); l'utilizzo di tale dose è da prevedere solo nel caso in cui sia molto probabile che i risultati del saggio abbiano rilevanza diretta per la protezione della salute degli esseri umani o degli animali (10). Non devono essere effettuati ulteriori saggi a livelli di dose superiori.

Quando è necessario effettuare un saggio di tossicità alla dose di 5 000 mg/kg, tale saggio deve essere eseguito in una sola fase (e quindi su tre animali). Se il primo animale a cui viene somministrata la sostanza muore, si procede somministrando la sostanza a 2 000 mg/kg, così come indicato nei diagrammi di flusso dell'allegato 1. Se il primo animale sopravvive, la sostanza viene somministrata alla stessa dose ad altri due animali. Se solo uno dei tre animali muore, si ritiene che il valore di DL₅₀ sia superiore a 5 000 mg/kg. Se due animali muoiono, si procede somministrando la sostanza a 2 000 mg/kg.

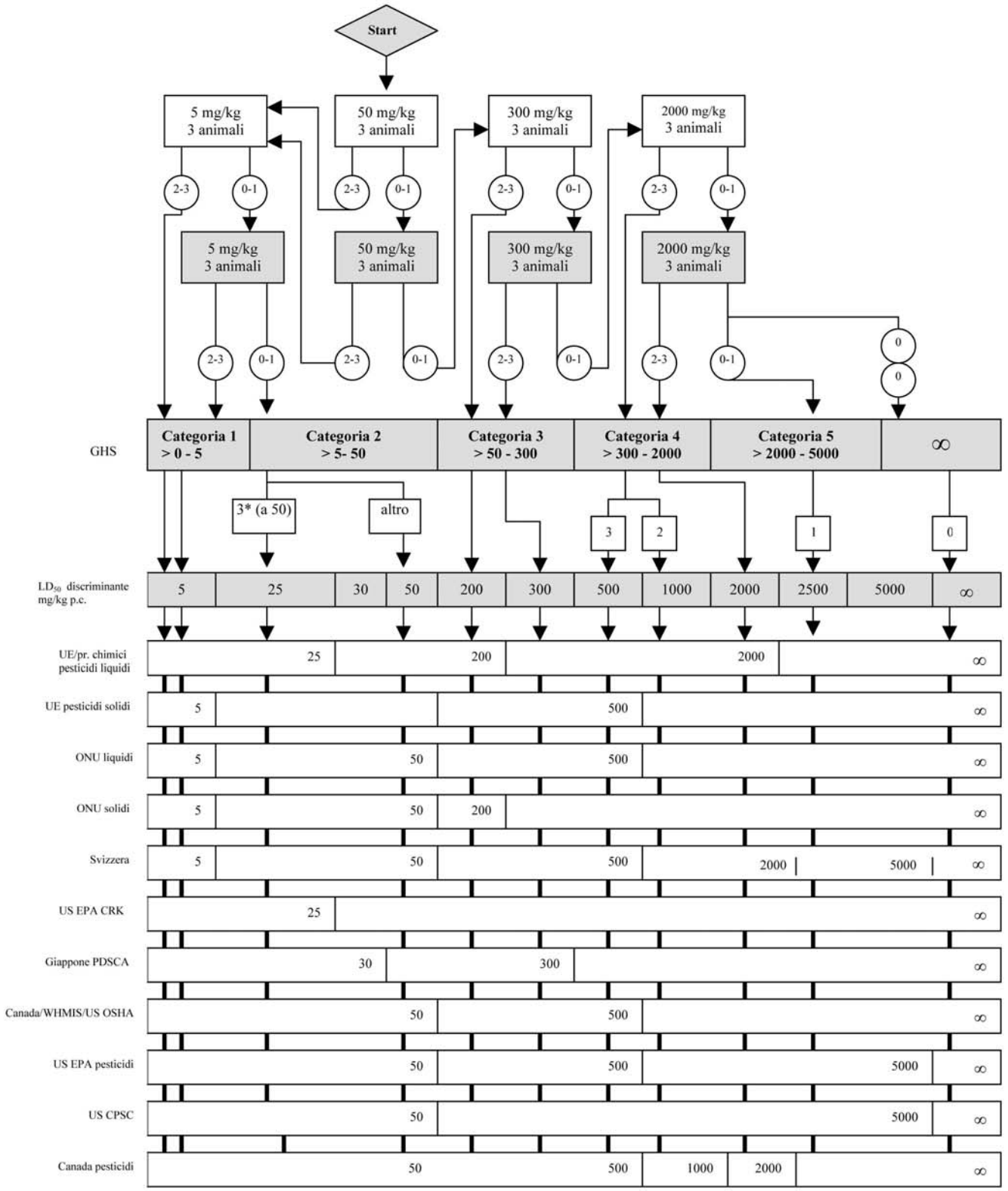
ALLEGATO 3

METODO DI SAGGIO B.1 ter: indicazioni sulla classificazione secondo lo schema UE nel periodo di transizione in attesa della piena applicazione del sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (GHS) [ricavate dalla voce bibliografica (8)]



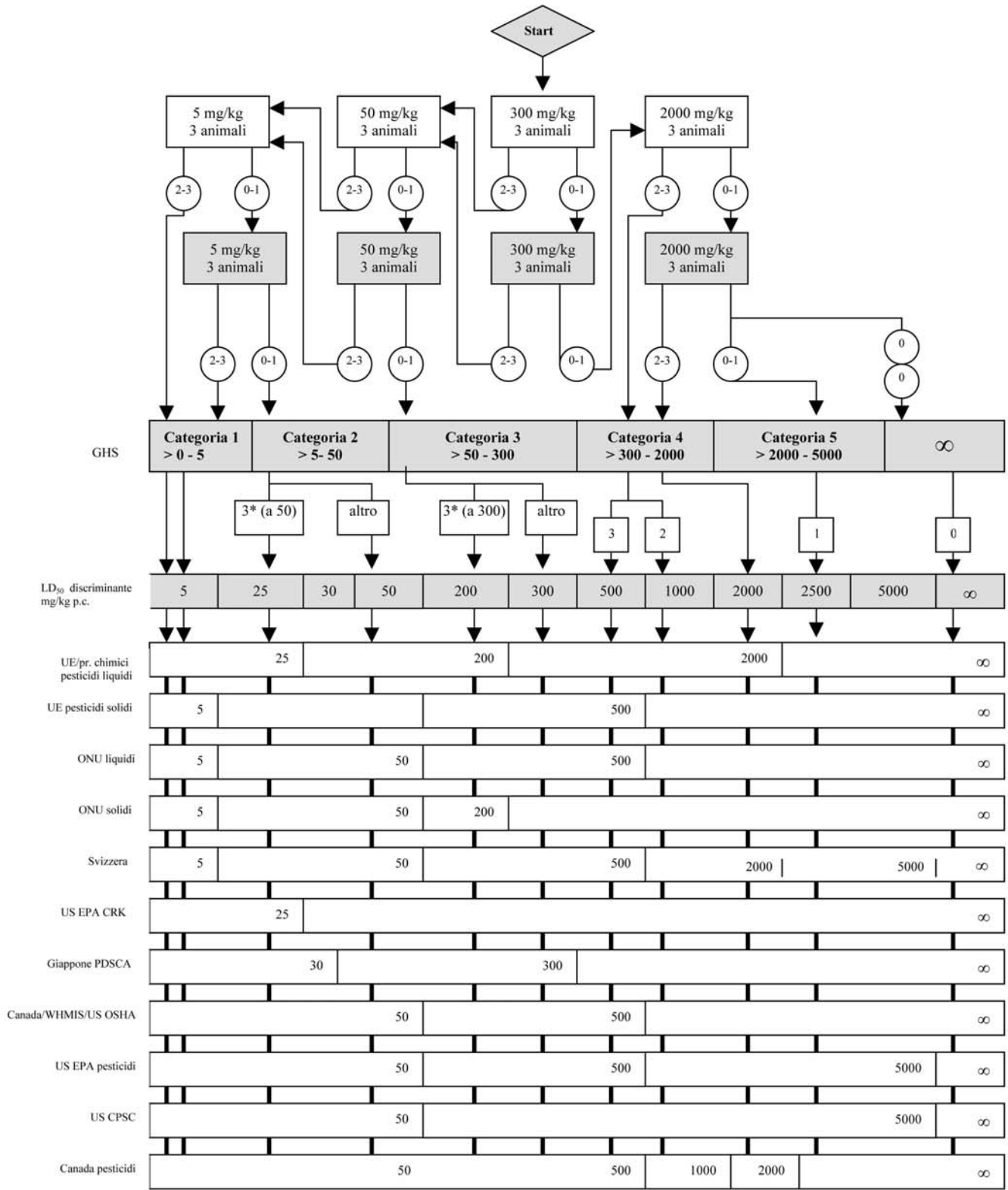
- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)
 - 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase

- ∞: non classificato
 - GHS: sistema armonizzato di classificazione su scala mondiale (mg/kg p.c.)



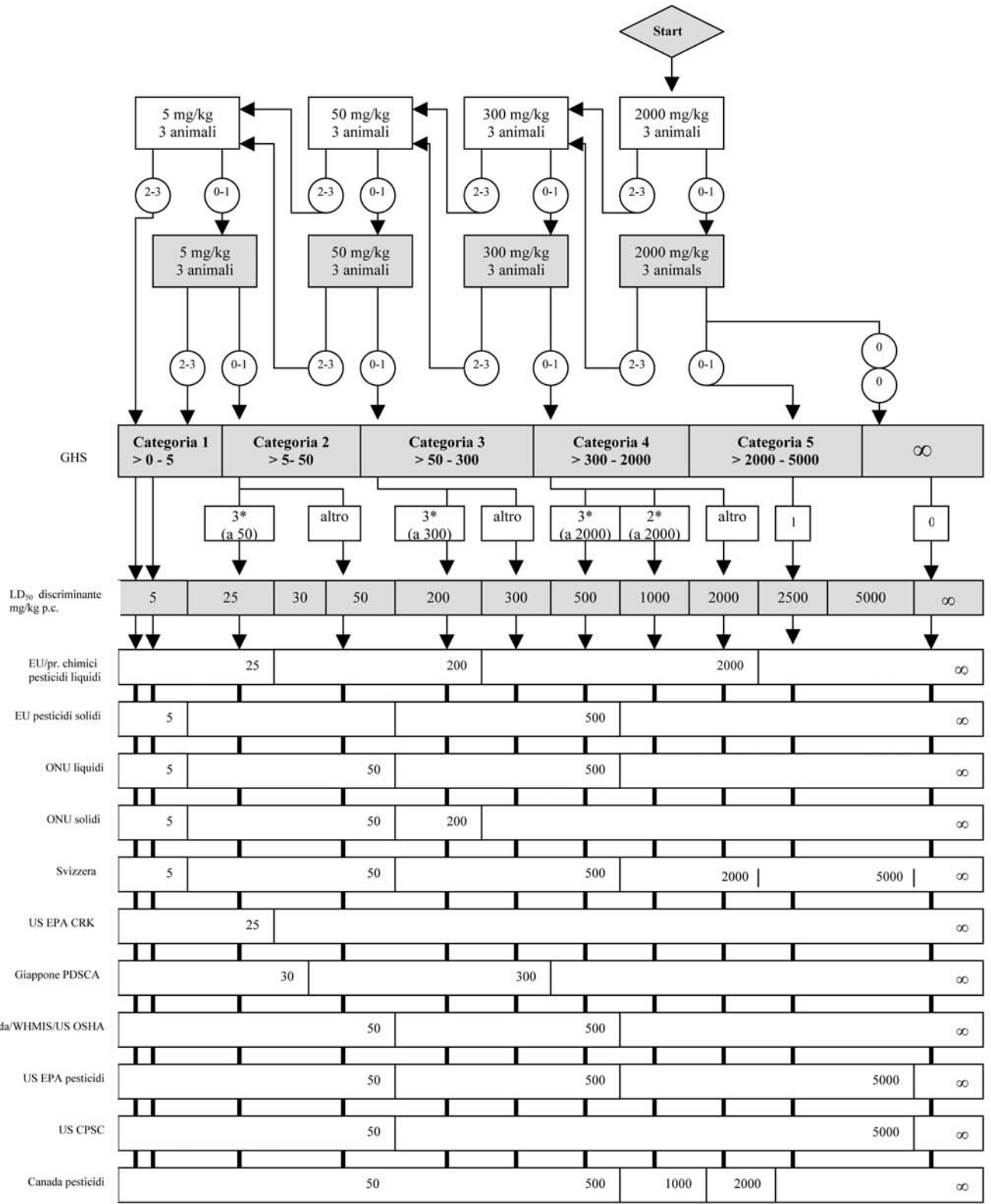
- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)
 - 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase

- ∞: non classificato
 - *: nella prima fase
 - GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p.c.)



- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)
 - 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase

- ∞: non classificato
 - *: nella prima fase
 - GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p.c.)



- in ogni fase si usano 3 animali dello stesso sesso (normalmente femmine)
 - 0, 1, 2, 3: numero di animali moribondi o morti in ogni fase

- ∞: non classificato
 - *: nella prima fase
 - GHS: sistema di classificazione armonizzato su scala mondiale (mg/kg p.c.)

ALLEGATO 2D

«B.4. TOSSICITÀ ACUTA: IRRITAZIONE/CORROSIONE CUTANEA

1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 404 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Nella preparazione di questo metodo aggiornato è stata dedicata particolare attenzione ai miglioramenti possibili in relazione al benessere degli animali e alla valutazione di tutte le informazioni disponibili e la sostanza in esame, per evitare prove non necessarie sugli animali da laboratorio. Il metodo comprende la raccomandazione di eseguire, prima di effettuare il saggio *in vivo* descritto per la corrosione/irritazione, un'analisi dell'importanza delle prove (*weight-of-the-evidence analysis*) sui dati pertinenti esistenti. Qualora i dati disponibili fossero insufficienti, si raccomanda di svilupparli mediante l'applicazione di saggi sequenziali (1). La strategia di saggio raccomandata comprende l'esecuzione di saggi *in vitro* validati ed accettati ed è descritta nell'Allegato al presente metodo. Nel saggio iniziale *in vivo* si raccomanda inoltre di applicare, ove opportuno, all'animale i tre cerotti per il saggio da contatto uno dopo l'altro, anziché simultaneamente.

Nell'interesse sia dell'accuratezza scientifica, sia del benessere degli animali, non bisogna prendere in considerazione i saggi *in vivo* finché non siano stati valutati, in un'analisi dell'importanza delle prove, tutti i dati disponibili pertinenti circa la potenziale corrosività/irritazione cutanea della sostanza. Tali dati devono comprendere prove derivanti da studi esistenti su soggetti umani e/o animali da laboratorio, prove di corrosività/irritazione di una o più sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze, dati dimostranti l'elevata acidità o alcalinità della sostanza (2)(3), nonché i risultati di test *in vitro* o *ex vivo* validati ed accettati (4)(5)(5a). Questa analisi deve ridurre la necessità di eseguire test *in vivo* della corrosività/irritazione delle sostanze per le quali esistono già prove sufficienti derivanti da altri studi in relazione a questi due fattori.

Nell'Allegato al presente metodo è inclusa e consigliata una strategia a tappe, che prevede l'esecuzione di saggi validati *in vitro* o *ex vivo* per la corrosione/irritazione. Tale strategia è stata sviluppata e raccomandata all'unanimità dai partecipanti a un workshop dell'OCSE (6), ed è stata adottata come strategia raccomandata di test nel GHS (*Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances*) (Sistema globale armonizzato per la classificazione delle sostanze chimiche) (7). Sebbene tale strategia dei saggi sequenziali non sia parte integrante del metodo di prova B.4., si raccomanda di adottarla prima di passare ai saggi *in vivo*. Nel caso di nuove sostanze, si raccomanda di adottare un approccio graduale per sviluppare dati scientificamente validi sulla corrosività/irritazione della sostanza. Se per le sostanze esistenti i dati sulla corrosione/irritazione cutanea sono insufficienti, si può usare tale strategia per ottenere i dati mancanti. È necessario giustificare l'uso di una strategia o procedura di saggio differente, nonché l'eventuale decisione di non usare un approccio di saggio graduale.

Se non è possibile determinare la corrosività o il potere irritante usando un'analisi dell'importanza delle prove, coerente con la strategia di saggi sequenziali, va preso in considerazione un saggio *in vivo* (cfr. Allegato).

1.2 DEFINIZIONI

Irritazione cutanea: produzione di danni reversibili alla pelle in seguito all'applicazione di una sostanza in esame per un massimo di 4 ore.

Corrosione cutanea: produzione di danni irreversibili alla pelle; in particolare, necrosi visibile attraverso l'epidermide e all'interno del derma, in seguito all'applicazione della sostanza in esame per un massimo di quattro ore. Le reazioni corrosive sono caratterizzate da ulcere, emorragie, escare sanguinanti e, alla fine dell'osservazione, il giorno 14, da alterazione del colore dovuta a pallore della cute, zone di completa alopecia e cicatrici. Per valutare le lesioni dubbie effettuare eventualmente un esame istopatologico.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza in esame è applicata in un'unica dose sulla pelle della cavia; le zone di pelle non trattate dell'animale servono da controllo. A intervalli specificati si valuta e si attribuisce un punteggio al grado di irritazione/corrosione, che va ulteriormente descritto per fornire una valutazione completa degli effetti. La durata dello studio deve essere sufficiente a valutare la reversibilità o irreversibilità degli effetti osservati.

Gli animali che presentano segni prolungati di grave sofferenza e/o dolore, in qualsiasi fase del saggio, vanno soppressi con metodi non cruenti e la sostanza va valutata di conseguenza. Cfr. bibliografia per i criteri da seguire nel decidere di sopprimere gli animali moribondi o che soffrono gravemente (8).

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO DI SAGGIO

1.4.1 **Preparazione per il saggio in vivo**

1.4.1.1 *Selezione delle specie*

L'animale da laboratorio di elezione è il coniglio albino; usare giovani adulti sani. Giustificare l'eventuale uso di altre specie.

1.4.1.2 *Preparazione degli animali*

All'incirca 24 ore prima del saggio occorre rasare il pelo nella zona dorsale del tronco degli animali evitando di scorticare la pelle. Usare solo animali la cui pelle è sana e intatta.

Alcuni ceppi di coniglio presentano zone di pelo più denso che sono più evidenti in alcuni periodi dell'anno. Tali aree di crescita densa del pelo non vanno usate come punti per il saggio.

1.4.1.3 *Condizioni di alloggio e alimentazione*

Gli animali vanno posti in gabbie singole. La temperatura del locale deve essere di 20 °C (\pm 3 °C) per i conigli. L'umidità relativa deve raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, ma occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per l'alimentazione, attenersi alle diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

1.4.2 **Procedura**

1.4.2.1 *Applicazione della sostanza in esame*

La sostanza in esame va applicata su una zona ridotta (circa 6 cm²) di pelle e coperta con una garza fissata con un cerotto non irritante. Nei casi in cui non è possibile l'applicazione diretta (ad es. liquidi e alcune paste), la sostanza in esame va prima applicata sulla garza, che poi è a sua volta applicata sulla pelle. La garza va mantenuta a contatto con la pelle, ma allentata, mediante una fasciatura semioclusiva, per tutta la durata del periodo di esposizione. Se la sostanza in esame è applicata sulla garza, essa va appoggiata sulla pelle in modo che la sostanza sia bene a contatto e si distribuisca uniformemente. Occorre impedire che l'animale abbia accesso alla garza e ingerisca o inalizzi la sostanza in esame.

Le sostanze sperimentali liquide si usano generalmente non diluite. Per l'esame dei solidi (che possono essere ridotti in polvere, se ritenuto necessario) la sostanza in esame va inumidita con la minor quantità d'acqua (o, ove necessario, di un altro eccipiente adeguato) sufficiente ad assicurare un buon contatto con la pelle. Se si impiegano eccipienti diversi dall'acqua, la potenziale influenza dell'eccipiente sull'irritazione della pelle da parte della sostanza in esame deve essere minima o nulla.

Al termine del periodo di esposizione, che è normalmente di 4 ore, la sostanza in esame residua va rimossa, ove possibile, usando acqua o un solvente adeguato senza alterare la risposta da essa provocata e l'integrità dell'epidermide.

1.4.2.2 *Livello di dosi*

Sul punto prescelto per il saggio va applicata una dose di 0,5 ml. di liquido o 0,5 g di solido o pasta.

1.4.2.3 *Saggio iniziale (Saggio di irritazione/corrosione cutanea in vivo su un solo animale)*

Si raccomanda caldamente di eseguire inizialmente il saggio in vivo usando un solo animale, soprattutto quando si sospetta che la sostanza sia potenzialmente corrosiva, in conformità alla strategia dei saggi sequenziali (cfr. Allegato 1).

Quando una sostanza è stata giudicata corrosiva sulla base di un'analisi dell'importanza delle prove, non è necessario eseguire ulteriori saggi su animali. Per la maggior parte delle sostanze sospettate di essere corrosive, non è normalmente necessario eseguire ulteriori saggi *in vivo*. Tuttavia, nei casi in cui si ritiene giustificato ottenere altri dati, in quanto le prove sono insufficienti, è possibile effettuare saggi limitati su animali secondo l'approccio seguente: all'animale si applicano un massimo di tre cerotti con garza per il saggio da contatto, in sequenza. Il primo cerotto è tolto dopo tre minuti. Se non si osservano reazioni cutanee gravi, si applica un secondo cerotto, che è rimosso dopo un'ora. Se le osservazioni in questa fase indicano che è possibile estendere l'esposizione a quattro ore, senza causare sofferenze, si applica un terzo cerotto, che è rimosso dopo quattro ore, e si valuta la reazione.

Se dopo una qualsiasi delle tre esposizioni in sequenza si osserva un effetto corrosivo, il saggio va immediatamente interrotto. Se dopo la rimozione dell'ultimo cerotto non si osserva alcun effetto corrosivo, si mantiene l'animale sotto osservazione per 14 giorni, a meno che la corrosione non si manifesti più precocemente.

Nei casi in cui non si prevede che la sostanza in esame produca corrosione, ma che possa essere irritante, applicare un unico cerotto a un solo animale per quattro ore.

1.4.2.4 *Saggio di conferma (saggio di irritazione cutanea in vivo con ulteriori animali)*

Se nel saggio iniziale non si osservano effetti corrosivi, confermare la reazione irritante o negativa su due altri animali al massimo, ciascuno con un cerotto, per un periodo di esposizione di quattro ore. Se nel saggio iniziale si osserva un effetto irritante, il saggio di conferma può essere condotto in maniera sequenziale, oppure esponendo contemporaneamente due altri animali. Nel caso eccezionale in cui non sia eseguito il saggio iniziale, è possibile trattare due o tre animali con un solo cerotto, che è poi asportato dopo quattro ore. Quando si usano due animali, se entrambi evidenziano la stessa reazione, non sono necessari altri saggi, altrimenti si sottopone al saggio anche il terzo animale. È possibile che siano necessari altri animali per valutare le reazioni dubbie.

1.4.2.5 *Periodo di osservazione*

La durata del periodo di osservazione deve essere sufficiente a valutare completamente la reversibilità degli effetti osservati. Interrompere però l'esperimento in qualsiasi momento se l'animale mostra segni continui di dolore o sofferenza gravi. Per determinare la reversibilità degli effetti, gli animali vanno osservati per un massimo di 14 giorni dopo la rimozione dei cerotti. In caso di reversibilità prima dei 14 giorni, interrompere subito l'esperimento.

1.4.2.6 *Osservazioni cliniche e classificazione delle reazioni cutanee*

Esaminare tutti gli animali per vedere se presentano segni di eritema e di edema e valutare le reazioni a 60 minuti e successivamente a 24, 48 e 72 ore dopo la rimozione del cerotto. Per il saggio iniziale su un solo animale, esaminare subito la zona prescelta per il saggio dopo la rimozione del cerotto. Le reazioni cutanee sono classificate e registrate in base ai gradi indicati nella tabella allegata. Se la pelle presenta una lesione che non può essere identificata come irritazione o corrosione a 72 ore, può essere necessario proseguire le osservazioni fino al giorno 14, per determinare la reversibilità degli effetti. Oltre alle osservazioni dell'irritazione, descrivere e documentare tutti gli effetti tossici locali, come la perdita del grasso cutaneo, ed eventuali effetti sistemici negativi (ad es. effetti sui segni clinici di tossicità e sul peso corporeo). Per chiarire le reazioni dubbie, valutare l'opportunità di eseguire un esame istopatologico.

La classificazione delle reazioni cutanee è necessariamente soggettiva. Per favorirne l'armonizzazione e per assistere i laboratori e le persone che eseguono il saggio e interpretano le osservazioni, istruire adeguatamente il personale sul sistema di punteggio usato (cfr. tabella più avanti). Potrebbe essere utile una guida illustrata per la classificazione dell'irritazione cutanea e di altre lesioni (9). La classificazione delle reazioni cutanee va valutata in cieco.

2. **DATI**

2.1 PRESENTAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dello studio vanno riassunti sotto forma di tabella nella relazione finale sul saggio e devono coprire tutte le voci elencate al punto 3.1.

2.2 VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Valutare il grado di irritazione cutanea insieme alla natura e alla gravità delle lesioni, nonché alla loro reversibilità o irreversibilità. Le reazioni individuali non rappresentano uno standard assoluto per le proprietà irritanti di un materiale, in quanto si valutano anche altri effetti del materiale in esame. I risultati individuali vanno invece considerati come valori di riferimento e devono essere valutati insieme a tutte le altre osservazioni emerse dallo studio.

Nella valutazione delle reazioni irritanti è necessario considerare la reversibilità delle lesioni cutanee. Quando reazioni quali alopecia (zona limitata), ipercheratosi, iperplasia e desquamazione persistono fino alla fine del periodo di osservazione di 14 giorni, la sostanza in esame va considerata irritante.

3. RAPPORTO

3.1 RAPPORTO SUL SAGGIO

Il rapporto deve contenere le seguenti informazioni:

Giustificazione del saggio *in vivo*: analisi dell'importanza delle prove di dati pre-esistenti, compresi i risultati della strategia dei saggi sequenziali:

- descrizione dei dati pertinenti disponibili da saggi precedenti;
- dati ricavati in ciascuna fase della strategia dei saggi;
- descrizione dei saggi *in vitro* eseguiti, con i dettagli delle procedure, i risultati ottenuti con le sostanze in esame/di riferimento;
- analisi dell'importanza delle prove per l'esecuzione dello studio *in vivo*.

Sostanza in esame:

- dati di identificazione (ad es. numero CAS, origine, purezza, impurità note, numero di lotto);
- natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad es. pH, volatilità, solubilità, stabilità);
- se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti.

Eccipiente:

- identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume usato;
- giustificazione della scelta dell'eccipiente.

Cavie:

- specie/ceppo usato, motivazione per l'uso di animali diversi dal coniglio albino;
- numero di animali di ciascun sesso;
- peso di ciascun singolo animale all'inizio e alla conclusione del saggio;
- età all'inizio dello studio;
- origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc..

Condizioni del saggio:

- tecnica di preparazione del punto di applicazione del cerotto;
- dettagli relativi al materiale del cerotto e alla tecnica di applicazione del cerotto;
- dettagli relativi a preparazione, applicazione e rimozione della sostanza in esame.

Risultati:

- tabulazione dei punteggi delle reazioni di irritazione/corrosione per ciascun animale in tutti i momenti di misurazione;
- descrizione di tutte le lesioni osservate;
- descrizione della natura e del grado di irritazione o corrosione osservate e degli eventuali reperti istopatologici;
- descrizione di altri effetti negativi locali (ad es. perdita del grasso cutaneo) e sistemici oltre all'irritazione e alla corrosione cutanea.

Discussione dei risultati

4.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.
- (2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.
- (3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709-720.
- (4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, "Skin Irritation", European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.
- (5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483-524.
- (5a) Metodo di prova B.40 Corrosione cutanea.
- (6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996. (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- (7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998. (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19. (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).
- (9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990. [Available from OECD Secretariat upon request].

TABELLA I: CLASSIFICAZIONE DELLE REAZIONI CUTANEE**Eritema e formazione di escara**

Assenza di eritema	0
Eritema molto lieve (appena percettibile)	1
Eritema ben definito	2
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso vivo) fino alla formazione di escara che impedisce la classificazione dell'eritema	4

Massimo possibile: 4

Formazione di edema

Assenza di edema	0
Edema molto lieve (appena percettibile)	1
Edema lieve (bordi dell'area ben definiti dal gonfiore)	2
Edema moderato (area sollevata di circa 1 mm)	3
Edema grave (area sollevata di oltre 1 mm ed estesa oltre la zona di esposizione)	4

Massimo possibile: 4

Per chiarire le reazioni dubbie è possibile eseguire un esame istopatologico.

ALLEGATO

Strategia dei saggi sequenziali per l'irritazione e la corrosione cutanee**CONSIDERAZIONI GENERALI**

Questa strategia dei saggi sequenziali non è parte integrante del metodo di prova B.4., ma esprime l'approccio raccomandato per determinare le caratteristiche di irritazione/corrosione cutanea. Tale approccio rappresenta sia la migliore prassi che un punto di riferimento etico per l'esecuzione di saggi *in vivo* sull'irritazione/corrosione cutanea. Il metodo di prova fornisce indicazioni su come eseguire il saggio *in vivo* e riassume i fattori da valutare prima di prendere in considerazione tale saggio. La strategia dei saggi sequenziali fornisce un approccio per valutare i dati esistenti sulle caratteristiche di irritazione/corrosione cutanea delle sostanze e un approccio graduale per lo sviluppo di dati pertinenti sulle sostanze sulle quali sono necessari ulteriori studi o che non sono mai state oggetto di studio. Essa raccomanda inoltre l'esecuzione di saggi validati ed accettati *in vitro* o *ex vivo* di irritazione/corrosione cutanea in circostanze specifiche.

Nell'interesse dell'accuratezza scientifica e del benessere degli animali, è importante evitare l'uso non necessario di animali e ridurre al minimo i saggi atti a provocare reazioni gravi. Valutare tutte le informazioni relative alla potenziale irritazione/corrosività cutanea di una sostanza prima di prendere in considerazione i saggi *in vivo*. È possibile che esistano già prove sufficienti per classificare il potenziale di irritazione o corrosione cutanea di una sostanza in esame, senza bisogno di effettuare saggi su animali da laboratorio. L'analisi dell'importanza delle prove e una strategia dei saggi sequenziali ridurranno al minimo la necessità di eseguire saggi *in vivo*, soprattutto se è probabile che la sostanza provochi reazioni gravi.

Si raccomanda l'uso di un'analisi dell'importanza delle prove per valutare le informazioni esistenti sul potenziale di irritazione e corrosione cutanea delle sostanze e determinare se occorre eseguire altri studi, diversi da quelli cutanei *in vivo*, per caratterizzare meglio tale potenziale. Qualora tali studi fossero necessari, si raccomanda di usare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati sperimentali pertinenti. Per le sostanze senza una documentazione sperimentale, usare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati necessari al fine di valutarne il potenziale di corrosività/irritazione cutanea. La strategia dei saggi descritta nel presente allegato è stata sviluppata nel corso di un workshop dell'OCSE (1), ed è stata successivamente confermata ed ampliata nello *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances* (Sistema di classificazione armonizzato integrato dei rischi per la salute umana e gli effetti ambientali delle sostanze chimiche), come approvato alla 28^a riunione congiunta del comitato sulle sostanze chimiche e dal gruppo di lavoro sulle sostanze chimiche nel novembre 1998 (2).

DESCRIZIONE DELLA STRATEGIA DI VALUTAZIONE E SAGGI

Prima di effettuare saggi nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali (Figura), occorre valutare tutte le informazioni disponibili, per determinare l'effettiva necessità di saggi cutanei *in vivo*. Sebbene sia possibile trarre significative informazioni dalla valutazione di singoli parametri (ad es. pH estremo), è necessario valutare la totalità delle informazioni esistenti. Nel prendere una decisione sull'importanza delle prove vanno valutati tutti i dati pertinenti sugli effetti della sostanza in questione e dei suoi analoghi strutturali e occorre giustificare tale decisione. Dare soprattutto importanza ai dati esistenti sulla sostanza riguardo a persone e animali, seguiti dal risultato dei saggi *in vitro* o *ex vivo*. Ove possibile, vanno evitati gli studi *in vivo* delle sostanze corrosive. I fattori considerati nella strategia di saggio sono:

Valutazione dei dati esistenti su soggetti umani e animali (Fase 1). Considerare innanzi tutto i dati esistenti sulle persone (studi clinici e occupazionali, relazioni di casi, e/o dati relativi a saggi su animali, ad es. da studi di tossicità da esposizione cutanea singola o ripetuta) in quanto forniscono informazioni direttamente correlate agli effetti sulla pelle. Non occorre sottoporre a saggi *in vivo* le sostanze notoriamente irritanti o corrosive, nonché quelle che hanno dimostrato inequivocabilmente di non essere corrosive e di non avere potere irritante.

Analisi delle relazioni struttura/attività (SAR) (Fase 2). Si devono considerare i risultati dei saggi di sostanze chimiche strutturalmente correlate, ove disponibili. Quando sono disponibili dati su persone e/o animali riguardo a sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze sufficienti a indicarne il potenziale di corrosione/irritazione cutanea, si può presumere che la sostanza in esame produrrà le stesse reazioni. In questi casi non è probabilmente necessario saggiare la sostanza. Dati negativi derivanti da studi di sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze non costituiscono una prova sufficiente di non corrosività/non potere irritante di una sostanza nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali. Per identificare il potenziale di corrosione e irritazione cutanea usare approcci SAR validati ed accettati.

Proprietà fisico-chimiche e reattività chimica (Fase 3). Le sostanze che presentano un pH estremo, come ad es. $\leq 2,0$ o $\geq 11,5$, possono avere forti effetti locali. Se il pH estremo costituisce la base per l'identificazione di una sostanza come corrosiva per la pelle, si può prendere in considerazione anche il suo rapporto acido/alcalino (capacità tampone) (3)(4). Se la capacità tampone suggerisce che una sostanza può non essere corrosiva per la pelle, è necessario effettuare ulteriori saggi a conferma di questo dato, di preferenza un saggio *in vitro* o *ex vivo* validato ed accettato (cfr. fasi 5 e 6).

Tossicità cutanea (Fase 4). Se una sostanza chimica è risultata molto tossica per via cutanea, non è probabilmente praticabile uno studio di irritazione/corrosione cutanea *in vivo*, poiché la quantità di sostanza in esame normalmente applicata potrebbe superare la dose altamente tossica e, di conseguenza, provocare la morte o grave sofferenza degli animali. Inoltre,

se sono già stati eseguiti studi di tossicità cutanea su conigli albini fino al livello limite di dose di 2 000 mg/kg di peso corporeo o superiori, e non è stata osservata irritazione o corrosione cutanea, diventano superflui ulteriori saggi per l'irritazione/corrosione cutanea. Quando si valuta la tossicità cutanea acuta in studi eseguiti in precedenza occorre tenere presenti numerose considerazioni. Per esempio, le informazioni riferite sulle lesioni cutanee possono essere incomplete. È possibile che i saggi e le osservazioni siano stati eseguiti su una specie diversa dal coniglio, e la sensibilità della reazione delle varie specie può essere molto diversa. Inoltre, è possibile che la forma della sostanza in esame applicata agli animali non fosse adeguata per la valutazione dell'irritazione/corrosione cutanea (ad es. diluizione delle sostanze per i saggi della tossicità cutanea) (5). Tuttavia, nel caso di studi di tossicità cutanea ben concepiti e ben condotti sui conigli, i risultati negativi possono essere considerati una prova sufficiente che la sostanza non è corrosiva o irritante.

Risultati dei saggi in vitro o ex vivo (Fasi 5 e 6). Non occorre sperimentare sugli animali le sostanze che hanno dimostrato di avere proprietà corrosive o gravemente irritanti in un saggio *in vitro* o *ex vivo* (6)(7) concepito per la valutazione di questi effetti specifici. Si può presumere che tali sostanze produrranno effetti analogamente gravi anche *in vivo*.

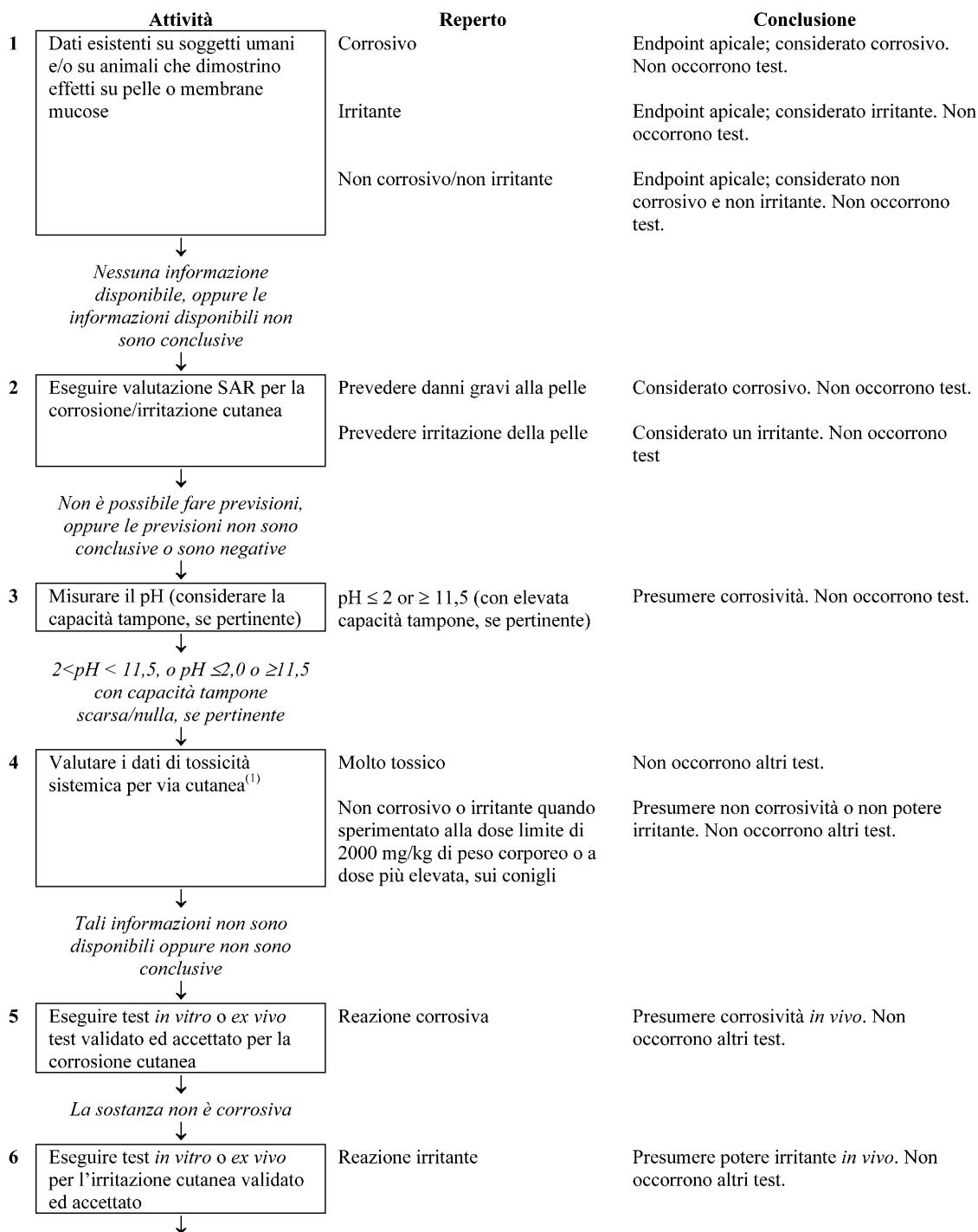
Saggio in vivo nei conigli (Fasi 7 e 8). Qualora in base all'analisi dell'importanza delle prove si arrivasse alla decisione di eseguire un saggio *in vivo*, esso deve cominciare con un saggio iniziale su un solo animale. Se i risultati di tale saggio indicano che la sostanza è corrosiva per la pelle, non si devono effettuare altri saggi. Se invece il saggio iniziale non rivela un effetto corrosivo, la reazione irritante o negativa va confermata usando al massimo due altri animali per un periodo di esposizione di quattro ore. Se il saggio iniziale rivela un effetto irritante, il saggio di conferma può essere condotto in maniera sequenziale, oppure esponendo contemporaneamente i due animali aggiuntivi.

BIBLIOGRAFIA

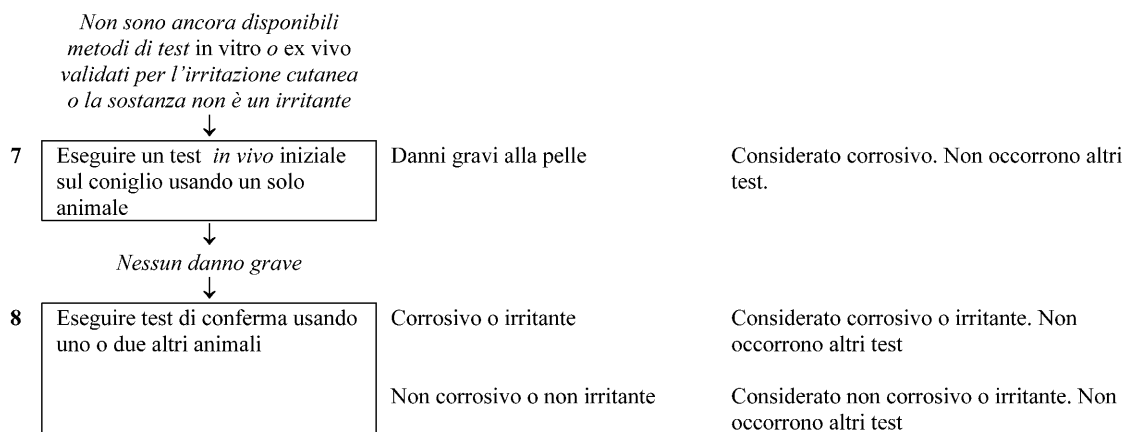
- (1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/tests/background/htm>).
- (2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. *ATLA* 26, 709-720.
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. *Toxic In Vitro*, 2 (1) pp 19-26.
- (5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): *Dermatotoxicology*. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411-436.
- (6) Metodo di prova B.40.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp. 483–524.

FIGURA

STRATEGIA DI TEST E VALUTAZIONE DELL'IRRITAZIONE/CORROSIONE CUTANEA



⁽¹⁾ Può essere preso in considerazione prima delle Fasi 2 e 3.



»

ALLEGATO 2E

«B.5. TOSSICITÀ ACUTA: IRRITAZIONE/CORROSIONE OCULARE

1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 405 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Nella preparazione di questo metodo aggiornato è stata dedicata particolare attenzione ai possibili miglioramenti, mediante la valutazione di tutte le informazioni disponibili circa la sostanza in esame, per evitare prove non necessarie sugli animali da laboratorio e tener conto del benessere degli animali. Questo metodo include la raccomandazione, prima di effettuare il saggio *in vivo* descritto per l'irritazione/corrosione oculare acuta, di una analisi accurata dei dati disponibili e pertinenti (*weight-of-the-evidence analysis*) (1) sui dati pertinenti esistenti. Qualora i dati disponibili fossero insufficienti, si raccomanda di ottenerli mediante l'applicazione di saggio sequenziali (2)(3). La strategia saggioraccomandata comprende l'esecuzione di saggio *in vitro* validati ed accettati ed è descritta nell'Allegato al metodo. Inoltre, si raccomanda l'uso di un saggio di irritazione/corrosione cutanea *in vivo* per prevedere la corrosione oculare prima di considerare un saggio oculare *in vivo*.

Nell'interesse dell'accuratezza scientifica e del benessere degli animali, non bisogna prendere in considerazione i saggio *in vivo* finché non siano stati valutati, considerando l'importanza delle prove, tutti i dati disponibili pertinenti circa la potenziale corrosività/irritazione oculare della sostanza. Tali dati devono comprendere prove derivanti da studi esistenti su soggetti umani e/o animali da laboratorio, prove di corrosività/irritazione di una o più sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze, dati dimostranti l'elevata acidità o alcalinità della sostanza (4)(5), nonché i risultati di saggio *in vitro* o *ex vivo* validati ed accettati per la corrosione e l'irritazione cutanea (6)(6a). Gli studi possono essere stati condotti prima di un'analisi dell'importanza delle prove, o in conseguenza di essa.

Per alcune sostanze, un'analisi di questo tipo può indicare la necessità di studi *in vivo* del potenziale di corrosione/irritazione oculare. In tutti questi casi, prima di considerare l'uso del saggio oculare *in vivo*, va preferibilmente condotto uno studio sugli effetti cutanei *in vivo* della sostanza, evaluate in base al metodo B.4 (7). L'applicazione di un'analisi dell'importanza delle prove e la strategia dei saggio sequenziali dovrebbe ridurre la necessità di eseguire saggio *in vivo* della corrosività/irritazione delle sostanze per le quali esistano già prove sufficienti derivanti da altri studi. Qualora non sia possibile determinare il potenziale di corrosione o irritazione oculare usando la strategia dei saggio sequenziali, anche dopo l'esecuzione di uno studio *in vivo* della corrosione e dell'irritazione della cute, si può effettuare un saggio *in vivo* della corrosione/irritazione oculare.

Nell'Allegato al presente metodo di prova è inclusa la strategia dei saggio sequenziali da preferirsi, che prevede l'esecuzione di saggio validati *in vitro* o *ex vivo* per la corrosione/irritazione. Tale strategia è stata sviluppata e raccomandata all'unanimità dai partecipanti a un workshop dell'OCSE (8), ed è stata adottata come strategia raccomandata di saggio nel GHS (*Globally Harmonised System for the Classification of Chemical Substances*) (Sistema globale armonizzato per la classificazione delle sostanze chimiche) (9). Sebbene tale strategia dei saggio sequenziali non sia parte integrante del metodo di prova B.4, si raccomanda che venga seguita prima di passare ai saggio *in vivo*. Per le nuove sostanze, si raccomanda di adottare una strategia a "tappesaggio" (*stepwise*), per sviluppare dati scientificamente validi sulla corrosività/irritazione della sostanza. Se per le sostanze esistenti i dati sulla corrosione/irritazione oculare e cutanea sono insufficienti, si può usare tale strategia per recuperare i dati mancanti. È necessario giustificare l'uso di una strategia o procedura di saggio differente, nonché l'eventuale decisione di non usare un approccio di saggio "per gradi."

1.2 DEFINIZIONI

Irritazione oculare: produzione di alterazioni nell'occhio in seguito all'applicazione della sostanza in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, completamente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione.

Corrosione oculare: produzione di lesioni del tessuto oculare o di un grave deterioramento fisico della vista, in seguito all'applicazione della sostanza in esame sulla superficie anteriore dell'occhio, non completamente reversibili entro 21 giorni dall'applicazione.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO SAGGIO

La sostanza in esame è applicata in un'unica dose su uno degli occhi dell'animale sperimentale; l'occhio non trattato serve da controllo. Il grado di irritazione/corrosione è valutato dando un punteggio alle lesioni di congiuntiva, cornea e iride, a intervalli di tempo specifici. Sono descritti anche altri effetti sull'occhio ed effetti negativi sistemici, con l'obiettivo di fornire una valutazione completa degli effetti. La durata dello studio deve essere sufficiente a valutare la reversibilità o irreversibilità degli effetti.

Gli animali che presentano segni prolungati di grave sofferenza e/o dolore, in qualsiasi fase del saggio, vanno soppressi con metodi non cruenti e la sostanza va valutata di conseguenza. Cfr. bibliografia per i criteri da seguire nel decidere l'eutanasia di animali moribondi o che soffrono gravemente (10).

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO SAGGIO

1.4.1 Preparazione per il saggio *in vivo*

1.4.1.1 Selezione delle specie

L'animale da laboratorio di elezione è il coniglio albino, del quale vanno utilizzati giovani adulti sani. Giustificare l'eventuale uso di altri ceppi o specie.

1.4.1.2 Preparazione degli animali

Entro 24 ore dall'inizio del saggio è necessario esaminare entrambi gli occhi di ciascun animale sperimentale provvisoriamente selezionato per il saggio. Non vanno utilizzati animali che presentino irritazione oculare, difetti degli occhi o preesistenti lesioni corneali.

1.4.1.3 Condizioni di alloggio e alimentazione

Gli animali vanno posti in gabbie singole. La temperatura del locale deve essere di 20 °C (\pm 3 °C) per i conigli. Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per l'alimentazione, attenersi alle diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

1.4.2 Procedura

1.4.2.1 Applicazione della sostanza in esame

La sostanza in esame va posta nel sacco congiuntivale di un occhio di ciascun animale, dopo aver allontanato delicatamente la palpebra inferiore dal bulbo. Le palpebre vanno poi tenute unite con delicatezza per circa un secondo, per evitare la fuoriuscita del materiale. L'altro occhio, che non viene trattato, serve da controllo.

1.4.2.2 Irrigazione

Gli occhi degli animali sperimentali non vanno lavati per almeno 24 ore dopo l'instillazione della sostanza in esame, tranne nel caso di saggio di sostanze solide (cfr. punto 1.4.2.3.2), e nel caso di effetti corrosivi o irritanti immediati. Dopo 24 ore è possibile effettuare un lavaggio, se lo si considera necessario.

Non si raccomanda l'uso di un gruppo satellite di animali per studiare l'influenza del lavaggio oculare, a meno che ciò non risulti scientificamente giustificato. Qualora sia necessario un gruppo satellite, vanno usati due conigli. Le condizioni del lavaggio vanno documentate accuratamente: momento del lavaggio, composizione e temperatura della soluzione di lavaggio, durata, volume e velocità di applicazione.

1.4.2.3 Livello di dosi

1.4.2.3.1 Saggio di liquidi

Per saggiare i liquidi usare una dose di 0,1 ml. Non usare spray per instillare la sostanza direttamente nell'occhio; lo spray liquido va spruzzato e raccolto in un contenitore prima di instillarne 0,1 ml nell'occhio.

1.4.2.3.2 *Saggio di solidi*

Nei saggio di sostanze solide, paste e sostanze particellari, la quantità impiegata deve avere un volume di 0,1 ml o un peso non superiore a 100 mg. Il materiale in esame va ridotto in polvere fine. Prima della misurazione del volume, il materiale solido va delicatamente compattato, ad esempio picchiando sul contenitore per la misurazione. Se la sostanza in esame solida non è stata rimossa dall'occhio dell'animale da meccanismi fisiologici, al primo tempo di osservazione un'ora dopo il trattamento, si può sciacquare l'occhio con soluzione salina o acqua distillata.

1.4.2.3.3 *Saggio di aerosol*

Si raccomanda di raccogliere tutti gli spray e gli aerosol prima dell'instillazione nell'occhio. L'unica eccezione riguarda le sostanze in contenitori pressurizzati per aerosol, che non possono essere raccolte a causa della vaporizzazione. In questi casi l'occhio va tenuto aperto e la sostanza va somministrata nell'occhio con un unico spruzzo di circa un secondo, da una distanza di 10 cm, direttamente davanti all'occhio. La distanza può variare a seconda della pressione dello spray e del suo contenuto. Evitare di danneggiare l'occhio con la pressione dello spray. In alcuni casi può essere necessario valutare il potenziale di danno "meccanico" all'occhio dovuto alla forza dello spray.

È possibile ottenere una stima della dose di un aerosol simulando il saggio come segue: spruzzare la sostanza attraverso un'apertura delle dimensioni dell'occhio di un coniglio posta esattamente di fronte ad un foglio di carta. L'aumento di peso della carta viene usato quindi per approssimare la quantità spruzzata nell'occhio. Per le sostanze volatili, la dose può essere stimata pesando un contenitore ricevente prima e dopo la rimozione del materiale in esame.

1.4.2.4 *Saggio iniziale (saggio di irritazione/corrosione oculare in vivo su un solo animale)*

Come descritto nella strategia dei saggio sequenziali (cfr. Allegato 1), si raccomanda caldamente di eseguire inizialmente il saggio *in vivo* usando un solo animale.

Se con la procedura descritta, i risultati di tale saggio indicano che la sostanza è corrosiva o gravemente irritante per l'occhio, non eseguire altri saggio di irritazione oculare.

1.4.2.5 *Anestetici locali*

È possibile applicare anestetici locali, valutandone la necessità caso per caso. Se l'analisi dell'importanza delle prove indica che la sostanza può provocare dolore, e se il saggio iniziale dimostra che si verificherà una reazione dolorosa, prima dell'instillazione della sostanza in esame si può applicare un anestetico locale. Il tipo, la concentrazione e la dose dell'anestetico locale vanno attentamente selezionati in modo da assicurare che il suo uso non modifichi la reazione alla sostanza in esame. Anche l'occhio di controllo va anestetizzato analogamente.

1.4.2.6 *Saggio di conferma (saggio di irritazione oculare in vivo con animali supplementari)*

Se nel saggio iniziale non si osservano effetti corrosivi, confermare la reazione irritante o negativa su un massimo di altri due animali. Se nel saggio iniziale è stato osservato un effetto fortemente irritante che indica un possibile effetto grave (irreversibile) si raccomanda di eseguire il saggio di conferma in maniera sequenziale su un solo animale per volta, anziché esporre contemporaneamente i due animali. Se il secondo animale rivela effetti corrosivi o gravemente irritanti, interrompere il saggio. È possibile che siano necessari altri animali per confermare le reazioni irritanti deboli o moderate.

1.4.2.7 *Periodo di osservazione*

La durata del periodo di osservazione deve essere sufficiente a valutare completamente l'entità e la reversibilità degli effetti osservati. Interrompere però l'esperimento in qualsiasi momento se l'animale mostra segni continui di dolore o sofferenza gravi (9). Per determinare la reversibilità degli effetti, gli animali vanno osservati di norma per 21 giorni successivamente alla somministrazione della sostanza in esame. In caso di reversibilità prima dei 21 giorni, interrompere subito l'esperimento.

1.4.2.7.1 Osservazioni cliniche e classificazione delle reazioni oculari

Gli occhi vanno esaminati a 1, 24, 48 e 72 ore dopo l'applicazione della sostanza in esame. Gli animali devono essere sottoposti a saggio per il tempo minimo necessario per ottenere informazioni definitive. Gli animali che presentano grave dolore o sofferenza vanno soppressi al più presto con metodi non cruenti e la sostanza va valutata di conseguenza. Sopprimere con metodi non cruenti gli animali che, dopo l'instillazione, presentano le seguenti lesioni oculari: perforazione corneale o ulcerazione corneale di rilievo, compreso stafiloma; sangue nella camera anteriore dell'occhio; opacità corneale di grado 4 che persista per 48 ore; assenza di riflesso pupillare alla luce (risposta dell'iride di grado 2) che persista per 72 ore; ulcerazione della membrana congiuntivale; necrosi della congiuntiva o della membrana nittitante; distacco epidermico. Tali lesioni sono infatti generalmente irreversibili.

Gli animali che non sviluppano lesioni oculari possono essere soppressi non prima di 3 giorni dopo l'instillazione. Gli animali con lesioni lievi o moderate vanno tenuti sotto osservazione fino alla scomparsa delle lesioni, oppure per 21 giorni, momento in cui lo studio si conclude. Effettuare le osservazioni nei giorni 7, 14 e 21, con l'obiettivo di determinare lo stato delle lesioni e la loro reversibilità o irreversibilità.

In occasione di ciascun esame, registrare i gradi della reazione oculare (congiuntiva, cornea e iride) (Tabella I). Annotare anche qualsiasi altra lesione dell'occhio (ad es. panno corneale, macchie) e qualsiasi effetto sistemico negativo.

L'esame delle reazioni può essere facilitato usando una lente binoculare, una lampada manuale a fessura, un biomicroscopio o altro dispositivo idoneo. Dopo aver registrato le osservazioni a 24 ore, è possibile esaminare ulteriormente gli occhi con l'ausilio di fluoresceina.

La classificazione delle reazioni oculari è necessariamente soggettiva. Per favorirne l'armonizzazione e per assistere i laboratori e le persone che eseguono e interpretano le osservazioni, istruire adeguatamente il personale sul sistema di punteggio utilizzato. La classificazione delle reazioni oculari va valutata in cieco.

2. DATI

2.2 VALUTAZIONE DEI RISULTATI

Valutare i punteggi dell'irritazione oculare insieme alla natura e alla gravità delle lesioni, nonché alla loro reversibilità o irreversibilità. I punteggi individuali non rappresentano uno standard assoluto per le proprietà irritanti di un materiale, in quanto si valutano anche altri effetti del materiale in esame. I punteggi individuali vanno invece considerati come valori di riferimento e hanno significato solo se corredati da una descrizione e una valutazione complete di tutte le osservazioni.

3. RAPPORTO

3.1 RAPPORTO DI PROVA

Il rapporto deve contenere le seguenti informazioni:

Motivazione per il saggio *in vivo*: analisi dei dati relativi a saggio precedenti, compresi i risultati della strategia dei saggio sequenziali

- descrizione dei dati pertinenti disponibili da saggio precedenti;
- dati ricavati in ciascuna fase della strategia dei saggio;
- descrizione dei saggio *in vitro* eseguiti, con i dettagli delle procedure, i risultati ottenuti con le sostanze in esame/di riferimento;
- descrizione dello studio di irritazione/corrosione cutanea *in vivo* eseguito, con i risultati ottenuti;
- analisi dell'importanza delle prove per l'esecuzione dello studio *in vivo*

Sostanza in esame:

- dati di identificazione (ad es. numero CAS, origine, purezza, impurità note, numero di lotto);
- natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad es. pH, volatilità, solubilità, stabilità, reattività con l'acqua);
- se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti;
- se si usa un anestetico locale, identificazione, purezza, tipo, dose e potenziale interazione con la sostanza in esame.

Eccipiente:

- identificazione, concentrazione (ove pertinente), volume usato;
- giustificazione della scelta dell'eccipiente.

Animali sperimentali:

- specie/ceppo usato, motivazione dell'uso di animali diversi dal coniglio albino;
- età di ciascun animale all'inizio dello studio;
- numero di animali di ciascun sesso nei gruppi sperimentali e di controllo (ove necessario);
- peso di ciascun singolo animale all'inizio e alla conclusione del saggio;
- origine, condizioni di alloggio, dieta, ecc.

Risultati:

- descrizione del metodo usato per assegnare un punteggio all'irritazione in ciascun momento di osservazione (ad es. lampada manuale a fessura, biomicroscopio, fluoresceina);
- tabulazione dei dati relativi alla reazione irritante/corrosiva per ciascun animale e in ciascun momento di osservazione fino saggio alla fine del saggio
- descrizione del grado e della natura dell'irritazione o della corrosione osservata;
- descrizione di qualsiasi altra lesione osservata nell'occhio (ad es. vascolarizzazione, formazione di panno oculare, aderenze, macchie);
- descrizione degli eventuali effetti negativi non oculari locali e sistemici e degli eventuali reperti istopatologici.

Discussione dei risultati.

3.2

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'estrapolazione dei risultati degli studi sull'irritazione oculare negli animali da laboratorio agli esseri umani ha un valore solo limitato. In molti casi, il coniglio albino è più sensibile dell'uomo alle sostanze irritanti o corrosive per l'occhio.

È necessario interpretare con attenzione i dati per escludere l'irritazione dovuta a infezione secondaria.

4.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410-429.
- (2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Saggioing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159-164.
- (3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise saggioing strategies ATLA 27, 161-177
- (4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Saggioing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19-26.
- (5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227-231.
- (6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro saggios for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp.483-524.
- (6a) Metodo di prova B.40 Corrosione cutanea.
- (7) Metodo di prova B.4. Tossicità acuta: irritazione/corrosione cutanea.
- (8) OECD (1996) OECD Saggio Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Saggio Methods. Held in Solna, Sweden, 22 - 24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/saggio/background.htm>).
- (9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Saggioing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/saggio/monos.htm>).

TABELLA I: CLASSIFICAZIONE DELLE LESIONI OCULARI**Cornea**

Opacità: grado di densità (le misure vanno prese dalle zone più dense) (*)

Assenza di ulcerazione e opacità	0
Zone di opacità sparse o diffuse (diverse dal lieve appannamento della normale lucentezza); dettagli dell'iride visibili chiaramente	1
Zone traslucide facilmente individuabili; dettagli dell'iride lievemente offuscati	2
Zona madreperlacea; nessun dettaglio visibile dell'iride; dimensioni della pupilla appena distinguibili	3
Cornea opaca; iride non distinguibile attraverso l'opacità	4

Massimo possibile: 4

(*) Indicare l'area di opacità corneale

Iride

Normale	0
Rughe notevolmente approfondite, congestione, edema, moderata iperemia circumcorneale; oppure iniezione; iride reattiva alla luce (una reazione lenta è considerata positiva)	1
Emorragia, distruzione macroscopica, oppure assenza di reazione alla luce	2

Massimo possibile: 2

Congiuntive

Rossore (relativo alla congiuntiva palpebrale e bulbare; escluse cornea e iride)

Normale.	0
Alcuni vasi sanguigni iperemici (iniettati)	1
Colore cremisi diffuso; singoli vasi non facilmente distinguibili	2
Rosso acceso diffuso	3

Massimo possibile: 3

Chemosi

Edema (relativo alle palpebre e/o alle membrane nittitanti)

Normale	0
Edema appena superiore alla norma	1
Edema evidente, con parziale eversione delle palpebre	2
Edema, con palpebre semichiuse	3
Edema, con palpebre più che semichiuse	4

Massimo possibile: 4

ALLEGATO

Strategia dei saggi sequenziali per l'irritazione e la corrosione oculari**CONSIDERAZIONI**

Nell'interesse dell'accuratezza scientifica e del benessere degli animali, è importante evitare l'uso non necessario di animali e ridurre al minimo i saggi atti a provocare reazioni gravi. Valutare tutte le informazioni relative alla potenziale irritazione/corrosività oculare di una sostanza prima di prendere in considerazione i saggi *in vivo*. È possibile che esistano già prove sufficienti per classificare il potenziale di irritazione o corrosione oculare di una sostanza in esame, senza bisogno di effettuare saggi su animali da laboratorio. L'analisi dell'importanza delle prove e l'uso di una strategia dei saggi sequenziali ridurranno al minimo la necessità di eseguire saggi *in vivo*, soprattutto se è probabile che la sostanza provochi reazioni gravi.

Si raccomanda di svolgere un'analisi dell'importanza delle prove per valutare le informazioni esistenti sul potenziale di irritazione e corrosione oculare delle sostanze e determinare la necessità di altri studi, diversi da quelli *in vivo* sugli occhi, per meglio caratterizzare tale potenziale. Qualora tali studi fossero necessari, si raccomanda di applicare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati sperimentali pertinenti. Per le sostanze senza una documentazione sperimentale, usare la strategia dei saggi sequenziali per sviluppare i dati necessari al fine di valutarne la corrosività/irritazione oculare. La strategia dei saggi descritta nel presente Allegato è stata sviluppata nel corso di un workshop dell'OCSE (1) e successivamente confermata ed ampliata nello *Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances* (Sistema di classificazione armonizzato integrato dei rischi per la salute umana e gli effetti ambientali delle sostanze chimiche), come approvato alla 28a riunione congiunta del comitato sulle sostanze chimiche e dal gruppo di lavoro sulle sostanze chimiche nel novembre 1998 (2).

Questa strategia di saggio non è parte integrante del metodo di prova B.5, ma esprime l'approccio raccomandato per la determinazione delle proprietà di irritazione/corrosione oculare. Tale approccio rappresenta sia la migliore prassi che un punto di riferimento etico per l'esecuzione di saggi *in vivo* sull'irritazione/corrosione oculare. Il metodo di prova fornisce indicazioni su come eseguire il saggio *in vivo* e riassume i fattori da valutare prima di prendere in considerazione tale saggio. La strategia dei saggi sequenziali fornisce un metodo di analisi dell'importanza delle prove per la valutazione dei dati esistenti sulle proprietà di irritazione/corrosione oculare delle sostanze e un approccio graduale per lo sviluppo di dati pertinenti sulle sostanze sulle quali sono necessari ulteriori studi o che non sono mai state oggetto di studio. La strategia prevede dapprima l'esecuzione di saggi validati ed accettati *in vitro* o *ex vivo* e successivamente di studi di irritazione/corrosione cutanea in base al metodo di prova B.4 in circostanze specifiche (3)(4).

DESCRIZIONE DELLA STRATEGIA DI SAGGIO "PER GRADI"

Prima di effettuare saggi nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali (Figura), valutare tutte le informazioni disponibili, per determinare l'effettiva necessità di saggi oculari *in vivo*. Sebbene sia possibile trarre significative informazioni dalla valutazione di singoli parametri (ad es. pH estremo), è necessario valutare la totalità delle informazioni esistenti. Nel prendere una decisione sull'importanza delle prove valutare tutti i dati pertinenti sugli effetti della sostanza in questione e dei suoi analoghi strutturali e giustificare tale decisione. Dare soprattutto importanza ai dati esistenti sulla sostanza riguardo a persone e animali, seguiti dal risultato dei saggi *in vitro* o *ex vivo*. Ove possibile, evitare gli studi *in vivo* delle sostanze corrosive. I fattori considerati nella strategia di saggio sono:

Valutazione dei dati esistenti su soggetti umani e animali (Fase 1). Considerare innanzi tutto i dati esistenti sulle persone (studi clinici e occupazionali, relazioni di casi, e/o dati relativi a saggi su animali in studi sugli occhi), in quanto forniscono informazioni direttamente correlate agli effetti sugli occhi. Successivamente valutare i dati disponibili di studi su soggetti umani e/o animali sulla corrosione/irritazione cutanea. Non instillare negli occhi degli animali sostanze notoriamente corrosive o gravemente irritanti per l'occhio né sostanze che mostrano effetti corrosivi o irritanti sulla pelle; tali sostanze vanno considerate corrosive e/o irritanti anche per gli occhi. Non saggiare *in vivo* sugli occhi sostanze che in precedenti studi oculari hanno presentato prove sufficienti di non essere corrosive e di non avere potere irritante.

Analisi delle relazioni struttura/attività (SAR) (Fase 2). Prendere in considerazione i risultati dei saggi di sostanze chimiche strutturalmente correlate, ove disponibili. Quando sono disponibili dati su persone e/o animali riguardo a sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze sufficienti a indicarne il potenziale di corrosione/irritazione oculare, si può presumere che la sostanza in esame provocherà le stesse reazioni. In questi casi non è probabilmente necessario saggiare la sostanza. Dati negativi derivanti da studi di sostanze strutturalmente correlate o miscele di tali sostanze non costituiscono una prova sufficiente di non corrosività/non potere irritante di una sostanza nell'ambito della strategia dei saggi sequenziali. Per identificare il potenziale di corrosione e irritazione sia per gli effetti oculari che per quelli cutanei usare approcci SAR validati ed accettati.

Proprietà fisicochimiche e reattività chimica (Fase 3). Le sostanze che presentano un pH estremo, come ad es. $\leq 2,0$ o $\geq 11,5$, possono avere forti effetti locali. Se il pH estremo costituisce la base per identificare una sostanza come corrosiva o irritante per gli occhi, si può prendere in considerazione anche il suo rapporto acido/alcalino (capacità tampone) (5)(6). Se la capacità tampone suggerisce che una sostanza può non essere corrosiva per l'occhio, è necessario effettuare ulteriori saggi a conferma di questo dato, di preferenza un saggio *in vitro* o *ex vivo* validato ed accettato (cfr. punto Fasi 5 e 6).

Considerazione di altre informazioni esistenti (Fase 4). Valutare in questa fase tutte le informazioni disponibili sulla tossicità sistemica per via cutanea. Considerare anche la tossicità cutanea acuta della sostanza in esame. Se essa si è dimostrata molto tossica per via cutanea, può non essere necessario saggiarla sull'occhio. Sebbene non vi sia necessariamente un rapporto fra la tossicità cutanea acuta e l'irritazione/corrosione oculare, si può presumere che se una sostanza è molto tossica per via cutanea, presenterà anche elevata tossicità quando viene instillata nell'occhio. Questi dati possono essere valutati anche fra le fasi 2 e 3.

Risultati dei saggi in vitro o ex vivo (Fasi 5 e 6). Non occorre sperimentare sugli animali le sostanze che hanno dimostrato di avere proprietà corrosive o gravemente irritanti in un saggio *in vitro* o *ex vivo* (7)(8) che è stato validato ed accettato per la valutazione specifica della corrosività/irritazione oculare o cutanea. Si può presumere che tali sostanze produrranno effetti analogamente gravi anche *in vivo*. Qualora non siano disponibili saggi *in vitro/ex vivo* validati ed accettati, si salteranno le Fasi 5 e 6 e si procederà direttamente alla Fase 7.

Valutazione del potere irritante o della corrosività cutanea in vivo della sostanza (Fase 7). Quando le prove esistenti non sono sufficienti ad effettuare un'analisi dell'importanza delle prove conclusiva della potenziale irritazione/corrosività oculare di una sostanza, sulla base dei dati degli studi sopra elencati, occorre valutare per prima cosa il potenziale di irritazione/corrosione cutanea *in vivo*, usando il metodo di prova B.4 (4) e il suo Allegato (9). Qualora si dimostri che la sostanza provoca corrosione o grave irritazione cutanea, essa va considerata un irritante oculare corrosivo, a meno che altre informazioni non vadano a sostegno di una conclusione alternativa. Pertanto, non è necessario eseguire un saggio oculare *in vivo*. Se la sostanza non è corrosiva o gravemente irritante per la pelle, va eseguito un saggio oculare *in vivo*.

Saggio in vivo nei conigli (Fasi 8 e 9). Gli studi oculari *in vivo* devono cominciare con un saggio iniziale su un solo animale. Se i risultati di questo saggio indicano che la sostanza è gravemente irritante o corrosiva per gli occhi, non si devono effettuare altri saggi. Se invece il saggio non rivela effetti corrosivi o gravemente irritanti, si esegue un saggio di conferma con altri due animali.

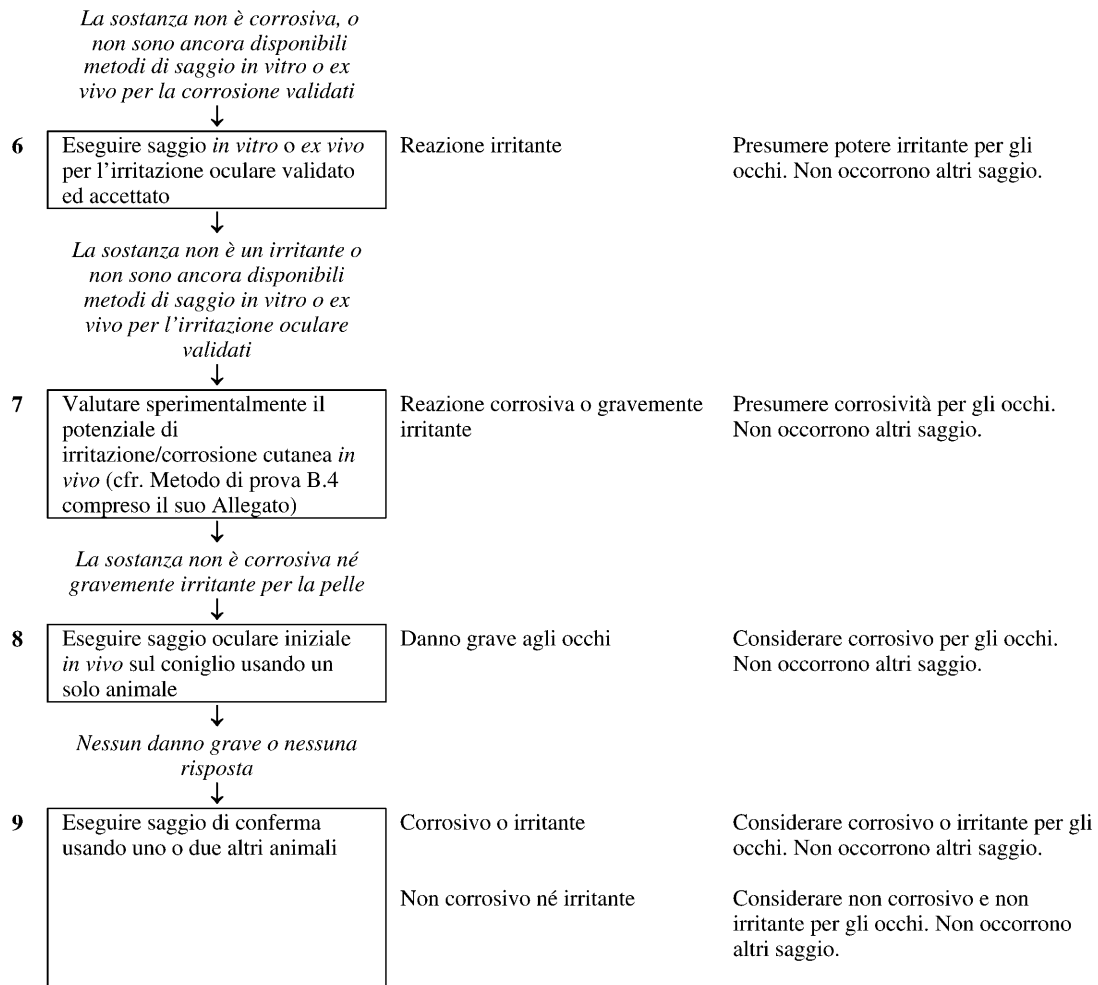
BIBLIOGRAFIA

- (1) OECD (1996) OECD Saggio Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Saggio Methods. Held in Solna, Sweden, 22-24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/saggio/background.htm>).
- (2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- (3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Saggioing Strategies. *ATLA* 27, 161-177.
- (4) Metodo di prova B.4. Tossicità acuta: irritazione/corrosione cutanea.
- (5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Saggioing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19-26.
- (6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227-231.
- (7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* saggios for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp.483-524.
- (8) Metodo di prova B.40 Corrosione cutanea.
- (9) Allegato al metodo di prova B.4: Una strategia dei saggio sequenziali per l'irritazione e la corrosione cutanee.

FIGURA

STRATEGIA DI SAGGIO E VALUTAZIONE DELL'IRRITAZIONE/CORROSIONE OCULARE

	Attività	Reperto	Conclusione
1	<p>Dati esistenti su soggetti umani e/o su animali che dimostrino effetti sugli occhi</p> <p>Dati esistenti su soggetti umani e/o su animali che dimostrino effetti corrosivi per la pelle</p> <p>Dati esistenti su soggetti umani e/o su animali che dimostrino gravi effetti irritanti per la pelle</p>	Danni gravi agli occhi	Endpoint apicale; considerare corrosivo per gli occhi. Non occorrono saggio.
		Irritante per gli occhi	Endpoint apicale; considerare irritante per gli occhi. Non occorrono saggio.
		Non corrosivo/non irritante per gli occhi	Endpoint apicale; considerato non corrosivo e non irritante per gli occhi. Non occorrono saggio.
		Corrosivo per la pelle	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggio.
	<p><i>Nessuna informazione disponibile, oppure le informazioni disponibili non sono conclusive</i></p>		
2	<p>Eseguire SAR per la corrosione/irritazione oculare</p> <p>Eseguire SAR per la corrosione della pelle</p>	Prevedere danni gravi agli occhi	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggio.
		Prevedere irritazione degli occhi	Presumere potere irritante per gli occhi. Non occorrono saggio.
		Prevedere corrosività per la pelle	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggio.
	<p><i>Non è possibile fare previsioni, oppure le previsioni non sono conclusive o sono negative</i></p>		
3	Misurare il pH (capacità tampone, se pertinente)	pH ≤ 2 o $\geq 11,5$ (con elevata capacità tampone, se pertinente)	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono saggio.
	<p><i>$2 < pH < 11,5$, or $pH \leq 2,0$ o $\geq 11,5$ con capacità tampone scarsa/nulla, se pertinente</i></p>		
4	Valutare tossicità sistemica per via cutanea	Molto tossico a concentrazioni che andrebbero saggiate nell'occhio.	La sostanza sarebbe troppo tossica per i saggio. Non occorrono saggio.
	<p><i>Tali informazioni non sono disponibili, oppure la sostanza non è molto tossica</i></p>		
5	Eseguire saggio <i>in vitro</i> o <i>ex vivo</i> per la corrosione oculare validato ed accettato	Reazione corrosiva	Presumere corrosività per gli occhi. Non occorrono altri saggio.



»

ALLEGATO 2F

«B.31. STUDIO DI TOSSICITÀ PRENATALE

1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 414 (2001) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Questo metodo di test della tossicità prenatale è disegnato per fornire informazioni generiche riguardanti gli effetti dell'esposizione prenatale a determinate sostanze sia su femmine gravide che sull'organismo che si sta sviluppando nell'utero. Il test può comprendere la valutazione degli effetti sulla madre e delle cause della morte o di anomalie fisiche strutturali o alterazioni della crescita del feto. I deficit funzionali, per quanto costituiscano una parte importante dello sviluppo, non sono parte integrante del presente metodo e possono essere valutati in uno studio separato o come segmento aggiuntivo a questo studio, usando il metodo di test della neurotossicità nella fase di sviluppo. Per ottenere dati sull'analisi dei deficit funzionali e di altri effetti postnatali si rimanda, a seconda dei casi, al metodo di test per lo studio della tossicità sulla riproduzione in due generazioni o a quello sulla neurotossicità in fase di sviluppo.

Questo metodo di test può richiedere un adattamento particolare in alcuni casi, ad esempio in funzione delle conoscenze specifiche circa le proprietà fisico-chimiche o tossicologiche della sostanza di saggio. Tale adattamento è accettabile laddove, in base ad opportuni riscontri scientifici, risulti utile ai fini della raccolta di dati più specifici. In questo caso tali prove scientifiche vanno attentamente documentate nella relazione sullo studio.

1.2 DEFINIZIONI

Tossicologia prenatale: studio degli effetti negativi sull'organismo che si sta sviluppando che possono derivare dall'esposizione prima del concepimento, durante lo sviluppo prenatale o successivamente alla nascita fino al momento della maturazione sessuale. Le manifestazioni principali della tossicità sullo sviluppo comprendono 1) morte dell'organismo, 2) anomalia strutturale, 3) alterazione della crescita e 4) deficit funzionali. L'espressione "tossicologia prenatale" ha soppiantato il termine "teratologia", utilizzato in passato.

Effetto negativo: qualsiasi alterazione rispetto al valore basale correlata al trattamento che riduca la capacità di un organismo di sopravvivere, riprodursi o adattarsi all'ambiente. Per quanto concerne la tossicologia prenatale, nel senso più ampio tale termine comprende qualunque effetto che interferisca con il normale sviluppo del concepito, sia prima che dopo la nascita.

Alterazione della crescita: alterazione di un organo o del peso corporeo o delle dimensioni della prole.

Alterazioni (anomalie): alterazioni strutturali dello sviluppo, comprendenti sia malformazioni che variazioni (28).

Malformazione/Anomalia grave: modifica strutturale considerata dannosa per l'animale (può anche essere letale) e solitamente rara.

Variatione/Anomalia non grave: modifica strutturale considerata scarsamente o per nulla dannosa per l'animale; può essere transitoria e può comparire con relativa frequenza nella popolazione di controllo.

Concepito: l'insieme dei derivati di un ovulo fertilizzato a qualsiasi stadio di sviluppo, dalla fecondazione fino alla nascita, comprendente le membrane extra-embryonali nonché l'embrione o il feto.

Impianto (annidamento): attecchimento della blastocisti sul rivestimento epiteliale dell'utero, compresi la sua penetrazione attraverso l'epitelio uterino e il suo annidamento nell'endometrio.

Embrione: Lo stadio precoce o di sviluppo di qualsiasi organismo, in particolare il prodotto in via di sviluppo della fecondazione di un uovo, dal momento in cui si individua l'asse longitudinale fino alla comparsa di tutte le strutture principali.

Embriotossicità: insieme di caratteristiche dannose per la struttura anatomica di un embrione, per il suo sviluppo, la crescita e/o la vitalità.

Feto: prodotto del concepimento nel periodo post-embrionale, prima della nascita.

Fetotossicità: insieme di caratteristiche dannose per la struttura anatomica di un feto, per il suo sviluppo, la crescita e/o la vitalità.

Aborto: espulsione prematura dall'utero dei prodotti del concepimento (ossia embrioni o feti non vitali).

Riassorbimento: un concepito che, dopo essersi impiantato nell'utero, muore e viene, o è stato, riassorbito.

Riassorbimento precoce: segni di avvenuto impianto in assenza di embrione o feto riconoscibili.

Riassorbimento tardivo: embrione o feto morto con alterazioni degenerative esterne.

NOAEL: abbreviazione di no-observed-adverse-effect level (livello al quale non si osservano effetti negativi) che indica la dose o il livello di esposizione massimi ai quali non si osservano effetti negativi correlati al trattamento.

1.3 SOSTANZA DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4 PRINCIPIO DEL TEST

Di norma la sostanza di saggio viene somministrata a femmine gravide di animali da laboratorio come minimo dal momento dell'impianto fino al giorno precedente la soppressione programmata, che deve avvenire quanto più in prossimità della normale data del parto, senza tuttavia rischiare di perdere utili dati a causa di un parto prematuro. Il metodo di test non è inteso a esaminare esclusivamente il periodo dell'organogenesi (cioè i giorni 5-15 nei roditori, e i giorni 6-18 nei conigli), bensì anche gli effetti antecedenti all'impianto, se di pertinenza, lungo tutto il periodo di gestazione fino al giorno precedente l'isterotomia con taglio cesareo. Poco prima dell'intervento le femmine vengono sopresse, il contenuto dell'utero viene esaminato e i feti vengono valutati alla ricerca di anomalie visibili esteriormente e di alterazioni dei tessuti molli e dello scheletro.

1.5 DESCRIZIONE DEL METODO DI TEST

1.5.1 Selezione delle specie animali

Si raccomanda di effettuare il test sulle specie più adeguate e di utilizzare le specie e i ceppi da laboratorio solitamente impiegati per i test di tossicità prenatale. La specie di roditori di elezione è il ratto, mentre tra i non roditori si preferirà il coniglio. In caso di utilizzo di un'altra specie è necessario motivarne la scelta.

1.5.2 Condizioni di stabulazione e alimentazione

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (\pm 3°) per i roditori e 18 °C (\pm 3°) per i conigli. Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile.

Le procedure di accoppiamento vanno effettuate in gabbie adeguate allo scopo. Sebbene sia preferibile alloggiare singolarmente gli animali accoppiati, è accettabile anche che vengano alloggiati in piccoli gruppi nella stessa gabbia.

1.5.3 Preparazione degli animali

Si utilizzano animali sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni e non siano stati precedentemente sottoposti ad altre procedure sperimentali. Gli animali sottoposti al test vanno caratterizzati per quanto concerne specie, ceppo, provenienza, sesso, peso e/o età. Gli animali di tutti i gruppi del test devono essere, per quanto praticamente possibile, di età e peso uniformi. Per ciascun

livello di dose vanno usate giovani femmine adulte nullipare. Le femmine vanno fatte accoppiare con maschi della stessa specie e dello stesso ceppo, evitando l'accoppiamento fra consanguinei della stessa generazione. Nei roditori il giorno 0 di gestazione è il giorno in cui si osserva un tappo vaginale e/o la presenza di spermatozoi; nei conigli il giorno 0 è in genere il giorno del coito o dell'inseminazione artificiale, qualora venga utilizzata questa tecnica. Le femmine accoppiate vanno assegnate a random ai gruppi di controllo e di trattamento. Le gabbie vanno sistemate in modo da ridurre al minimo i possibili effetti dovuti alla loro posizione nell'ambiente. A ciascun animale va assegnato un numero identificativo unico. Se le femmine vengono fatte accoppiare in lotti, gli individui di ciascun lotto vanno equamente distribuiti nei vari gruppi. Analogamente, le femmine fecondate dallo stesso maschio vanno equamente distribuite tra i vari gruppi.

1.6 PROCEDURA

1.6.1 Numero e sesso degli animali

Ciascun gruppo trattamento e di controllo deve contenere un numero sufficiente di femmine da fornire all'incirca 20 femmine con siti di impianto all'autopsia. Gruppi con meno di 16 femmine che presentano siti di impianto potrebbero risultare inadeguati. La mortalità delle femmine gravide non invalida necessariamente lo studio, a condizione che non superi il 10 % circa.

1.6.2 Preparazione delle dosi

Qualora per facilitare il dosaggio si impiegasse un veicolo o un altro additivo, occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche: effetti su assorbimento, distribuzione, metabolismo e ritenzione o escrezione della sostanza di saggio; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza di saggio che possono alterarne le caratteristiche tossiche; effetti sul consumo di cibo o di acqua o sulle condizioni nutrizionali degli animali. Il veicolo non deve avere effetti tossici sullo sviluppo, né influire sulla riproduzione.

1.6.3 Dosaggio

Di norma la sostanza di saggio va somministrata quotidianamente dal momento dell'impianto (ad esempio il giorno 5 dopo l'accoppiamento) fino al giorno precedente l'isterotomia. Se studi preliminari, ove disponibili, non indicano un alto potenziale di perdita preimpianto, il trattamento può comprendere l'intero periodo di gestazione, dall'accoppiamento fino al giorno precedente la soppressione. È noto che la manipolazione inadeguata delle femmine gravide o la loro esposizione a stress può provocare la perdita del feto o dell'embrione. Per evitare aborti dovuti a fattori non correlati al trattamento occorre maneggiare le femmine gravide solo se strettamente necessario, proteggendole da stress causati da fattori esterni (ad es. il rumore).

Si somministrano almeno tre diversi livelli di dose e un controllo corrispondente. Gli animali sani vanno assegnati per randomizzazione ai gruppi di controllo e di trattamento. I livelli di dose vanno distanziati in modo che gli effetti tossici siano gradualmente. A meno che la natura fisico-chimica o le proprietà biologiche della sostanza di saggio non impongano limiti in tal senso, il livello della dose più elevata va scelto con l'obiettivo di indurre un determinato grado di tossicità sullo sviluppo dei feti e/o di tossicità materna (segni clinici oppure riduzione del peso corporeo), senza tuttavia provocarne il decesso o arrecare loro gravi sofferenze. Almeno un livello intermedio di dose deve produrre effetti tossici minimi osservabili. Il livello della dose minima non deve produrre segni di tossicità né nella madre, né nel feto. I livelli di dose devono essere selezionati in sequenza decrescente allo scopo di dimostrare la correlazione tra il dosaggio e la risposta e determinare il NOAEL. Per fissare le dosi a livelli decrescenti è utile utilizzare fattori compresi tra due e quattro; spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di trattamento piuttosto che utilizzare intervalli molto distanziati (ad esempio un fattore superiore a 10) fra i dosaggi. Sebbene l'obiettivo sia determinare il NOAEL nelle femmine gravide, sono ritenuti comunque validi anche gli studi che non stabiliscono tale livello (1).

I livelli di dose vanno selezionati tenendo conto di eventuali dati esistenti sulla tossicità, oltre alle informazioni sul metabolismo e sulla tossicocinetica della sostanza di saggio o di sostanze ad essa correlate. Tali dati contribuiscono altresì a dimostrare l'adeguatezza del regime di dosaggio.

Occorre utilizzare al contempo un gruppo di controllo che va sottoposto a trattamento simulato oppure, qualora si utilizzi un veicolo per somministrare la sostanza di saggio, un gruppo che va trattato col solo veicolo. La quantità della sostanza di saggio o del veicolo da somministrare a tutti i gruppi deve essere uguale. Gli animali di controllo devono essere manipolati esattamente come quelli sottoposti al test. La quantità del veicolo da somministrare ai gruppi di controllo deve essere equivalente a quella più elevata utilizzata (come nel gruppo di trattamento con dosaggio più basso).

1.6.4 Test limite

Se, a seguito di somministrazione orale di un unico livello di dose di almeno 1 000 mg/kg peso corporeo/die, usando le procedure descritte nel presente studio, non si osservano effetti tossici nelle femmine gravide o nella loro progenie e qualora, sulla base di dati esistenti (ad esempio relativi a sostanze strutturalmente simili e/o metabolicamente correlate) non si preveda alcun effetto, lo studio completo con tre livelli di dose

può non essere considerato necessario. Il livello probabile di esposizione umana può suggerire la necessità di utilizzare un livello di dose orale più elevata nel test limite. Per altre vie di somministrazione (ad es. inalazione o applicazione cutanea) sono spesso le proprietà fisico-chimiche della sostanza di saggio a indicare e limitare il massimo livello di esposizione raggiungibile (ad es. l'applicazione cutanea non deve provocare grave tossicità locale).

1.6.5 **Somministrazione delle dosi**

La sostanza di saggio o il veicolo vengono normalmente somministrati oralmente per intubazione. Volendo utilizzare un'altra via di somministrazione occorre motivare e argomentare tale scelta; in tal caso potrebbe essere necessario modificare opportunamente il protocollo sperimentale (2)(3)(4). La sostanza di saggio va somministrata ogni giorno all'incirca alla stessa ora.

La dose somministrata ai singoli animali deve normalmente essere basata sulla determinazione più recente del peso corporeo individuale. Occorre tuttavia prestare particolare attenzione nel regolare la dose durante l'ultimo periodo della gravidanza. Nel selezionare le dosi è utile ricorrere a dati disponibili per evitare il rischio di provocare una eccessiva tossicità materna. Comunque, gli animali in cui si dovessero osservare effetti di eccessiva tossicità vanno soppressi con metodi non cruenti. Se diverse femmine gravide mostrano segni di eccessiva tossicità, occorre prendere in considerazione l'opportunità di sopprimere l'intero gruppo corrispondente alla dose in questione. Quando la sostanza viene somministrata mediante sonda, va data di preferenza in un'unica dose mediante sondino gastrico od opportuna cannula da intubazione. Il massimo volume di liquido che può essere somministrato in un'unica volta dipende dalle dimensioni dell'animale. Il volume non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo, tranne nel caso delle soluzioni acquose che possono essere somministrate in quantità pari a 2 ml/100 g di peso corporeo. Se si utilizza olio di semi di mais come veicolo il volume non deve superare 0,4 ml/100 g di peso corporeo. La variabilità dei volumi somministrati va ridotta al minimo regolando le concentrazioni in modo da assicurare un volume costante in tutti i livelli di dose.

1.6.6 **Osservazione delle femmine gravide**

Le osservazioni cliniche vanno eseguite e registrate almeno una volta al giorno e preferibilmente alla stessa ora, tenendo conto della finestra di picco degli effetti previsti dopo la somministrazione. Si registrano le condizioni degli animali, compresi mortalità, agonia, alterazioni pertinenti del comportamento e qualunque segno di evidente tossicità.

1.6.7 **Peso corporeo e consumo di cibo**

Le femmine vanno pesate il giorno 0 della gestazione o comunque entro il giorno 3 della gestazione, nel caso si tratti di animali accoppiati in una data prestabilita forniti da un allevatore esterno, oltre che il primo giorno di somministrazione, almeno ogni 3 giorni durante il periodo di somministrazione e il giorno della soppressione.

Il consumo di cibo va registrato a intervalli di tre giorni, in coincidenza dei giorni in cui si determina il peso corporeo.

1.6.8 **Esame autoptico**

Le femmine vanno sopresse un giorno prima della data prevista del parto. Le femmine che presentano segni di aborto o parto prematuro prima della soppressione programmata vanno sopresse e sottoposte a esame macroscopico completo.

Al momento della soppressione o del decesso durante lo studio le femmine vanno esaminate macroscopicamente alla ricerca di eventuali anomalie strutturali o alterazioni patologiche. Per garantire la completa imparzialità nell'interpretazione dei dati è preferibile che la valutazione delle femmine durante l'isterotomia e le successive analisi dei feti siano effettuate senza conoscere il gruppo di trattamento.

1.6.9 **Esame del contenuto uterino**

Immediatamente dopo la soppressione o appena possibile dopo il decesso occorre asportare l'utero e accertare lo stato di gravidanza degli animali. Gli uteri che non risultino gravidi vanno ulteriormente esaminati (ad esempio con colorazione mediante solfuro di ammonio per i roditori e colorazione di Salewski o un metodo alternativo adeguato per i conigli) per confermare l'assenza di una gravidanza (5).

Si procede a pesatura degli uteri gravidi e del collo cervicale. Il peso degli uteri gravidi non va invece rilevato per gli animali trovati morti durante lo studio.

Nelle femmine gravide occorre determinare il numero di corpi lutei.

Il contenuto uterino va esaminato per determinare il numero di embrioni o feti, sia morti che vitali. Occorre descrivere il grado di riassorbimento allo scopo di stimare il momento relativo della morte del concepito (vedi sezione 1.2).

1.6.10 **Esame dei feti**

È necessario determinare sesso e peso corporeo di ciascun feto.

Ciascun feto va esaminato alla ricerca di alterazioni esteriori (6).

L'esame dei feti deve essere teso a individuare alterazioni scheletriche e dei tessuti molli (ad esempio, variazioni e malformazioni o anomalie) (7)(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14)(15)(16)(17)(18)(19)(20)(21)(22)(23)(24). La classificazione delle alterazioni fetali in categorie è preferibile ma non indispensabile. Quando si effettua tale classificazione occorre specificare con chiarezza i criteri utilizzati per la definizione di ciascuna categoria. Particolare attenzione deve essere dedicata all'apparato riproduttore, che va esaminato alla ricerca di eventuali alterazioni dello sviluppo.

Per quanto concerne i roditori, circa la metà di ciascuna nidiata va preparata ed esaminata alla ricerca di alterazioni scheletriche. I restanti piccoli vanno preparati ed esaminati per l'analisi dei tessuti molli mediante sezionamento seriale secondo metodi adeguati o accettati oppure procedendo con cautela alla dissezione macroscopica dei tessuti.

Per quanto riguarda i non roditori, ad esempio i conigli, tutti i feti vanno sottoposti ad analisi sia dei tessuti molli che dello scheletro. I corpi di questi feti vanno esaminati mediante cauta dissezione alla ricerca di eventuali alterazioni dei tessuti molli, compresa, ove opportuno, la struttura cardiaca interna (25). Di metà dei feti esaminati in questo modo è necessario rimuovere la testa e trattarla per analizzare ulteriormente i tessuti molli (compresi occhi, cervello, cavità nasali e lingua) con metodi di sezionamento seriale standard (26) o un metodo altrettanto sensibile. I corpi di questi feti, nonché i restanti feti intatti, vanno trattati ed esaminati alla ricerca di alterazioni scheletriche, utilizzando gli stessi metodi descritti per i roditori.

2. **DATI**

2.1 **TRATTAMENTO DEI RISULTATI**

I dati vanno riportati individualmente per ciascuna femmina gravida e per la loro prole e riassunti sotto forma di tabella, evidenziando per ciascun gruppo sperimentale il numero di animali all'inizio del test, il numero di animali trovati morti durante il test o soppressi per motivi umanitari, il momento di eventuali decessi o soppressioni, il numero di femmine gravide, il numero di animali che mostrano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, ivi compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità di eventuali effetti tossici, i tipi di osservazioni embrio/fetali, nonché tutti i dati di rilievo riguardanti le figliate.

È necessario valutare i risultati numerici mediante un metodo statistico adeguato, usando la nidiata come unità di base per l'analisi dei dati. Occorre utilizzare un metodo statistico generalmente accettato; i metodi statistici vanno selezionati come parte del disegno sperimentale e devono essere giustificati. Occorre riportare anche i dati sugli animali che non sono sopravvissuti fino alla soppressione programmata, che peraltro possono essere inclusi nel calcolo delle medie del gruppo, se pertinenti. La pertinenza dei dati ottenuti da tali animali, e pertanto l'inclusione o l'esclusione dal calcolo delle medie del gruppo, va motivata e giudicata singolarmente.

2.2 **VALUTAZIONE DEI RISULTATI**

I risultati dello studio di tossicità sullo sviluppo prenatale vanno valutati in base agli effetti osservati. La valutazione deve includere le seguenti informazioni:

- risultati dei test sulle femmine gravide e sui feti/embrioni, ivi compresa la valutazione del rapporto, o la sua assenza, fra l'esposizione degli animali alla sostanza di saggio e l'incidenza e la gravità di tutti gli effetti;

- criteri applicati per l'eventuale suddivisione in categorie delle alterazioni fetali esteriori, a carico dei tessuti molli e dello scheletro;
- se pertinenti, dati storici di controllo per una migliore interpretazione dei risultati dello studio;
- numeri utilizzati per il calcolo delle percentuali o degli indici;
- adeguata analisi statistica dei reperti dello studio, se di pertinenza; dati sul metodo di analisi per consentire ad un revisore/esperto di statistica indipendente di rivalutare e ricostruire l'analisi.

In assenza di effetti tossici a conclusione di uno studio occorre prendere in considerazione l'opportunità di eseguire ulteriori indagini per determinare l'assorbimento e la biodisponibilità della sostanza di saggio.

2.3 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Uno studio della tossicità sullo sviluppo prenatale deve fornire informazioni sugli effetti dell'esposizione ripetuta ad una sostanza durante la gravidanza, sulle femmine gravide e sullo sviluppo intrauterino della prole. I risultati dello studio vanno interpretati insieme ai dati derivanti da studi subcronici, sulla riproduzione, di tossicocinetica e altri studi disponibili. Poiché l'enfasi viene posta sia sulla tossicità generale, in termini di tossicità materna, che sugli endpoint di tossicità sullo sviluppo, i risultati dello studio consentiranno in parte di discriminare fra gli effetti sullo sviluppo che si verificano in assenza di tossicità generale e quelli che sono indotti solo a livelli che risultano tossici anche per le madri (27).

3. RELAZIONE

3.1 RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione deve contenere le seguenti informazioni specifiche:

Sostanza di saggio:

- natura fisica e, ove pertinenti, proprietà fisico-chimiche;
- identificazione, compreso numero CAS se noto/stabilito;
- purezza.

Veicolo (se pertinente):

- giustificazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali:

- specie e ceppo;
- numero ed età degli animali;
- origine, condizioni di stabulazione, dieta, ecc.;
- peso individuale degli animali all'inizio del test.

Condizioni del test:

- motivazione per la selezione del livello delle dosi;
- dettagli sulla formulazione/preparazione della sostanza di saggio somministrata nella dieta, concentrazioni ottenute, stabilità e omogeneità della preparazione;
- dettagli sulla somministrazione della sostanza di saggio;

- conversione dalla concentrazione della sostanza di saggio in dieta/acqua potabile (ppm) alla dose vera e propria (mg/kg peso corporeo/die), se pertinente;
- condizioni ambientali;
- dettagli circa la qualità di cibo e acqua.

Risultati:

Dati sulla tossicità materna in funzione della dose (elenco non esaustivo):

- numero di animali all'inizio del test, numero di animali sopravvissuti, numero di gravide e numero di femmine che hanno abortito, numero di femmine che hanno partorito precocemente;
- giorno del decesso durante lo studio o indicazione del fatto che gli animali sono sopravvissuti fino alla soppressione programmata;
- i dati sugli animali non sopravvissuti fino alla soppressione programmata vanno riportati ma non inclusi nelle analisi statistiche di confronto fra i gruppi;
- giorno di osservazione di ciascun segno clinico anomalo e suo successivo decorso;
- peso corporeo, modifica del peso corporeo e peso dell'utero gravido, compresa, facoltativamente, modifica del peso corporeo corretta in base al peso dell'utero gravido;
- consumo di cibo ed eventualmente di acqua;
- reperti autoptici, compreso il peso dell'utero;
- valori di NOAEL in riferimento agli effetti sulle genitrici e sullo sviluppo.

Endpoint relativi allo sviluppo per ciascuna dose e nidata (con impianti) ed inoltre:

- numero di corpi lutei;
- numero di impianti, numero e percentuale di feti vivi e morti e di riassorbimenti;
- numero e percentuale di perdite pre- e post-impianto.

Endpoint relativi allo sviluppo per ciascuna dose e figliata (con feti vivi) ed inoltre:

- numero e percentuale di piccoli vivi;
- rapporto fra i sessi;
- peso corporeo fetale, preferibilmente per sesso e con i sessi combinati;
- malformazioni esteriori, dei tessuti molli e scheletriche e altre alterazioni di rilievo;
- criteri per la suddivisione in categorie, se pertinenti;
- numero totale e percentuale di feti e nidiate con eventuali alterazioni esteriori, dei tessuti molli o scheletriche, oltre ai tipi e all'incidenza delle singole anomalie e di altre alterazioni rilevanti.

Discussione dei risultati.

Conclusioni.

4.

BIBLIOGRAFIA

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

- (22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.
 - (23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
 - (24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.
 - (25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.
 - (26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.
 - (27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.
 - (28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249-292.»
-

ALLEGATO 2G

«B.35. STUDIO DI TOSSICITÀ RIPRODUTTIVA A DUE GENERAZIONI

1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 416 (2001) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Questo metodo di test della capacità riproduttiva a due generazioni è in grado di fornire dati generici riguardanti gli effetti di una sostanza sull'integrità e le prestazioni degli apparati riproduttori maschile e femminile, compresi funzione delle gonadi, ciclo estrale, comportamento nell'accoppiamento, concepimento, gestazione, parto, allattamento e svezzamento, nonché crescita e sviluppo della prole. Lo studio può inoltre fornire informazioni sugli effetti della sostanza circa la morbilità e la mortalità neonatale, nonché dati preliminari sulla tossicità a carico dello sviluppo prenatale e postnatale, e servire da guida per test successivi. Oltre a studiare la crescita e lo sviluppo della generazione F1, questo metodo di test è inteso a valutare l'integrità e le prestazioni degli apparati riproduttori maschile e femminile, nonché la crescita e lo sviluppo della generazione F2. Per ottenere ulteriori dati inerenti alla tossicità sullo sviluppo e ai deficit funzionali è possibile incorporare nel presente protocollo parti di altri studi attingendo eventualmente ai metodi per la tossicità e/o la neurotossicità in fase evolutiva; alternativamente gli stessi endpoint possono essere esaminati in studi separati, mediante adeguati metodi di test.

1.2 PRINCIPIO DEL TEST

La sostanza di saggio viene somministrata in dosi graduate a diversi gruppi di maschi e femmine. Ai maschi della generazione P la sostanza va somministrata durante la crescita e per almeno un ciclo completo di spermatogenesi (all'incirca 56 giorni nel topo e 70 giorni nel ratto) con l'obiettivo di provocare eventuali effetti avversi sulla spermatogenesi. Gli effetti sugli spermatozoi si rilevano in base a svariati parametri (tra cui la morfologia e la motilità degli spermatozoi) nonché mediante preparazione tissutale e dettagliato esame istopatologico. Nel caso siano disponibili dati sulla spermatogenesi provenienti da un precedente studio a dosi ripetute di durata sufficiente, come ad esempio uno studio di 90 giorni, non occorre includere nella valutazione i maschi della generazione P. Si raccomanda tuttavia di conservare campioni o registrazioni digitali degli spermatozoi della generazione P, per consentirne la valutazione in un momento successivo. Alle femmine della generazione P la sostanza va somministrata durante la crescita e per diversi cicli estrali completi con l'obiettivo di provocare eventuali effetti avversi sulla normalità del ciclo estrale. La sostanza di saggio viene somministrata agli animali della generazione parentale (P) durante l'accoppiamento, durante la gravidanza e per tutto lo svezzamento della loro prole della generazione F1. Allo svezzamento, si prosegue saggio la somministrazione della sostanza da saggiare alla prole della generazione F1 durante la crescita e successivamente l'età adulta, l'accoppiamento e la produzione di una generazione F2, continuando fino allo svezzamento della generazione F2.

Tutti gli animali vanno sottoposti a osservazioni cliniche e valutazione anatomico-patologica per individuare eventuali segni di tossicità, in particolare gli effetti sull'integrità e le prestazioni degli apparati riproduttori maschile e femminile e sulla crescita e sullo sviluppo della prole.

1.3 DESCRIZIONE DEL METODO**1.3.1 Selezione delle specie animali**

La specie d'elezione per l'esecuzione del test è il ratto. In caso di utilizzo di altre specie, occorre giustificare tale scelta e apportare adeguate modifiche al protocollo. Non vanno usati ceppi a bassa fecondità o con nota elevata incidenza di difetti dello sviluppo. All'inizio dello studio la variazione ponderale degli animali utilizzati deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio di ciascun sesso.

1.3.2 Condizioni di stabulazione e alimentazione

La temperatura nella stanza degli animali sperimentali deve essere di 22 °C (\pm 3°). Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle

pulizie della stanza, è bene puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 di buio. Per quanto concerne l'alimentazione si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata di acqua potabile. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di assicurare un'adeguata miscelazione della sostanza di saggio, quando somministrata con il presente metodo.

Gli animali possono essere alloggiati individualmente o in piccoli gruppi dello stesso sesso. Le procedure di accoppiamento vanno effettuate in gabbie adeguate per tale scopo. Dopo comprovata copulazione, le femmine accoppiate vanno isolate in gabbie da parto o maternità. Anche i ratti accoppiati possono essere tenuti in piccoli gruppi, ma vanno separati uno o due giorni prima del parto. Quando si avvicina il momento del parto occorre fornire agli animali materiali specifici adeguati per la costruzione del nido.

1.3.3 Preparazione degli animali

Devono essere utilizzati animali giovani sani, che siano stati acclimatati alle condizioni di laboratorio per almeno 5 giorni e non siano stati precedentemente sottoposti ad altre procedure sperimentali. Gli animali del test vanno caratterizzati per quanto concerne specie, ceppo, provenienza, sesso, peso e/o età. È necessario conoscere eventuali relazioni di consanguineità in modo da evitare l'accoppiamento tra individui fratelli. Gli animali vanno assegnati a random ai gruppi di controllo e di trattamento (si raccomanda la stratificazione per peso corporeo). Le gabbie vanno sistemate in modo da ridurre al minimo i possibili effetti dovuti alla loro posizione. A ciascun animale va assegnato un numero identificativo unico. Per la generazione P l'assegnazione del numero identificativo deve avvenire prima dell'inizio della somministrazione delle dosi. Per la generazione F1 l'assegnazione va fatta allo svezzamento degli animali selezionati per l'accoppiamento. È necessario conservare la registrazione indicante la nidiata di origine per tutti gli animali F1 selezionati. Inoltre, si raccomanda l'identificazione individuale dei piccoli non appena possibile dopo la nascita nel caso si preveda la pesatura individuale degli stessi o l'esecuzione di eventuali test funzionali.

All'inizio della somministrazione delle dosi gli animali della generazione parentale (P) devono avere 5-9 settimane di età. Gli animali di tutti i gruppi sperimentali devono essere, per quanto praticamente possibile, di età e peso uniformi.

1.4 PROCEDURA

1.4.1 Numero e sesso degli animali

Ciascun gruppo di trattamento e di controllo deve comprendere un numero sufficiente di animali da fornire idealmente non meno di 20 femmine gravide al parto o prossime al termine. Ciò può risultare impossibile in caso di somministrazione di sostanze che causano effetti indesiderati correlati al trattamento (ad esempio sterilità o eccessiva tossicità a dose elevata). L'obiettivo è di produrre un numero di gravidanze tale da assicurare un'analisi significativa del potenziale della sostanza in termini di effetti sulla fertilità, la gravidanza e il comportamento materno, oltre che la suzione, la crescita e lo sviluppo della prole F1, dal concepimento e fino alla maturità, per proseguire poi con gli effetti sullo sviluppo della prole della successiva generazione (F2) fino allo svezzamento. Comunque, il mancato ottenimento del numero desiderato di femmine gravide (\neq 20) non invalida necessariamente lo studio e va valutato caso per caso.

1.4.2 Preparazione delle dosi

Si raccomanda di somministrare la sostanza di prova per via orale (assieme alla dieta o all'acqua potabile o mediante sonda gastrica), a meno che non si consideri più adeguata un'altra via di somministrazione (ad esempio cutanea o per inalazione).

Se necessario la sostanza di prova va disciolta o sospesa in un veicolo adeguato. Si raccomanda di prendere anzitutto in considerazione, ogni qualvolta possibile, l'uso di una soluzione/sospensione acquosa, e in seconda battuta quello di una soluzione/emulsione in olio (ad esempio olio di semi di mais) e infine la possibile soluzione in altri veicoli. Dei veicoli diversi dall'acqua devono essere note le caratteristiche tossiche. È necessario determinare la stabilità della sostanza di prova nel veicolo.

1.4.3 Dosaggio

Si utilizzano almeno tre livelli di dose e un controllo corrispondente. A meno che la natura fisico-chimica o gli effetti biologici della sostanza di prova non impongano limiti in tal senso, il livello della dose più elevata va scelto con l'obiettivo di indurre tossicità ma non provocare il decesso o gravi sofferenze. Di norma gli studi con un tasso di mortalità imprevista inferiore a circa il 10 % degli animali parentali (P) sono comunque accettabili. Per dimostrare eventuali effetti correlati al dosaggio e individuare il livello al quale non si osservano effetti avversi (NOAEL) occorre selezionare una sequenza decrescente di livelli di dose. In genere, per determinare i livelli decrescenti delle dosi risultano ottimali fattori compresi tra due e quattro e spesso è preferibile aggiungere un quarto gruppo di prova piuttosto che utilizzare intervalli molto ampi (ad esempio un fattore superiore a 10) fra i dosaggi. Per gli studi con somministrazione nella dieta, l'intervallo fra le dosi non deve superare un fattore di 3. I livelli delle dosi vanno selezionati tenendo conto di

eventuali dati sulla tossicità già disponibili, e in particolar modo dei risultati di studi con dosi ripetute. Occorre inoltre tenere conto di eventuali informazioni già disponibili sul metabolismo e la cinetica della sostanza di prova o di sostanze correlate. Questi dati contribuiranno altresì a dimostrare l'adeguatezza del regime di dosaggio.

Il gruppo di controllo deve essere non trattato o trattato solo con il veicolo nel caso si utilizzi un veicolo per somministrare la sostanza di saggio. Tranne per la somministrazione della sostanza di saggio, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in maniera identica ai soggetti del gruppo di trattamento. Se si utilizza un veicolo, il gruppo di controllo riceverà il veicolo al volume più elevato in uso nel test. Se una sostanza di prova viene somministrata mediante la dieta e causa una riduzione dell'apporto o dell'utilizzo degli alimenti, può diventare necessario l'impiego di un gruppo di controllo pair-fed. In alternativa è possibile usare i dati da studi controllati disegnati per valutare gli effetti della diminuzione del consumo di cibo sui parametri della riproduzione al posto di un gruppo di controllo pair-fed concomitante.

Occorre tenere conto delle seguenti caratteristiche del veicolo e di altri additivi: effetti sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza di prova; effetti sulle proprietà chimiche della sostanza di prova che potrebbero alterarne le caratteristiche tossiche; infine, effetti sul consumo di cibo o di acqua o sulle condizioni nutrizionali degli animali.

1.4.4 **Test limite**

Se uno studio orale a un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg per peso corporeo/die o, per somministrazione tramite l'alimentazione o l'acqua potabile, a una percentuale equivalente nella dieta o nell'acqua potabile secondo le procedure descritte per questo studio non produce effetti tossici osservabili, sia negli animali parentali sia nella prole e se, sulla base di dati relativi a sostanze strutturalmente e/o metabolicamente correlate, non ci si attende tossicità, allora può non essere considerato necessario uno studio completo con livelli di dosi differenti. Si applica il test limite, tranne quando l'esposizione umana indica la necessità di utilizzare un livello di dose orale più elevato. Per altri tipi di somministrazione, quali l'inalazione o l'applicazione cutanea, sono spesso le proprietà fisico-chimiche della sostanza di saggio, come la solubilità, a indicare e limitare il livello massimo di esposizione raggiungibile.

1.4.5 **Somministrazione delle dosi**

Occorre somministrare la sostanza di prova agli animali per 7 giorni alla settimana, di preferenza per via orale (dieta, acqua potabile o sonda gastrica). In caso di utilizzo di un'altra via di somministrazione, occorre giustificare tale scelta ed eventualmente apportare modifiche adeguate al test. Tutti gli animali saranno trattati per la stessa via di somministrazione nel corso di un periodo sperimentale adeguato. Se la sostanza di saggio viene somministrata mediante sonda, deve trattarsi di una sonda gastrica. Il volume di liquidi somministrati in una volta non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo (0,4 ml/100 g di peso corporeo è il massimo per l'olio di semi di mais), tranne che nel caso di soluzioni acquose in cui è consentito usare 2 ml/100 g. Ad eccezione delle sostanze irritanti o corrosive, che generalmente manifestano effetti esacerbati a concentrazioni più elevate, occorre ridurre al minimo la variabilità del volume di prova, regolando la concentrazione, in modo da assicurare un volume costante a tutti i livelli di dose. Negli studi con sonda gastrica normalmente i piccoli ricevono la sostanza solo indirettamente, attraverso il latte, finché non comincia il dosaggio diretto al momento dello svezzamento. Negli studi che prevedono la somministrazione nella dieta o nell'acqua potabile in genere i piccoli ricevono la sostanza di saggio anche direttamente quando cominciano ad alimentarsi da soli durante l'ultima settimana del periodo di allattamento.

Per quanto concerne le sostanze somministrate tramite il cibo o l'acqua potabile, è importante fare in modo che le quantità di sostanza di saggio impiegate non interferiscano con la normale alimentazione o il normale bilancio idrico. Se la sostanza di saggio viene somministrata con la dieta, è possibile usare una concentrazione alimentare costante (ppm) o un livello costante di dosi rispetto al peso corporeo degli animali; occorre specificare l'opzione utilizzata. Nel caso di sostanze somministrate mediante sonda gastrica, la dose va somministrata ogni giorno all'incirca negli stessi orari e regolata almeno settimanalmente per mantenere un livello costante delle dosi rispetto al peso corporeo degli animali. Nel regolare le dosi per la sonda gastrica in base al peso occorre tenere conto dei dati sulla distribuzione nella placenta.

1.4.6 **Programma sperimentale**

La somministrazione giornaliera delle dosi ai maschi e alle femmine della generazione parentale (P) deve iniziare a 5-9 settimane di età. La somministrazione giornaliera ai maschi e alle femmine F1 deve iniziare allo svezzamento; occorre ricordare che, in caso di somministrazione della sostanza di saggio tramite la dieta o l'acqua potabile, l'esposizione diretta dei piccoli F1 alla sostanza di saggio può avvenire già durante il periodo dell'allattamento. Per entrambi i sessi di entrambe le generazioni (P e F1) la somministrazione proseguirà per almeno 10 settimane prima del periodo di accoppiamento e andrà continuata, in entrambi i sessi, durante le 2 settimane del periodo di accoppiamento. I maschi vanno sacrificati con metodi non cruenti ed esaminati quando non sono più necessari per la valutazione degli effetti sulla riproduzione. Per quanto riguarda le femmine parentali (P), il dosaggio va continuato per tutta la gravidanza e fino allo svezzamento della prole F1. Occorre eventualmente modificare il programma di somministrazione sulla base

delle informazioni disponibili circa la sostanza di saggio, compresi dati già esistenti di tossicità, induzione del metabolismo o bioaccumulo. Di norma la dose somministrata a ciascun animale deve essere basata sulla più recente determinazione individuale del peso corporeo. Occorre tuttavia usare cautela nel regolare la dose durante l'ultimo periodo della gravidanza.

Il trattamento di maschi e femmine delle generazioni P e F1 va proseguito fino alla soppressione. Tutti i maschi e le femmine adulti P e F1 vanno sacrificati con metodi non cruenti quando non sono più necessari per la valutazione degli effetti sulla riproduzione. La prole F1 non selezionata per l'accoppiamento e tutta la prole F2 vanno sacrificate con metodi non cruenti dopo lo svezzamento.

1.4.7 **Procedura di accoppiamento**

1.4.7.1 *Accoppiamento parentale (P)*

Per ogni accoppiamento, ciascuna femmina viene posta insieme a un unico maschio dello stesso livello di dose (accoppiamento 1:1) finché non avviene la copulazione o finché non sono trascorse 2 settimane. Occorre esaminare ogni giorno le femmine alla ricerca di spermatozoi o tappi vaginali. Il giorno 0 della gravidanza è definito come il giorno in cui si rileva la presenza di un tappo vaginale o di spermatozoi. Nel caso l'accoppiamento non abbia successo, si può valutare la possibilità di far accoppiare le femmine con maschi di comprovata capacità riproduttiva dello stesso gruppo. Le coppie in cui è avvenuta la copulazione vanno identificate chiaramente in sede di registrazione dei dati. Occorre evitare l'accoppiamento fra consanguinei.

1.4.7.2 *Accoppiamento della generazione F1*

Per l'accoppiamento della prole F1 occorre selezionare, allo svezzamento, almeno un maschio e una femmina da ciascuna nidiata per farli accoppiare con altri piccoli dello stesso livello di dose, ma di una nidiata diversa, allo scopo di produrre la generazione F2. Se non si osservano differenze significative nel peso corporeo o nell'aspetto dei potenziali partner, la selezione dei piccoli da ciascuna nidiata va effettuata a random. Nel caso in cui si osservino differenze, vanno selezionati i migliori rappresentanti di ciascuna nidiata. Di prassi, il modo migliore per farlo è basarsi sul peso corporeo, sebbene l'aspetto possa risultare un parametro più adeguato. La prole F1 non va fatta accoppiare prima del raggiungimento della piena maturità sessuale.

Le coppie senza progenie vanno analizzate per determinare la causa apparente dell'infertilità. In tal caso può rendersi necessario ricorrere a determinate procedure, tra cui la ripetizione dell'accoppiamento con altri maschi o femmine di comprovata capacità riproduttiva, l'esame microscopico degli organi riproduttori e l'esame dei cicli estrali o della spermatogenesi.

1.4.7.3 *Secondo accoppiamento*

Qualora si riscontri una deviazione dalla norma nel numero di esemplari di una nidiata correlabile al trattamento o qualora si osservino effetti inusitati nel corso del primo accoppiamento, si raccomanda di far accoppiare una seconda volta gli adulti delle generazioni P o F1 per produrre una seconda nidiata. Per le femmine o i maschi che non hanno prodotto piccoli è consigliabile il riaccoppiamento con riproduttori comprovati del sesso opposto. Se si ritiene necessaria la produzione di una seconda nidiata da parte di una delle generazioni, gli animali vanno fatti riaccoppiare all'incirca una settimana dopo lo svezzamento della nidiata precedente.

1.4.7.4 *Dimensioni della nidiata*

Occorre permettere agli animali di figliare normalmente e di allevare la prole fino allo svezzamento. La standardizzazione del numero di individui delle nidiate è facoltativa. Nel caso venga eseguita, occorre descrivere in modo particolareggiato il metodo utilizzato.

1.5 OSSERVAZIONI

1.5.1 **Osservazioni cliniche**

Occorre eseguire ogni giorno osservazioni cliniche generali e, nel caso di somministrazione mediante sonda gastrica, tale esame va programmato tenendo conto del previsto periodo di picco degli effetti dopo la somministrazione. Sono da registrare i cambiamenti del comportamento, i segni di parto difficoltoso o prolungato e tutti i segni di tossicità. È necessario eseguire un ulteriore esame più dettagliato su ciascun animale a intervalli almeno settimanali, ad esempio da svolgersi in occasione di una pesatura dell'animale. Due volte al giorno, o eventualmente una volta al giorno durante il fine settimana, occorre valutare tutti gli animali in relazione alla morbilità e alla mortalità.

1.5.2 **Peso corporeo e consumo di cibo/acqua degli animali parentali**

Gli animali delle generazioni parentali (P e F1) vanno pesati il primo giorno della somministrazione e, successivamente, a cadenza almeno settimanale. Le femmine parentali (P e F1) vanno pesate almeno nei giorni 0, 7, 14 e 20 o 21 di gestazione, nonché durante l'allattamento negli stessi giorni di pesatura dei cuccioli e nel giorno della soppressione degli animali. Queste osservazioni vanno riportate singolarmente per ciascun animale adulto. Durante il periodo precedente all'accoppiamento e quello di gestazione il consumo di cibo va registrato con cadenza almeno settimanale. Se la sostanza di saggio viene somministrata nell'acqua, il consumo di acqua va registrato con cadenza almeno settimanale.

1.5.3 **Ciclo estrale**

La lunghezza e la normalità del ciclo estrale vanno valutate nelle femmine P e F1 mediante striscio vaginale prima dell'accoppiamento, nonché facoltativamente durante l'accoppiamento, finché l'accoppiamento non risulti avvenuto. Durante il prelievo delle cellule vaginali/cervicali occorre prestare attenzione a non arrecare disturbo alla mucosa per evitare un'eventuale induzione di pseudogvidanza (1).

1.5.4 **Parametri relativi agli spermatozoi**

Al momento della soppressione occorre registrare il peso di testicoli ed epididimi di tutti i maschi P e F1, riservando un esemplare di ciascun organo per l'esame istopatologico (vedi sezioni 1.5.7 e 1.5.8.1). In una subserie di almeno dieci maschi di ciascun gruppo di maschi delle generazioni P e F1, i testicoli e gli epididimi restanti sono da utilizzare rispettivamente per la conta degli spermatidi resistenti all'omogeneizzazione e delle riserve di spermatozoi nella coda dell'epididimo. Per la stessa subserie di maschi occorre raccogliere gli spermatozoi dalla coda dell'epididimo o dal vaso deferente allo scopo di valutarne la motilità e la morfologia. Se si osservano effetti correlati al trattamento o se da altri studi emergono prove di possibili effetti sulla spermatogenesi, la valutazione degli spermatozoi va eseguita su tutti i maschi di ciascun gruppo; diversamente, è possibile limitare la conta ai maschi P e F1 di controllo e del gruppo di trattamento alla dose più elevata.

È necessario contare il numero totale degli spermatidi testicolari resistenti all'omogeneizzazione e degli spermatozoi della coda dell'epididimo (2)(3). Le riserve caudali di spermatozoi possono essere calcolate in base alla concentrazione e al volume degli spermatozoi nella sospensione usata per eseguire le valutazioni qualitative e in base al numero di spermatozoi rinvenuti mediante successiva triturazione e/o omogeneizzazione del restante tessuto caudale. La conta va eseguita sulla subserie selezionata di maschi di tutti i gruppi di dosaggio immediatamente dopo la soppressione degli animali, a meno che non si eseguano registrazioni video o digitali o salvo in caso di congelamento degli esemplari per esame successivo. In questi casi è possibile analizzare anzitutto i controlli e il gruppo alla dose più elevata. Se non si rilevano effetti correlati al trattamento (ad es. effetti sulla conta, sulla motilità o sulla morfologia degli spermatozoi) non occorre procedere all'analisi degli altri gruppi. Se nel gruppo che ha ricevuto la dose più elevata si osservano effetti correlati al trattamento, è necessario analizzare anche i gruppi delle dosi inferiori.

La motilità degli spermatozoi dell'epididimo (o del vaso deferente) va valutata o videoregistrata immediatamente dopo aver sacrificato gli animali. Occorre recuperare gli spermatozoi riducendo al minimo il danno e diluirli, per l'analisi della motilità, usando metodi accettabili (4). La percentuale di spermatozoi progressivamente mobili va determinata soggettivamente od oggettivamente. Se si esegue l'analisi computerizzata del movimento (5)(6)(7)(8)(9)(10) il calcolo della mobilità progressiva si basa su soglie definite dall'utente per la velocità media sul percorso e l'avanzamento in linea retta o indice lineare. Se si esegue una videoregistrazione dei campioni (11) o le immagini vengono registrate in altro modo al momento dell'autopsia, è sufficiente procedere solo all'analisi dei maschi P e F1 di controllo e della dose più elevata, a meno che non si osservino effetti correlati al trattamento; in tal caso vanno esaminati anche i gruppi delle dosi inferiori. In assenza di immagini video o digitali, vanno analizzati mediante autopsia tutti i campioni di tutti i gruppi di trattamento.

È necessario eseguire una valutazione morfologica di un campione di spermatozoi dell'epididimo (o del vaso deferente). Gli spermatozoi (ad esempio 200) vanno esaminati come preparazioni fisse e umide (12) e classificati come normali o anomali. Esempi di anomalie morfologiche degli spermatozoi sono fusione, teste isolate e malformazioni di testa e/o coda. La valutazione va eseguita sulla subserie selezionata dei maschi di ciascun gruppo di dose subito dopo la soppressione degli animali o, in caso di registrazioni video o digitali, in un secondo momento. Gli strisci, una volta fissati, possono anch'essi essere letti in un

momento successivo. In questi casi è possibile analizzare anzitutto i controlli e il gruppo della dose più elevata. Se non si rilevano effetti correlati al trattamento (ad esempio effetti sulla morfologia degli spermatozoi) non occorre procedere all'analisi degli altri gruppi. Se nel gruppo della dose più elevata si osservano effetti correlati al trattamento, è necessario analizzare anche i gruppi delle dosi inferiori.

Qualora uno o più parametri di valutazione degli spermatozoi di cui sopra siano già stati esaminati nell'ambito di uno studio sulla tossicità sistemica della durata di almeno 90 giorni, non occorre ripeterli nello studio su due generazioni. Si raccomanda, tuttavia, di conservare campioni o registrazioni digitali degli spermatozoi della generazione P per consentire un'eventuale valutazione successiva.

1.5.5 **Prole**

Ciascuna nidiata va esaminata non appena possibile dopo il parto (giorno di allattamento 0) per stabilire il numero e il sesso dei piccoli, distinguere gli individui nati morti da quelli nati vivi e individuare eventuali anomalie macroscopiche. I piccoli trovati morti il giorno 0 dovrebbero, se non sono in stato di decomposizione, essere esaminati alla ricerca di possibili difetti e della causa del decesso e preparati per la conservazione. I piccoli vivi dovrebbero essere contati e pesati individualmente alla nascita (giorno di allattamento 0) o il giorno 1, e successivamente ad intervalli regolari, ad esempio nei giorni 4, 7, 14 e 21 dell'allattamento. È importante registrare eventuali anomalie fisiche o comportamentali osservate nelle madri o nella prole.

Lo sviluppo fisico della prole va registrato soprattutto in termini di aumento del peso corporeo. Altri parametri fisici (ad esempio l'apertura di orecchie e occhi, l'eruzione dei denti, la crescita del pelo) possono fornire informazioni supplementari, ma è preferibile valutare questo tipo di dati alla luce di quelli sulla maturazione sessuale (ad esempio età e peso corporeo all'apertura vaginale o alla separazione balano-prepuziale) (13). Si raccomanda di eseguire indagini sulla funzionalità in generale (ad esempio attività motoria, funzioni sensoriali, ontogenesi dei riflessi) della prole F1 prima e/o dopo lo svezzamento, in particolare per le funzioni correlate alla maturazione sessuale, se tali indagini non sono comprese in studi separati. Degli animali F1 svezzati e selezionati per l'accoppiamento occorre determinare l'età al momento dell'apertura vaginale e della separazione prepuziale. La distanza anogenitale va misurata al giorno 0 dalla nascita nei piccoli F2, se ciò risulta indicato per la presenza di alterazioni nel rapporto tra i due sessi o nei tempi di maturazione sessuale della generazione F1.

Le osservazioni sulla funzionalità possono essere omesse nei gruppi che rivelano altri chiari segni di effetti negativi (ad esempio un rallentamento significativo dell'aumento ponderale, ecc.). Se effettuate, le indagini sulla funzionalità non devono riguardare i piccoli selezionati per l'accoppiamento.

1.5.6 **Esame autoptico macroscopico**

Al momento della soppressione o dell'eventuale decesso di esemplari nel corso dello studio è necessario eseguire un esame autoptico macroscopico per determinare eventuali anomalie strutturali o alterazioni patologiche su tutti gli animali parentali (P e F1), tutti i piccoli con anomalie visibili o segni clinici, oltre che su un piccolo di ciascun sesso di ogni nidiata selezionato a random, sia della generazione F1 che della F2. Occorre prestare particolare attenzione agli organi dell'apparato riproduttore. I piccoli moribondi che vengono sacrificati con modalità non cruenta e i piccoli deceduti, quando non in stato di decomposizione, vanno esaminati alla ricerca di possibili difetti e/o della causa del decesso e successivamente conservati.

Occorre esaminare l'utero di tutte le femmine primipare, evitando di compromettere l'esame istopatologico, per determinare la presenza e il numero dei siti di impianto.

1.5.7 **Peso degli organi**

Al momento della soppressione occorre determinare il peso corporeo e il peso dei seguenti organi di tutti gli animali delle generazioni parentali P e F1 (gli organi pari vanno pesati individualmente):

- utero, ovaie;
- testicoli, epididimi (totali e coda);
- prostata;

- vescicole seminali con ghiandole della coagulazione e i relativi liquidi oltre che la prostata (come un'unica unità);
- cervello, fegato, reni, milza, ghiandole pituitaria, tiroide e surrenali e organi bersaglio noti.

Al momento della soppressione dei piccoli F1 e F2 selezionati per l'esame autoptico si procede alla determinazione del peso corporeo raggiunto alla fine dell'esperimento (vedi sezione 1.5.6). Di ciascun piccolo, di entrambe i sessi da ciascuna nidiata selezionato a random, alla pesatura dei seguenti organi: cervello, milza e timo.

I risultati dell'autopsia macroscopica e della pesatura degli organi vanno valutati, quando possibile, in rapporto alle osservazioni fatte in altri studi con dose ripetuta.

1.5.8 Istopatologia

1.5.8.1 *Animali parentali*

I seguenti organi e tessuti degli animali delle generazioni parentali (P e F1), o loro campioni rappresentativi, devono essere fissati e conservati in un mezzo adeguato per l'esame istopatologico:

- vagina, utero con cervice e ovaie (conservati in un fissativo appropriato);
- un testicolo (conservato in soluzione di Bouin o in un fissativo analogo), un epididimo, vescicole seminali, prostata e ghiandola della coagulazione;
- organi bersaglio precedentemente identificati di tutti gli animali P e F1 selezionati per l'accoppiamento.

L'esame istopatologico completo degli organi e dei tessuti conservati sopra elencati va eseguito su tutti gli animali P e F1 della dose elevata e di controllo selezionati per l'accoppiamento. L'esame delle ovaie degli animali P è facoltativo. Gli organi che evidenziano alterazioni correlate al trattamento vanno esaminati anche nei gruppi alla dose bassa ed intermedia, allo scopo di contribuire alla determinazione del NOAEL. Inoltre, vanno sottoposti ad esame istopatologico gli organi della riproduzione degli animali dei gruppi di trattamento alla dose bassa ed intermedia nei quali si sospetta una riduzione della fertilità (ad esempio gli esemplari che non si sono accoppiati, che non hanno concepito, che non hanno generato o che non hanno partorito prole sana, o nei quali si sono osservati effetti sul ciclo estrale o sul numero, sulla motilità o sulla morfologia degli spermatozoi). Devono essere esaminate tutte le lesioni macroscopiche, quali atrofie e tumori.

L'esame istopatologico dettagliato dei testicoli (trattati ad esempio mediante fissativo di Bouin, inclusi in paraffina e preparati in sezioni trasversali di 4-5 µm di spessore) va effettuato allo scopo di identificare eventuali effetti correlati al trattamento, quali ritenzione di spermatidi, mancanza di strati o tipi di cellule germinali, formazione di cellule giganti polinucleate o spostamento delle cellule spermatogeniche nel lume (14). L'esame degli epididimi intatti deve comprendere testa, corpo e coda e può essere eseguito mediante valutazione di una sezione longitudinale. Occorre valutare la presenza di infiltrazioni leucocitarie, alterazioni della prevalenza dei tipi cellulari, tipi cellulari aberranti e fagocitosi degli spermatozoi nell'epididimo. Per l'esame degli organi della riproduzione maschili può essere impiegata la colorazione con PAS ed ematossilina.

Dopo l'allattamento l'ovaio deve contenere follicoli primordiali e in crescita, oltre ai grandi corpi lutei della lattazione. L'esame istopatologico deve individuare un deterioramento qualitativo della popolazione di follicoli primordiali. Nelle femmine F1 occorre effettuare un'analisi quantitativa dei follicoli primordiali; il numero di animali, la selezione delle sezioni ovariche e le dimensioni dei campioni devono essere statisticamente adeguati alla procedura di analisi applicata. L'esame deve comprendere la conta del numero dei follicoli primordiali che può essere combinata con i follicoli piccoli in crescita per il confronto delle ovaie tra soggetti trattati e i controlli (15)(16)(17)(18)(19).

1.5.8.2 *Animali svezzati*

I tessuti e gli organi bersaglio che presentano evidenti irregolarità nei piccoli con anomalie esterne o segni clinici, oltre a quelli di un individuo di ciascun sesso di ogni nidiata scelto a random, sia della generazione F1 che della F2, che non sono stati selezionati per l'accoppiamento, devono essere fissati e conservati in mezzo adeguato per l'esame istopatologico. Occorre effettuare una caratterizzazione istopatologica completa del tessuto conservato con particolare attenzione per gli organi dell'apparato riproduttore.

2. DATI

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

I dati vanno riportati individualmente e riassunti sotto forma di tabella, evidenziando per ciascun gruppo sperimentale e ciascuna generazione il numero di animali presenti all'inizio del test, il numero di animali trovati morti durante il test o soppressi per motivi umanitari, il momento di eventuali decessi o soppressioni con metodi non cruenti, il numero di animali fertili, il numero di femmine gravide, il numero di animali che mostrano segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati, ivi compresi il momento dell'insorgenza, la durata e la gravità degli effetti tossici, i tipi di osservazione sugli animali parentali e sulla prole, i tipi di alterazioni istopatologiche, nonché tutti i dati di rilievo riguardanti le nidiate.

È necessario valutare i risultati numerici mediante un metodo statistico adeguato e generalmente accettato; i metodi statistici vanno selezionati come parte del disegno sperimentale e devono essere giustificati. Per l'analisi dei dati possono risultare utili i modelli statistici dose-risposta. La relazione deve comprendere sufficienti informazioni sul metodo di analisi e sul programma software utilizzati, di modo che un revisore o un esperto di statistica indipendente possa rivalutare e ricostruire l'analisi.

2.2 VALUTAZIONE DEI RISULTATI

I risultati del presente studio di tossicità riproduttiva a due generazioni vanno valutati in base agli effetti osservati, ai reperti delle autopsie e all'esame microscopico. La valutazione deve includere il rapporto, o la sua assenza, fra la dose della sostanza di saggio e la presenza o assenza, incidenza e gravità delle anomalie, comprese eventuali lesioni macroscopiche, gli organi bersaglio identificati, le conseguenze sulla fertilità, le anomalie cliniche, la capacità riproduttiva, gli effetti sulla generazione successiva, le alterazioni del peso corporeo, gli effetti sulla mortalità ed eventuali altri effetti tossici. Nella valutazione dei risultati del test occorre tenere conto delle proprietà fisico-chimiche della sostanza di saggio e, quando disponibili, dei dati sulla sua tossicocinetica.

Un test di tossicità riproduttiva adeguatamente condotto deve fornire una stima soddisfacente del livello di dose al quale non si osservano effetti e consentire di capire gli effetti negativi sulla riproduzione, sul parto, sull'allattamento, sullo sviluppo postnatale, sulla crescita e sullo sviluppo sessuale.

2.3 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Uno studio di tossicità riproduttiva a due generazioni deve fornire informazioni sugli effetti dovuti all'esposizione ripetuta ad una sostanza durante tutte le fasi del ciclo riproduttivo. In particolare, un simile studio fornisce informazioni sui parametri relativi alla riproduzione e sullo sviluppo, la crescita, la maturazione e la sopravvivenza della prole. I risultati dello studio vanno interpretati insieme ai dati ottenuti con studi subcronici, sullo sviluppo prenatale, di tossicocinetica e altri studi disponibili. I risultati di questo studio possono essere impiegati per valutare la necessità di sottoporre a ulteriori test una determinata sostanza chimica. L'estrapolazione all'uomo dei risultati dello studio è valida solo limitatamente. Tali risultati si prestano piuttosto per trarre informazioni sui livelli di dose ai quali non si rilevano effetti e sui livelli di esposizione accettabile per l'uomo (20)(21)(22)(23).

3. RELAZIONE

3.1 RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanza di saggio:

- natura fisica e, se pertinenti, proprietà fisico-chimiche;
- dati identificativi;
- purezza.

Veicolo (se pertinente):

- giustificazione per la scelta del veicolo, se diverso dall'acqua.

Animali sperimentali:

- specie/ceppo;
- numero, età e sesso degli animali;
- origine, condizioni di alloggio, dieta, materiali per la lettiera, ecc.;
- peso individuale degli animali all'inizio del test.

Condizioni del test:

- motivazione per la selezione del livello delle dosi;
- dettagli sulla formulazione/preparazione della sostanza di saggio somministrata nella dieta; concentrazioni ottenute;
- stabilità e omogeneità della preparazione;
- dettagli sulla somministrazione della sostanza di saggio;
- conversione dalla concentrazione della sostanza di saggio in dieta/acqua potabile (ppm) alla dose ottenuta (mg/kg peso corporeo/die), se pertinente;
- dettagli circa la qualità di cibo e acqua.

Risultati:

- consumo di cibo e di acqua (se disponibile), efficienza di trasformazione alimentare (incremento ponderale per grammo di cibo assunto), consumo della sostanza di saggio per gli animali P e F1, tranne che per il periodo di coabitazione e per almeno l'ultimo terzo dell'allattamento;
- dati sull'assorbimento (se disponibili);
- dati sul peso corporeo per gli animali P e F1 selezionati per l'accoppiamento;
- dati sul peso corporeo degli individui singoli e delle intere nidiate;
- peso corporeo al momento della soppressione degli animali e dati sul peso assoluto e relativo degli organi negli animali parentali;
- natura, gravità e durata dei segni clinici (reversibili o meno);
- momento del decesso durante lo studio o indicazione degli animali sopravvissuti fino alla conclusione del test;
- dati sulla risposta tossica per sesso e dose, ivi compresi gli indici di accoppiamento, fertilità, gestazione, nascita, vitalità e allattamento; la relazione deve indicare i numeri utilizzati per calcolare questi indici;
- effetti tossici o di altro tipo sulla riproduzione, sulla prole, sulla crescita postnatale, ecc.;
- reperti delle autopsie;
- descrizione dettagliata di tutti i reperti istopatologici;
- numero di femmine P e F1 con cicli normali e lunghezza dei cicli;
- numero totale degli spermatozoi nella coda dell'epididimo, percentuale di spermatozoi progressivamente mobili, percentuale di spermatozoi morfologicamente normali e percentuale di spermatozoi con ciascuna delle anomalie identificate;
- tempo di maturazione per l'accoppiamento, compreso il numero di giorni fino all'accoppiamento;
- durata della gestazione;

- numero di impianti, corpi lutei, numero di esemplari per nidata;
- numero di nati vivi e di perdite post-impianto;
- numero di piccoli con anomalie evidenti; numero di esemplari più piccoli del normale (se determinato);
- dati sui punti di reperi fisici nei piccoli e altri dati sullo sviluppo postnatale; i punti di reperi fisici valutati vanno giustificati;
- dati sulla funzionalità in piccoli e adulti, per quanto pertinenti;
- trattamento statistico dei risultati, se pertinente.

Discussione dei risultati.

Conclusioni, compresi i valori NOAEL per gli effetti sulle madri e sulla prole.

4.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproductions in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
- (2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.
- (3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.
- (4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39-44.
- (5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237-244.
- (6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273.
- (7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.
- (8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.
- (9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.
- (10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10:401-415.
- (11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330-337.
- (12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491-505.
- (13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298-303.
- (14) Russell, L.D. et al., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, Florida.

- (15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
 - (16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.
 - (17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.
 - (18) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5:379-383.
 - (19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
 - (20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
 - (21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.
 - (22) Palmer, A.K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
 - (23) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.»
-

ALLEGATO 2H

«B.42. SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA: LOCAL LYMPH NODE ASSAY

1. METODO

Questo saggio corrisponde al TG 429 (2002) dell'OCSE

1.1 INTRODUZIONE

Il Local Lymph Node Assay (LLNA) è stato validato ed accettato a sufficienza da giustificare l'adozione come nuovo Metodo (1)(2)(3). Si tratta del secondo metodo per valutare il potenziale di sensibilizzazione cutanea delle sostanze chimiche sugli animali. L'altro metodo (B.6) utilizza i saggi sui porcellini d'India e in particolare il guinea pig maximisation test (test di massimizzazione sui porcellini d'India) e il saggio di Buehler (4).

LLNA costituisce un metodo alternativo da usarsi per identificare le sostanze chimiche che provocano sensibilizzazione cutanea e per confermare che le sostanze chimiche non hanno un potenziale significativo di sensibilizzazione cutanea. Ciò non significa necessariamente che l'LLNA vada usato in tutti i casi in sostituzione del test sui porcellini d'India, ma piuttosto che il saggio ha gli stessi meriti e può essere utilizzato in alternativa, poiché i risultati positivi e negativi ottenuti con questo metodo non richiedono generalmente un'ulteriore conferma.

LLNA presenta alcuni vantaggi per ciò che concerne sia il progresso scientifico che il benessere degli animali. Esso studia la fase di induzione della sensibilizzazione cutanea e fornisce dati quantitativi che consentono la valutazione della risposta alla dose. I particolari della validazione dell'LLNA e una rassegna del lavoro ad essa associato sono stati pubblicati (5)(6)(7)(8). Inoltre, occorre sottolineare che i sensibilizzanti lievi/moderati, raccomandati come sostanze di controllo positive adeguate per i saggi sui porcellini d'India, sono idonei anche per l'uso con l'LLNA (6)(8)(9).

LLNA è un metodo *in vivo* e, di conseguenza, non elimina l'impiego di animali nella valutazione dell'attività sensibilizzante da contatto. Esso ha però il potenziale di ridurre il numero di animali necessari a tale scopo. Inoltre, l'LLNA rappresenta un significativo miglioramento del modo in cui vengono usati gli animali per gli studi sulla sensibilizzazione da contatto. L'LLNA è basato sull'attenta valutazione delle manifestazioni immunologiche stimulate dalle sostanze chimiche durante la fase di induzione della sensibilizzazione. Diversamente dai saggi sui porcellini d'India, l'LLNA non richiede la stimolazione di reazioni di ipersensibilità cutanea indotte da provocazione. Inoltre, l'LLNA non richiede l'uso di un adiuvante, come invece è il caso del saggio di massimizzazione sui porcellini d'India. Per questo motivo, l'LLNA riduce la sofferenza degli animali. Nonostante i vantaggi dell'LLNA rispetto ai tradizionali saggi sui porcellini d'India, occorre riconoscere che esistono alcune limitazioni che possono rendere necessario l'impiego dei saggi tradizionali (ad es., risposte falsi negativi nell'LLNA con alcuni metalli, risposte falsi positivi con alcuni irritanti cutanei) (10).

Vedi anche Introduzione, parte B.

1.2 PRINCIPIO DEL METODO

Il principio fondamentale che sta alla base dell'LLNA è che i sensibilizzanti inducono una proliferazione primaria dei linfociti nel linfonodo responsabile del drenaggio della zona di applicazione della sostanza chimica. Tale proliferazione è proporzionale alla dose applicata (e alla potenza dell'allergene) e costituisce un semplice mezzo per ottenere una misurazione quantitativa oggettiva della sensibilizzazione. L'LLNA valuta tale proliferazione come rapporto dose-risposta in cui la proliferazione osservata nei gruppi sperimentali viene confrontata con quella nei controlli trattati con il veicolo. Occorre determinare il rapporto fra la proliferazione nei gruppi trattati e quella dei controlli trattati con il solo veicolo, definito Indice di Stimolazione, che deve essere almeno di tre prima che una sostanza sperimentale possa essere ulteriormente valutata come potenziale sensibilizzante cutaneo. I metodi qui descritti si basano sull'uso della marcatura radioattiva per misurare la proliferazione delle cellule. È possibile però impiegare anche altri criteri per la valutazione della proliferazione, sempre che vi siano una giustificazione e un adeguato sostegno scientifico, comprese citazioni complete e la descrizione della metodologia.

1.3 DESCRIZIONE DEL METODO

1.3.1 Preparazioni

1.3.1.1 *Condizioni di alloggio e alimentazione*

Gli animali vanno posti in gabbie singole. La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (± 3 °C). Sebbene l'umidità relativa debba raggiungere almeno il 30 % e preferibilmente non superare il 70 %, tranne che nel corso delle pulizie degli ambienti, occorre puntare a un valore del 50-60 %. L'illuminazione deve essere artificiale, con una sequenza di 12 ore di luce e 12 d'oscurità. Per quanto concerne l'alimentazione, si possono usare le diete convenzionali da laboratorio con una quantità illimitata d'acqua potabile.

1.3.1.2 *Preparazione degli animali*

Gli animali vanno selezionati in maniera randomizzata, marcati per consentire l'identificazione individuale (ma non mediante marchi per orecchio), e tenuti nelle loro gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio del dosaggio, per permetterne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio. Prima dell'inizio del trattamento, tutti gli animali vanno esaminati per accertare che non presentino lesioni cutanee visibili.

1.3.2 Condizioni del saggio

1.3.2.1 *Animali sperimentali*

La specie di elezione per questo saggio è il topo. Vanno usate femmine di topo, giovani adulte, del ceppo CBA/Ca o CBA/J, nullipare e non gravide. All'inizio dello studio, gli animali devono avere un'età compresa fra 8 e 12 settimane e la variazione ponderale degli animali deve essere minima e non superare il 20 % del peso medio. È possibile utilizzare altri ceppi ed esemplari di sesso maschile quando vengano prodotti dati sufficienti a dimostrare che nella risposta all'LLNA non esistono differenze significative specifiche per il ceppo e/o il genere.

1.3.2.2 *Controllo dell'affidabilità*

Per dimostrare che il saggio è stato eseguito in modo adeguato e che il laboratorio ha competenza nel condurre il saggio con successo, si utilizzano controlli positivi. Il controllo positivo dovrebbe produrre una risposta positiva all'LLNA a un livello di esposizione che si ritiene provochi un aumento dell'indice di stimolazione (SI) > 3 rispetto al gruppo di controllo negativo. La dose per il controllo positivo va scelta in modo che l'induzione sia definita ma non eccessiva. Le sostanze di elezione sono l'esilcinnamaldeide (CAS 101-86-0, EINECS 202-983-3) e il mercaptobenzotiazolo (CAS 149-30-4, EINECS 205-736-8). Possono verificarsi occasioni in cui, con adeguata giustificazione, è possibile usare altre sostanze di controllo che rispondano ai criteri di cui sopra. Mentre normalmente ciascun saggio può richiedere un gruppo di controllo positivo, possono esservi delle situazioni in cui i laboratori sperimentali hanno a disposizione dati pregressi su controlli positivi per dimostrare la coerenza di una risposta soddisfacente per un periodo di sei mesi o superiore. In tali situazioni può essere appropriato eseguire saggi meno frequenti con controlli positivi a intervalli non superiori a 6 mesi. Sebbene la sostanza di controllo positiva vada sottoposta a saggi nel veicolo che è noto per la sua capacità di provocare una risposta coerente (ad es. acetone: olio di oliva), è possibile che si verifichino alcune situazioni normative nelle quali sarà necessario eseguire il saggio anche in un veicolo non standard (formulazione clinicamente/chimicamente pertinente). In tale situazione, è necessario sottoporre a saggio la possibile interazione di un controllo positivo con tale veicolo non convenzionale.

1.3.2.3 *Numero di animali, livelli di dose e scelta del veicolo.*

Ogni gruppo di saggi comprende almeno quattro animali, sui quali si saggiano almeno tre concentrazioni della sostanza sperimentale, più un gruppo di controllo negativo trattato solo con il veicolo per la sostanza sperimentale e, ove pertinente, un controllo positivo. Nei casi in cui sia necessario raccogliere dati su animali singoli, si utilizzano almeno cinque animali per gruppo. Salvo il trattamento con la sostanza in esame, gli animali del gruppo di controllo vanno manipolati esattamente come quelli dei gruppi sperimentali.

La selezione della dose e del veicolo vanno basate sulle raccomandazioni contenute nella voce bibliografica (1). Le dosi vanno selezionate fra le concentrazioni 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % ecc. Ove disponibili, occorre tenere conto dei dati esistenti circa la tossicità acuta e l'irritazione cutanea, nel selezionare le tre concentrazioni consecutive, in modo che la concentrazione più elevata massimizzi l'esposizione, evitando al contempo la tossicità sistemica e l'eccessiva irritazione cutanea locale (2)(11).

Il veicolo va selezionato con l'obiettivo di massimizzare le concentrazioni sperimentali e la solubilità producendo al contempo una soluzione/sospensione adatta all'applicazione della sostanza di prova. In ordine di preferenza, i veicoli raccomandati sono acetone/olio di oliva (4:1 v/v), dimetilformammide, metiltilchetone, glicole propilenico e dimetilsolfossido (2)(10), ma è possibile utilizzarne anche altri, fornendo una sufficiente motivazione scientifica. In alcune situazioni può rendersi necessario l'uso di un solvente clinicamente pertinente o la formulazione nella quale la sostanza sperimentale è posta in commercio, come controllo ulteriore. Occorre prestare particolare cura per assicurare che i materiali idrofili vengano incorporati in un sistema veicolare che inumidisce la pelle e non scorre via immediatamente. Vanno pertanto evitati i veicoli completamente acquosi.

1.3.3 **Procedura**

1.3.3.1 *Protocollo sperimentale*

Il protocollo sperimentale del saggio è il seguente:

- *Giorno 1:*

Identificare e registrare il peso di ciascun animale singolarmente. Cominciare l'applicazione di 25 µl della diluizione appropriata della sostanza sperimentale, del solo veicolo o del controllo positivo (pertinente), sulla parte posteriore di entrambe le orecchie.

- *Giorni 2 e 3:*

Ripetere la procedura di applicazione eseguita il giorno 1.

- *Giorni 4 e 5:*

Nessun trattamento.

- *Giorno 6:*

Registrare il peso di ciascun animale. Iniettare 250 µl di soluzione salina tampone fosfato (PBS) contenente 20 µCi ($7.4e + 8$ Bq) di ^3H -metil timidina a tutti i topi trattati e di controllo, attraverso la vena caudale. In alternativa, iniettare 250 µL di PBS contenente 2 µCi ($7.4e + 7$ Bq) di ^{125}I -iododeossiridina e 10^{-5} M fluorodeossiridina a tutti i topi, attraverso la vena caudale.

Cinque ore dopo, gli animali vanno soppressi. I linfonodi auricolari drenanti di entrambe le orecchie vengono asportati e posti in soluzione salina tampone fosfato raggruppati per gruppo sperimentale (sistema del gruppo di trattamento), oppure per ciascun animale separatamente (sistema del singolo animale). I particolari e i diagrammi relativi all'identificazione e alla dissezione dei linfonodi si trovano nell'Allegato I della voce bibliografica 10.

1.3.3.2 *Preparazione delle sospensioni cellulari*

Mediante delicata disaggregazione meccanica attraverso una rete di acciaio inossidabile con maglie da 200 µm si prepara una singola sospensione cellulare di cellule linfonodali, provenienti dai gruppi di trattamento oppure bilateralmente da singoli individui. Le cellule linfonodali vanno lavate due volte con abbondante PBS e precipitate con acido tricloroacetico al 5 % (TCA) a 4 °C per 18 ore (1). I granuli vanno poi rimessi in sospensione in 1 ml di TCA e quindi trasferiti in fiale di scintillazione contenenti 10 ml di liquido di scintillazione per il conteggio del ^3H , oppure trasferiti direttamente in tubi per conteggio gamma per il conteggio dello ^{125}I .

1.3.3.3 *Determinazione della proliferazione delle cellule (radioattività incorporata)*

L'incorporazione di ^3H -metil timidina viene misurata mediante conteggio a β -scintillazione, in disintegrazioni per minuto (DPM). L'incorporazione di ^{125}I -iododeossiridina viene misurata mediante conteggio dello ^{125}I ed espressa, ugualmente, in DPM. A seconda dell'approccio usato, l'incorporazione verrà espressa in DPM/gruppo di trattamento (sistema del gruppo di trattamento) o DPM/animale (sistema del singolo animale).

1.3.3.4 Osservazioni

1.3.3.4.1 Osservazioni cliniche

Gli animali vanno osservati attentamente una volta al giorno per individuare eventuali segni clinici di irritazione locale nel punto di applicazione o di tossicità sistemica. Tutte le osservazioni vanno registrate sistematicamente e riportate singolarmente per ciascun animale.

1.3.3.4.2 Peso corporeo

Come illustrato nella sezione 1.3.3.1, all'inizio del saggio e al momento della soppressione programmata degli animali, occorre misurare il peso dei singoli esemplari.

1.3.4 **Calcolo dei risultati**

I risultati vengono espressi mediante l'indice di stimolazione (SI). Se si applica il sistema del gruppo di trattamento, l'SI si ottiene dividendo l'incorporazione radioattiva per ciascun gruppo di trattamento per l'incorporazione del gruppo di controllo trattato con veicolo; si ottiene così un SI medio. Quando si utilizza l'approccio a singolo animale, l'SI si ottiene dividendo i valori medi delle DPM per animale calcolate per ogni gruppo di trattamento compreso il gruppo di controllo positivo, per le medie delle DPM per animale calcolate per il gruppo di controllo trattato solo con il veicolo. Quindi l'SI medio per i controlli trattati con solo veicolo è 1.

L'uso dell'approccio a singolo animale per calcolare l'SI consentirà di eseguire un'analisi statistica dei dati. Nella scelta di un metodo adeguato di analisi statistica, lo sperimentatore deve essere consapevole di possibili ineguaglianze delle varianze e di altri problemi correlati che possono richiedere una trasformazione dei dati o una analisi statistica non parametrica. Un approccio adeguato per interpretare i dati consiste nel valutare tutti i dati singoli dei soggetti trattati e dei controlli trattati con veicolo, e nel ricavare da essi la curva dose-risposta più adeguata, tenendo conto dei limiti fiduciali (8)(12)(13). Lo sperimentatore deve però prestare attenzione a possibili risposte "aberranti" per singoli animali all'interno di un gruppo che possano richiedere l'uso di una misura alternativa della risposta (ad es. del valore mediano anziché della media) o l'eliminazione dell'osservazione aberrante.

Il processo decisionale rispetto a una risposta positiva prevede un indice di stimolazione ≥ 3 unito alla considerazione della dose-risposta e, ove pertinente, della significatività statistica (3)(6)(8)(12)(14).

Qualora fosse necessario chiarire i risultati ottenuti, occorre prendere in considerazione diverse proprietà della sostanza sperimentale, in particolare se ha un rapporto strutturale con noti sensibilizzanti cutanei, se causa eccessiva irritazione cutanea, nonché la natura della risposta alla dose rilevata. Queste e altre considerazioni sono illustrate nei dettagli in altra sede (7).

2. **DATI**

I dati vanno riassunti sotto forma di tabella, evidenziando i valori medi e individuali delle disintegrazioni per minuto (DPM) e gli indici di stimolazione per ciascun gruppo di dose (compreso quello di controllo con veicolo).

3. **RELAZIONE**

3.1 RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DELSAGGIO

La relazione deve contenere le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

- dati di identificazione (ad es. numero CAS, se disponibile; origine; purezza; impurezze note; numero di lotto);
- natura fisica e proprietà fisico-chimiche (ad es. volatilità, stabilità, solubilità);
- se si tratta di una miscela, composizione e percentuali relative dei componenti.

Veicolo:

- dati di identificazione [purezza; concentrazione (ove pertinente); volume usato];
- giustificazione per la scelta del veicolo.

Animali sperimentali:

- ceppo dei topi usati;
- condizioni microbiologiche degli animali, se note;
- numero, età e sesso degli animali;
- origine degli animali, condizioni di alloggio, dieta, ecc.

Condizioni del saggio:

- dettagli relativi alla preparazione e all'applicazione della sostanza di prova;
- giustificazione per la scelta delle dosi, compresi i risultati dello studio di definizione dell' intervallo di concentrazioni, se eseguito; concentrazioni del veicolo e della sostanza e quantità totale di sostanza applicata;
- dettagli sulla qualità del cibo e dell'acqua (compresi tipo/origine della dieta, origine dell'acqua).

Controllo dell'affidabilità:

- riassunto dei risultati del più recente controllo dell'affidabilità, comprese informazioni sulla sostanza, la concentrazione e il veicolo usati;
- dati sui controlli positivi e negativi, contemporanei e/o storici, per il laboratorio di prova.

Risultati:

- peso dei singoli animali all'inizio dell'applicazione delle dosi e alla soppressione programmata;
- tabella dei valori di DPM medi (sistema del gruppo di trattamento) o individuali (sistema del singolo animale) come pure l'intervallo dei valori per entrambi i sistemi e degli indici di stimolazione per ciascun gruppo di dose (compreso quello di controllo con solo veicolo);
- analisi statistica ove pertinente;
- momento dell'insorgenza e decorso degli eventuali segni di tossicità, compresa l'irritazione cutanea nel punto di applicazione e la somministrazione, per ciascun animale.

Discussione dei risultati:

- Breve commento sui risultati, sull'analisi dose-risposta e sulle analisi statistiche, ove pertinenti, con una conclusione sulla necessità o meno di considerare la sostanza di prova un sensibilizzante cutaneo.

4.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food and Chemical Toxicology* 30, 165-169.
- (2) Kimber, I, Derman, R.J., Scholes E.W, and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology*, 93, 13-31.

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

B.43. STUDI DI NEUROTOSSICITÀ NEI RODITORI**1. METODO**

Questo metodo di saggio è equivalente al metodo OCSE TG 424 (1997).

Il suo scopo è permettere di ricavare le informazioni necessarie per confermare o caratterizzare in modo più accurato la potenziale neurotossicità di sostanze chimiche in animali adulti. Può essere abbinato a metodi esistenti utilizzati per studi di tossicità per dose ripetuta, oppure essere utilizzato in uno studio a sé stante. Per la concezione di studi basati sul suo utilizzo, si raccomanda di consultare il documento orientativo OCSE sulle strategie e sui metodi di sperimentazione riguardanti la neurotossicità (1), in particolare nel caso in cui siano previste modifiche delle osservazioni e dei procedimenti raccomandati per l'uso routinario di questo metodo. Tale documento, infatti, è stato elaborato allo scopo di facilitare la scelta di altri procedimenti da utilizzare in casi specifici. La valutazione della neurotossicità sullo sviluppo non rientra nell'oggetto di questo metodo.

1.1 INTRODUZIONE

Per la valutazione delle caratteristiche tossiche delle sostanze chimiche, è importante prendere in considerazione la loro capacità potenziale di causare effetti neurotossici. Il metodo utilizzato per i saggi di tossicità sistemica per dose ripetuta prevede già osservazioni intese a individuare una potenziale neurotossicità. Il metodo oggetto del presente documento può essere utilizzato per disegnare uno studio che consenta di ricavare maggiori informazioni o di confermare gli effetti neurotossici osservati negli studi di tossicità sistemica per dose ripetuta. Tuttavia, per talune classi di sostanze chimiche, di cui è nota la potenziale neurotossicità, può essere opportuno utilizzare questo metodo anche in assenza di indicazioni di una potenziale neurotossicità emerse da studi di tossicità sistemica per dose ripetuta. Depongono a favore di questo approccio, ad esempio:

- l'osservazione di segni neurologici o lesioni neuropatologiche in studi di tossicità diversi dagli studi di tossicità per dose ripetuta, oppure
- l'affinità strutturale o altre informazioni che indicano una correlazione tra tali sostanze e neurotossici noti.

L'uso di questo metodo può essere opportuno anche in altri casi; per maggiori indicazioni a questo riguardo, si rimanda alla voce bibliografica (1).

Nell'elaborazione di questo metodo, si è posta particolare attenzione alla possibilità di un suo adattamento a necessità specifiche di conferma della specifica neurotossicità istopatologica e comportamentale di una sostanza chimica, nonché di caratterizzazione e quantificazione delle risposte neurotossiche.

In passato, si faceva coincidere la neurotossicità con la neuropatia, che comporta lesioni neuropatologiche o disfunzioni neurologiche quali convulsioni, paralisi o tremore. La neuropatia è indubbiamente una manifestazione importante di neurotossicità, ma oggi appare evidente che vi sono molti altri segni di tossicità per il sistema nervoso centrale (p. es. la perdita della coordinazione motoria, i deficit sensoriali, le disfunzioni dell'apprendimento e della memoria) che possono non emergere negli studi sulla neuropatia o in altri tipi di studi.

Questo metodo per la conduzione di studi di neurotossicità ha lo scopo di consentire l'individuazione di effetti neurocomportamentali e neuropatologici di rilievo nei roditori adulti. Gli effetti comportamentali, anche in assenza di modificazioni morfologiche, possono essere indicativi di un effetto avverso sull'organismo; viceversa, non tutte le modificazioni comportamentali sono riconducibili in modo specifico al sistema nervoso centrale. Per questo motivo, tutte le modificazioni osservate devono essere valutate insieme a dati correlati di tipo istopatologico, ematologico o biochimico, nonché a dati riguardanti altri tipi di tossicità sistemica. Ai fini della caratterizzazione e quantificazione delle risposte neurotossiche, questo metodo prevede tra l'altro specifici esami istopatologici e comportamentali che possono essere ulteriormente supportati da indagini elettrofisiologiche e/o biochimiche (1)(2)(3)(4).

I neurotossici possono agire su diversi target del sistema nervoso e con svariati meccanismi. Dato che non esiste un unico insieme di test che permetta di valutare in modo approfondito e completo il potenziale neurotossico di ogni sostanza, può essere necessario ricorrere ad altri test *in vivo* o *in vitro* specifici per il tipo di neurotossicità osservata o attesa.

Questo metodo di saggio può essere anche usato, insieme alle indicazioni riportate nel documento orientativo OCSE sulle strategie e sui metodi di sperimentazione riguardanti la neurotossicità (1), per disegnare studi che permettano di caratterizzare in modo più accurato la quantificazione dose-risposta o migliorarne la sensibilità in modo da poter stimare meglio il NOAEL (livello in corrispondenza del quale non si osservano effetti avversi) o documentare rischi noti o sospetti associati alla sostanza chimica. Ad esempio, può essere utilizzato per disegnare studi intesi a identificare e valutare il meccanismo o i meccanismi di neuro-

tossicità, oppure a integrare i dati già disponibili ricavati da procedure di base per l'osservazione degli effetti neurocomportamentali o neuropatologici. Non è necessario che tali studi producano gli stessi dati che si ricaverebbero applicando i procedimenti standard raccomandati in questo metodo, se tali dati sono già disponibili e non sono ritenuti necessari per l'interpretazione dei risultati dello studio.

Questo studio di neurotossicità, usato da solo o in abbinamento ad altri studi, permette di ricavare informazioni utili per:

- stabilire se la sostanza chimica esaminata provoca effetti permanenti o reversibili sul sistema nervoso;
- caratterizzare con maggior precisione le alterazioni del sistema nervoso associate all'esposizione alla sostanza chimica, e comprendere il meccanismo alla base di tali alterazioni;
- determinare le relazioni dose-risposta e tempo-risposta al fine di stimare un livello in corrispondenza del quale non si osservano effetti avversi (a sua volta utilizzabile per stabilire criteri di sicurezza per la sostanza chimica in questione).

Questo metodo di saggio prevede la somministrazione orale della sostanza da esaminare. In talune circostanze può essere preferibile usare altre vie di somministrazione (ad esempio cutanea o per inalazione); in tal caso può essere necessaria una modifica dei procedimenti raccomandati. La via di somministrazione deve essere scelta in funzione del profilo di esposizione negli esseri umani e delle informazioni disponibili sulle caratteristiche tossicologiche o cinetiche.

1.2 DEFINIZIONI

Effetto avverso: alterazione rispetto alle condizioni di base, riferibile al trattamento somministrato, che riduce la capacità di un organismo di sopravvivere, riprodursi o adattarsi all'ambiente.

Dose: quantità di sostanza somministrata. Viene espressa in peso (g, mg), oppure in peso per unità di peso dell'animale usato per il saggio (p. es. mg/kg), oppure concentrazione costante nella dieta (ppm).

Dosaggio: termine generale che indica la dose, la frequenza e la durata della somministrazione.

Neurotossicità: modificazione avversa che si produce nella struttura o nella funzione del sistema nervoso centrale in seguito all'esposizione a un agente chimico, biologico o fisico.

Neurotossico: agente chimico, biologico o fisico potenzialmente in grado di causare neurotossicità.

NOAEL: abbreviazione dell'inglese no observed adverse effect level; designa il livello di dose massimo in corrispondenza del quale non si osservano effetti avversi correlati al trattamento.

1.3 PRINCIPIO DEL METODO DI SAGGIO

La sostanza chimica in esame viene somministrata per via orale in un range di dosi a diversi gruppi di roditori da laboratorio. Normalmente sono necessarie dosi ripetute, e il regime di somministrazione può essere di 28 giorni, subcronico (90 giorni) o cronico (1 anno o più). I procedimenti indicati in questo metodo sono utilizzabili anche per studi di neurotossicità acuta. Il saggio eseguito sugli animali ha lo scopo di consentire l'individuazione o la caratterizzazione di anomalie del comportamento e/o neurologiche. In ciascun periodo di osservazione viene valutata una serie di comportamenti che potrebbero essere influenzati dai neurotossici. Al termine del saggio, all'interno di ciascun gruppo un sottogruppo di animali di ciascun sesso viene sottoposto a perfusione *in situ* e prelievo di tessuti del cervello, del midollo spinale e dei nervi periferici, destinati a un successivo esame.

Nel caso di studi a sé stanti condotti per determinare la neurotossicità di una sostanza o per caratterizzarne gli effetti neurotossici, gli animali di ciascun gruppo non utilizzati per la perfusione e il successivo esame istopatologico (vedi tabella 1) possono essere utilizzati per specifici esami neurocomportamentali, neuropatologici, neurochimici o elettrofisiologici allo scopo di completare i dati ricavati dagli esami standard previsti da questo metodo (1). Questi esami supplementari possono essere particolarmente utili qualora osservazioni empiriche o gli effetti attesi indichino che l'azione neurotossica della sostanza in esame si esercita su un tipo specifico di bersaglio. Altrimenti, gli animali rimanenti possono essere utilizzati per valutazioni analoghe a quelle previste da questo metodo nell'ambito di studi di tossicità per dose ripetuta nei roditori.

Quando gli esami previsti da questo metodo sono abbinati a esami previsti da altri metodi, è necessario disporre di un numero sufficiente di animali per poter eseguire le osservazioni richieste da entrambi gli studi.

1.4 DESCRIZIONE DEL METODO

1.4.1 Scelta della specie di animali

La specie di roditori da preferirsi è rappresentata dal ratto, ma è possibile utilizzare anche altre specie di roditori, fornendone adeguata motivazione. Gli animali utilizzati devono essere adulti giovani e sani appartenenti a ceppi comunemente usati in laboratorio. Le femmine devono essere nullipare e non gravide. Di norma, la somministrazione deve iniziare quanto prima possibile dopo il divezzamento, preferibilmente prima che gli animali abbiano raggiunto le sei settimane di età e in ogni caso prima che abbiano raggiunto le nove settimane di età. Tuttavia, quando questo studio viene eseguito in abbinamento ad altri studi, può essere necessario un aggiustamento del criterio relativo all'età degli animali. All'inizio dello studio, il peso degli animali deve essere compreso fra l'80 % e il 120 % del peso medio per ciascun sesso. Quando uno studio per dose ripetuta di breve durata serve da studio preliminare per uno studio a lungo termine, nei due studi devono essere utilizzati animali dello stesso ceppo e della stessa provenienza.

1.4.2 Condizioni di stabulazione e di alimentazione

La temperatura dello stabulario deve essere di 22 °C (\pm 3 °C). L'umidità relativa deve essere preferibilmente del 50-60 %; in ogni caso deve essere non inferiore al 30 % e possibilmente non superiore al 70 %, tranne durante la pulizia dei locali. L'illuminazione deve essere artificiale e alternare 12 ore di luce e 12 ore di oscurità. I rumori forti intermittenti devono essere ridotti al minimo. Per l'alimentazione, si possono utilizzare diete convenzionali da laboratorio con acqua ad libitum. La scelta della dieta può essere influenzata dalla necessità di garantire un'adeguata miscelazione della sostanza in esame, allorché essa viene somministrata con questo metodo. Gli animali devono essere alloggiati in gabbie individuali o contenenti piccoli gruppi dello stesso sesso.

1.4.3 Preparazione degli animali

L'assegnazione al gruppo di trattamento e al gruppo di controllo viene effettuata in modo casuale scegliendo animali giovani e sani. Le gabbie devono essere sistemate in modo da ridurre al minimo eventuali effetti dovuti alla loro collocazione. Gli animali devono essere identificati in modo univoco e tenuti nelle gabbie per almeno 5 giorni prima dell'inizio dello studio, in modo da consentirne l'acclimatazione alle condizioni di laboratorio.

1.4.4 Via di somministrazione e preparazione delle dosi

Questo metodo prevede espressamente la somministrazione orale della sostanza da esaminare. La somministrazione può essere effettuata per via intragastrica, con gli alimenti, nell'acqua di bevanda o mediante capsule. Si possono utilizzare anche altre vie di somministrazione (p. es. cutanea o per inalazione), ma in questo caso può essere necessario modificare i procedimenti raccomandati. La via di somministrazione deve essere scelta in funzione del profilo di esposizione degli esseri umani e delle informazioni disponibili sulle caratteristiche tossicologiche o cinetiche. Si devono comunque indicare i motivi della scelta della via di somministrazione e le conseguenti modifiche dei procedimenti previsti da questo metodo.

Se necessario, la sostanza da esaminare può essere disciolta o sospesa in un veicolo adatto. Ove possibile, si raccomanda di utilizzare una soluzione/sospensione acquosa, oppure, come seconda alternativa, una soluzione/sospensione in olio (per esempio olio di mais), o infine una soluzione/sospensione in altri veicoli. Le caratteristiche di tossicità del veicolo devono essere note. È opportuno inoltre verificare le seguenti caratteristiche del veicolo: effetti del veicolo sull'assorbimento, sulla distribuzione, sul metabolismo o sulla ritenzione della sostanza in esame che potrebbero alterare le caratteristiche tossiche di tale sostanza; ed effetti sul consumo di cibo o di acqua o sullo stato nutrizionale degli animali.

1.5 PROCEDIMENTI

1.5.1 Numero e sesso degli animali

Quando lo studio viene condotto come studio a sé stante, ciascun gruppo di trattamento e di controllo deve essere composto almeno da 20 animali (10 femmine e 10 maschi) ai fini della valutazione delle osservazioni cliniche e funzionali dettagliate. Al termine dello studio, almeno cinque maschi e cinque femmine, scelti tra questi 10 maschi e 10 femmine, devono essere sottoposti a perfusione *in situ* e a esame neuroisto-

patologico dettagliato. Nei casi in cui solo un numero limitato di animali all'interno di un determinato gruppo di trattamento venga sottoposto a osservazione per rilevare segni di effetti neurotossici, è opportuno includere tali animali tra quelli scelti per la perfusione. Quando lo studio viene condotto in abbinamento a uno studio di tossicità per dose ripetuta, si deve prevedere l'utilizzo di un numero di animali sufficiente per gli obiettivi di entrambi gli studi. Nella tabella 1 è riportato, per varie combinazioni di studi, il numero minimo di animali da utilizzare per ciascun gruppo. Se sono previsti sacrifici intermedi nel corso dello studio, o gruppi di recupero per l'osservazione della reversibilità, della persistenza o della comparsa tardiva di effetti tossici dopo il trattamento, oppure se sono previste osservazioni supplementari, il numero di animali deve essere opportunamente aumentato affinché sia disponibile il numero di animali necessario per l'osservazione e l'esame istopatologico.

1.5.2 **Gruppi di trattamento e gruppo di controllo**

In genere si devono utilizzare almeno tre gruppi di trattamento a dosi diverse e un gruppo di controllo; tuttavia, se la valutazione di altri dati porta a prevedere l'assenza di effetti a una dose ripetuta di 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno, può essere eseguito un saggio limite. Per stabilire le dosi da utilizzare, in mancanza di dati adeguati si può effettuare uno studio preliminare di tipo range finding. Fatta eccezione per la somministrazione della sostanza da esaminare, gli animali del gruppo di controllo devono essere trattati in modo identico agli esemplari del gruppo di controllo. Qualora la sostanza da saggiare venga incorporata in un veicolo, al gruppo di controllo verrà somministrato il medesimo veicolo nel volume massimo utilizzato.

1.5.3 **Controllo di attendibilità**

Il laboratorio che esegue lo studio deve presentare dati che dimostrino la capacità dello stesso di eseguire lo studio, nonché la sensibilità dei procedimenti utilizzati. Tali dati devono provare la capacità di individuare e quantificare, nel modo più opportuno, modificazioni dei diversi endpoint di cui è raccomandata l'osservazione, quali segni autonomi, reattività sensoriale, forza di prensione e attività motoria. Per informazioni su sostanze chimiche che causano vari tipi di risposte neurotossiche e che possono essere utilizzate come sostanze di controllo positivo si rimanda alle voci bibliografiche da (2) a (9). È ammesso l'uso di dati storici, che si raccomanda di aggiornare periodicamente, a condizione che siano identici gli aspetti essenziali dei procedimenti sperimentali. Nuovi dati che dimostrino che i procedimenti continuano a essere sensibili devono essere elaborati ogniqualvolta venga modificato un elemento essenziale del saggio o dei procedimenti.

1.5.4 **Scelta della dose**

I livelli di dose devono essere scelti tenendo conto di tutti i dati esistenti sulla tossicità e sulle caratteristiche cinetiche della sostanza da esaminare o di sostanze affini. Il livello di dose più elevato deve essere tale da indurre effetti neurotossici o chiari effetti tossici sistemici. Deve essere inoltre definita una serie decrescente di livelli di dose al fine di individuare un'eventuale risposta dose-correlata e l'assenza di effetti avversi osservati al livello di dose più basso (NOAEL). In linea di massima, i livelli di dose devono essere tali da consentire di distinguere gli effetti tossici primari sul sistema nervoso dagli effetti legati alla tossicità sistemica. Per la determinazione dei livelli di dose decrescenti risulta spesso ottimale applicare un fattore di divisione compreso tra due e tre; è comunque preferibile aggiungere un quarto gruppo di studio piuttosto che avere uno scarto eccessivo (ad esempio superiore a un fattore 10) tra un dosaggio e l'altro. Se esistono stime attendibili sull'esposizione umana prevista, se ne deve tenere conto.

1.5.5 **Saggio limite**

Se uno studio effettuato conformemente al metodo descritto con un livello di dose di almeno 1 000 mg/kg di peso corporeo/giorno non produce effetti neurotossici osservabili e se i dati relativi a composti di struttura affine non sono suggestivi di tossicità, può non essere necessario eseguire uno studio completo con tre livelli di dose. In funzione dell'esposizione umana prevista può essere opportuno utilizzare un livello di dose orale più elevato nel saggio limite. Per altri tipi di somministrazione, ad esempio per inalazione o applicazione cutanea, il livello massimo di esposizione realizzabile dipende in molti casi dalle proprietà fisico-chimiche della sostanza da esaminare. La dose da utilizzare in un saggio limite per uno studio di neurotossicità acuta per via orale deve essere di almeno 2 000 mg/kg.

1.5.6 **Somministrazione delle dosi**

La sostanza viene somministrata agli animali giornalmente, sette giorni su sette, per un periodo di almeno 28 giorni. La scelta di somministrare la sostanza cinque giorni alla settimana o per un periodo più breve deve essere opportunamente motivata. Se viene effettuata per via intragastrica, la somministrazione deve

avvenire in dose singola mediante sonda gastrica o idonea cannula per intubazione. Il volume massimo di liquido somministrabile in una volta sola dipende dalla taglia dell'animale, ma non deve superare 1 ml/100 g di peso corporeo tranne nel caso delle soluzioni acquose, per le quali si possono prevedere fino a 2 ml/100 g di peso corporeo. Salvo nel caso di sostanze irritanti o corrosive, i cui effetti di norma tendono a esacerbarsi con l'aumentare della concentrazione, la variabilità del volume somministrato deve essere ridotta al minimo variando la concentrazione, in modo da mantenere un volume costante per tutti i livelli di dose.

Se la sostanza in esame è somministrata con la dieta o con l'acqua, è importante verificare che le quantità da utilizzare non alterino il normale bilancio idrico o nutrizionale. Se la sostanza è somministrata con la dieta, si può utilizzare una concentrazione costante nella dieta (ppm) o un livello di dose costante in funzione del peso degli animali, avendo cura di specificare quale sia l'alternativa prescelta. Se la sostanza è somministrata per via intragastrica, la dose deve essere somministrata ogni giorno alla stessa ora e all'occorrenza modificata per mantenere costante il livello di dose rispetto al peso dell'animale. Qualora, prima di uno studio a lungo termine, si effettui uno studio preliminare per dose ripetuta, la dieta degli animali deve essere identica nei due studi. Per gli studi acuti, nel caso in cui non sia possibile effettuare la somministrazione in un'unica dose, si può procedere al frazionamento della stessa e alla somministrazione delle varie frazioni nell'arco di un periodo non superiore a 24 ore.

1.6 OSSERVAZIONE

1.6.1 **Frequenza delle osservazioni e degli esami**

Negli studi per dose ripetuta, il periodo di osservazione deve coprire il periodo della somministrazione. Negli studi acuti, l'osservazione deve estendersi ai 14 giorni successivi al trattamento. Nel caso degli animali dei gruppi satellite, per i quali è previsto un periodo post-trattamento senza esposizione, l'osservazione deve comprendere anche questo periodo.

Le osservazioni devono essere effettuate con frequenza tale da assicurare la massima probabilità che vengano individuate le anomalie comportamentali e/o neurologiche. Le osservazioni devono essere effettuate preferibilmente ogni giorno alla stessa ora, tenendo conto del periodo probabile di massima intensità degli effetti dopo la somministrazione. La frequenza delle osservazioni cliniche e degli esami funzionali è riassunta nella tabella 2. Se in base ai dati cinetici o di altro tipo ricavati in precedenza appare necessario effettuare le osservazioni o gli esami funzionali in momenti diversi rispetto a quelli previsti o variare i periodi post-osservazione, deve essere elaborato un programma alternativo che consenta di ricavare quante più informazioni possibile. Queste variazioni devono essere adeguatamente motivate.

1.6.1.1 *Osservazione delle condizioni generali di salute e della mortalità/morbilità*

Tutti gli animali devono essere esaminati attentamente almeno una volta al giorno per verificare le condizioni di salute e almeno due volte al giorno per determinare la morbilità e la mortalità.

1.6.1.2 *Osservazioni cliniche dettagliate*

Osservazioni cliniche dettagliate devono essere eseguite su tutti gli animali scelti a questo scopo (vedi tabella 1) una volta prima dell'esposizione iniziale (per consentire un confronto sullo stesso soggetto) e successivamente a diversi intervalli, in funzione della durata dello studio (vedi tabella 2). Nel caso degli animali dei gruppi satellite di recupero, le osservazioni cliniche dettagliate devono essere eseguite al termine del periodo di recupero. Le osservazioni cliniche dettagliate devono essere eseguite fuori dalle gabbie, collocando gli animali in un recinto standard. Le osservazioni devono essere accuratamente registrate, possibilmente utilizzando sistemi di punteggio che comprendano criteri o scale di punteggi esplicitamente definiti dal laboratorio che esegue il saggio per ciascuna delle misurazioni effettuate. Le variazioni delle condizioni sperimentali devono essere minime (non legate sistematicamente al trattamento) e le osservazioni devono essere condotte da osservatori preparati non a conoscenza del trattamento somministrato.

Si raccomanda di eseguire le osservazioni in modo strutturato, così da applicare sistematicamente criteri ben definiti (compresa la definizione del range normale) a ciascun animale in ciascuna osservazione. Il range normale deve essere adeguatamente documentato. Tutti i segni osservati devono essere registrati. Ogniqualvolta ciò sia possibile, deve essere registrata anche l'entità dei segni osservati. Le osservazioni cliniche devono riguardare, tra l'altro, tutte le alterazioni della cute, del pelo, degli occhi e delle mucose, la comparsa di secrezioni ed escrezioni e l'attività autonoma (p. es. lacrimazione, piloerezione, ampiezza pupillare, ritmo respiratorio insolito e/o respirazione attraverso la bocca, anomalie nella minzione o nella defecazione, e variazione di colore dell'urina).

Deve essere registrata anche ogni risposta inusuale riguardante la posizione del corpo, il livello di attività (p. es. maggiore o minore esplorazione del recinto standard) e la coordinazione dei movimenti. Devono essere inoltre registrate le modificazioni dell'andatura (p. es. andatura anserina, atassia), della postura (p. es. gobba) e della reattività alla manipolazione, al posizionamento o ad altri stimoli ambientali, come pure la presenza di movimenti clonici o tonici, convulsioni o tremori, stereotipi (p. es. tolettatura eccessiva, movimenti inusuali della testa, continuo girare in tondo) o comportamenti insoliti (p. es. tendenza a mordere o tendenza eccessiva a leccarsi, automutilazione, marcia a ritroso, vocalizzazione) o aggressivi.

1.6.1.3 *Esami funzionali*

Analogamente alle osservazioni cliniche dettagliate, anche gli esami funzionali devono essere eseguiti una volta prima dell'esposizione e successivamente a intervalli frequenti in tutti gli animali scelti a questo scopo (vedi tabella 1). La frequenza degli esami funzionali dipende anche dalla durata dello studio (vedi tabella 2). Oltre che agli intervalli indicati nella tabella 2, nei gruppi satellite di recupero devono essere effettuate osservazioni funzionali anche quanto più vicino possibile al sacrificio finale. Tra gli esami funzionali dev'essere compresa la valutazione della reattività sensoriale a stimoli di diverso tipo [p. es. stimoli uditivi, visivi e propriocettivi (5)(6)(7)], della forza di prensione (8) e dell'attività motoria (9). L'attività motoria deve essere misurata con un dispositivo automatizzato in grado di rilevare sia un aumento che una diminuzione della stessa. Se si utilizza un altro sistema, questo deve essere quantitativo e presentare sensibilità e affidabilità dimostrate. Ciascun dispositivo deve essere collaudato per garantire l'affidabilità nel tempo e l'omogeneità delle sue caratteristiche rispetto a quelle degli altri dispositivi. Ulteriori indicazioni sui procedimenti utilizzabili sono contenute nelle voci bibliografiche citate. Se non esistono dati (p. es. struttura-attività, dati epidemiologici, altri studi tossicologici) che indicano i potenziali effetti neurotossici, è opportuno prevedere l'esecuzione di esami più specifici sulla funzione sensoriale e motoria o sull'apprendimento e sulla memoria per valutare in maggior dettaglio questi possibili effetti. Per ulteriori informazioni sugli esami più specifici e sul loro impiego, si rimanda alla voce bibliografica (1).

In via eccezionale, gli animali che presentano segni di tossicità tali da interferire in modo significativo con gli esami funzionali possono essere esclusi da tali esami, fornendone opportuna motivazione.

1.6.2 **Peso corporeo e consumo di cibo/acqua**

Negli studi di durata fino a 90 giorni, tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta alla settimana e almeno settimanalmente deve essere determinato il loro consumo di cibo (o di acqua, nel caso in cui la sostanza in esame venga somministrata con l'acqua). Negli studi a lungo termine, tutti gli animali devono essere pesati almeno una volta alla settimana nelle prime 13 settimane e successivamente almeno una volta ogni quattro settimane. Il consumo di cibo (o di acqua, nel caso in cui la sostanza in esame venga somministrata con l'acqua) deve essere misurato almeno una volta alla settimana nelle prime 13 settimane e successivamente a intervalli di circa tre mesi, sempreché non appaia opportuno modificare tale frequenza alla luce dello stato di salute degli animali o di variazioni del loro peso corporeo.

1.6.3 **Esame oftalmologico**

Per studi di durata superiore a 28 giorni deve essere effettuato un esame oftalmologico, utilizzando un oftalmoscopio o uno strumento equivalente adatto, prima della somministrazione della sostanza in esame e al termine dello studio, preferibilmente su tutti gli animali e in ogni caso almeno sugli animali del gruppo di trattamento a dose elevata e del gruppo di controllo. In presenza di modificazioni degli occhi o di segni clinici che ne indichino l'opportunità, l'esame deve essere effettuato su tutti gli animali. Negli studi a lungo termine, l'esame oftalmologico deve essere effettuato anche alla tredicesima settimana. Gli esami oftalmologici non sono necessari se i relativi dati possono essere ricavati da altri studi di durata e con livelli di dose simili.

1.6.4 **Esami ematologici e biochimici clinici**

Quando lo studio di neurotossicità viene effettuato in abbinamento a uno studio di tossicità sistemica per dose ripetuta, devono essere eseguiti gli esami ematologici e biochimici-clinici previsti dal metodo dello studio di tossicità sistemica. Il prelievo dei campioni deve avvenire in modo da ridurre al minimo i potenziali effetti neurocomportamentali.

1.6.5 **Esame istopatologico**

L'esame neuropatologico deve integrare e ampliare le osservazioni effettuate nella fase *in vivo* dello studio. A tal fine, si deve procedere alla fissazione *in situ* dei tessuti di almeno 5 animali/sexo/gruppo (vedi tabella 1 e il seguente paragrafo), utilizzando tecniche di perfusione e fissazione generalmente accettate [vedi voce

bibliografica (3), capitolo 5 e voce bibliografica (4), capitolo 50]. Tutte le modificazioni macroscopiche osservabili devono essere registrate. Se lo studio è eseguito come studio a sé stante per la valutazione della neurotossicità o la caratterizzazione degli effetti neurotossici, gli animali rimanenti possono essere utilizzati per specifici esami neurocomportamentali (10)(11), neuropatologici (10)(11)(12)(13), neurochimici (10)(11)(14)(15) o elettrofisiologici (10)(11)(16)(17) a integrazione dei test e degli esami qui descritti, o sottoposti anch'essi a esame istopatologico. Questi esami supplementari sono particolarmente utili quando, in base a osservazioni empiriche o agli effetti attesi, si prevede un tipo specifico di neurotossicità o un target specifico (2)(3). In alternativa, gli animali rimanenti possono essere anch'essi utilizzati per le valutazioni patologiche di routine descritte nel metodo relativo agli studi per dose ripetuta.

Tutti i campioni di tessuti, inclusi in paraffina, devono essere colorati con un procedimento di colorazione generale, ad esempio con ematossilina-eosina, quindi sottoposti a esame microscopico. Se si osservano o si sospettano segni di neuropatia periferica, si deve procedere all'esame di campioni di tessuti di nervi periferici inclusi in plastica. In base ai segni clinici, può essere opportuno estendere l'esame ad altri siti o utilizzare procedure di colorazione speciali. Per indicazioni sugli ulteriori siti da esaminare si rimanda alle voci bibliografiche (3)(4). Può essere utile anche utilizzare opportuni coloranti speciali per provare tipi specifici di modificazioni patologiche (18).

Sezioni rappresentative del sistema nervoso centrale e del sistema nervoso periferico devono essere sottoposte a esame istologico [vedi voce bibliografica (3), capitolo 5 e voce bibliografica (4), capitolo 50]. Di norma, i prelievi tissutali devono essere effettuati almeno su: prosencefalo, area centrale del cervello, compresa una sezione che attraversi l'ippocampo, mesencefalo, cervelletto, ponte, midollo allungato, occhio con nervo ottico e retina, midollo spinale a livello dei rigonfiamenti cervicale e lombare, gangli della radice dorsale, fibre della radice dorsale e ventrale, nervo sciatico prossimale, nervo tibiale prossimale (a livello del ginocchio) e ramificazioni del nervo tibiale a livello dei muscoli del polpaccio. Per il midollo spinale e i nervi periferici, le sezioni devono essere sia trasversali che longitudinali. Deve essere osservata la vascolarizzazione del sistema nervoso. Deve essere esaminato anche un campione di muscolo scheletrico, in particolare dei muscoli del polpaccio. Particolare attenzione deve essere rivolta a punti del SNC e SNP con strutture e modelli cellulari e delle fibre notoriamente molto sensibili all'azione dei neurotossici.

Indicazioni sulle alterazioni neuropatologiche tipiche indotte dall'esposizione a tossici sono contenute nelle voci bibliografiche (3)(4). Si raccomanda di sottoporre i campioni tissutali a un esame articolato in più fasi. Innanzitutto, si devono confrontare sezioni di tessuti prelevati da esemplari del gruppo trattato con dose elevata a sezioni di tessuti prelevati da esemplari del gruppo di controllo. Se non vengono osservate alterazioni neuropatologiche, non sono necessarie ulteriori analisi. Se invece vengono osservate alterazioni neuropatologiche nel gruppo trattato con dose elevata, si procede assegnando un numero di codice ed esaminando sequenzialmente campioni di ciascuno dei tessuti potenzialmente interessati prelevati da esemplari dei gruppi trattati con dose intermedia e con dose bassa.

Se all'esame qualitativo vengono riscontrate alterazioni neuropatologiche, deve essere effettuato un secondo esame su tutte le regioni del sistema nervoso che manifestano tali alterazioni. Dopo aver assegnato un codice a tutte le sezioni prelevate da ciascuna delle regioni potenzialmente interessate in tutti i gruppi trattati, si fanno esaminare le sezioni in modo casuale da persone all'oscuro del significato dei codici e si registrano la frequenza e la gravità di ciascuna lesione. Terminata la classificazione di tutte le regioni di tutti i gruppi trattati, si apre il codice e si procede all'analisi statistica per valutare le relazioni dose-risposta, avendo cura inoltre di descrivere esempi dei diversi livelli di gravità di ciascuna lesione.

I reperti neuropatologici devono essere valutati nel contesto delle osservazioni e misurazioni comportamentali, come pure di altri dati ricavati da studi precedenti o contemporanei sulla tossicità sistemica della sostanza in esame.

2. DATI

2.1 ELABORAZIONE DEI RISULTATI

Devono essere forniti dati individuali su ciascun animale. Inoltre, tutti i dati devono essere riassunti in una tabella indicante, per ogni gruppo di trattamento o di controllo, il numero di animali all'inizio del saggio, il numero di animali rinvenuti morti durante il saggio o sottoposti a eutanasia, nonché il momento del decesso di ciascun animale morto spontaneamente o sottoposto a eutanasia, il numero di animali che hanno manifestato segni di tossicità, una descrizione dei segni di tossicità osservati con indicazione del momento di insorgenza, della durata, del tipo e della gravità degli effetti tossici, il numero di animali che hanno manifestato lesioni, con indicazione del tipo e della gravità delle lesioni.

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati dello studio devono essere valutati in termini di incidenza, gravità e correlazione tra effetti neuro-comportamentali e neuropatologici (compresi gli effetti neurochimici o elettrofisiologici, nonché gli effetti riscontrati con gli eventuali esami supplementari effettuati) e qualsiasi altro effetto avverso osservato. Se possibile, i risultati numerici devono essere valutati sulla base di un metodo statistico appropriato e comunemente accettato. I metodi statistici devono essere selezionati durante la fase di progettazione dello studio.

3. PRESENTAZIONE DEI DATI

3.1 RELAZIONE SUL SAGGIO

La relazione sul saggio deve includere le seguenti informazioni:

Sostanza in esame:

- natura fisica (compresi isomerismo, purezza e proprietà fisico-chimiche);
- dati identificativi.

Veicolo (se del caso):

- motivazione della scelta del veicolo.

Animali da laboratorio:

- specie/ceppo impiegati;
- numero, età e sesso degli animali;
- provenienza, condizioni di stabulazione, acclimatazione, dieta, ecc.;
- peso di ciascun animale all'inizio del saggio.

Condizioni sperimentali:

- informazioni dettagliate sulla formulazione della sostanza in esame/preparazione della dieta, sulla concentrazione utilizzata, sulla stabilità e sull'omogeneità del preparato;
- dosi somministrate, caratteristiche del veicolo, volume e forma fisica del preparato somministrato;
- modalità precise di somministrazione della sostanza in esame;
- motivazione della scelta dei livelli di dose;
- motivazione della scelta della via e della durata di esposizione;
- se del caso, conversione della concentrazione della sostanza nella dieta o nell'acqua (ppm) in dose effettiva (mg/kg di peso corporeo/giorno);
- informazioni dettagliate sulla qualità degli alimenti e dell'acqua.

Osservazione e procedimenti del saggio:

- informazioni dettagliate sull'assegnazione degli animali di ciascun gruppo ai sottogruppi destinati alla perfusione;
- informazioni dettagliate sui sistemi di punteggio utilizzati, compresi criteri e scale di punteggio impiegati per ciascuna misurazione effettuata nel corso delle osservazioni cliniche dettagliate;

- informazioni dettagliate sugli esami funzionali per la valutazione della reattività sensoriale a stimoli di diverso tipo (p. es. uditivi, visivi e propriocettivi), della forza di prensione, dell'attività motoria (comprese indicazioni particolareggiate sui dispositivi automatizzati impiegati per rilevare l'attività); altri esami eseguiti;
- informazioni dettagliate sugli esami oftalmologici e, se del caso, sugli esami ematologici e sugli esami di biochimica clinica con i rispettivi valori di riferimento;
- informazioni dettagliate su specifici esami neurocomportamentali, neuropatologici, neurochimici o elettrofisiologici.

Risultati:

- peso corporeo e relative modificazioni, compreso il peso corporeo al momento del sacrificio;
- consumo di cibo e consumo d'acqua, se del caso;
- dati sulla risposta tossica per sesso e per livello di dose, compresi i segni di tossicità o mortalità;
- natura, gravità e durata (momento di insorgenza e successivo decorso) degli effetti clinici osservati (sia reversibili che non reversibili);
- descrizione dettagliata di tutti i risultati degli esami funzionali;
- reperti necroscopici;
- descrizione dettagliata dei risultati di tutti gli eventuali esami neurocomportamentali, neuropatologici e neurochimici o elettrofisiologici;
- eventuali dati sull'assorbimento e sul metabolismo;
- elaborazione statistica dei risultati, se del caso.

Discussione dei risultati:

- informazioni sulla relazione dose-risposta;
- relazione tra eventuali altri effetti tossici e la conclusione sul potenziale neurotossico della sostanza chimica in esame;
- NOAEL.

Conclusioni:

- viene incoraggiata l'inclusione di una indicazione specifica della neurotossicità complessiva della sostanza chimica esaminata.

4. **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

- (1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OCSE, Parigi. In preparazione.
- (2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparazione.
- (3) World Health Organisation (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
- (4) Spencer P.S., Schaumburg H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. A cura di Spencer, P.S. e Schaumburg, H.H., Williams e Wilkins, Baltimora/Londra.
- (5) Tupper D.E., Wallace R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999-1003.

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

Tabella 1:

Numero minimo di animali necessari per ciascun gruppo per uno studio di neurotossicità a sé stante o abbinato ad altri studi

	STUDIO DI NEUROTOSSICITÀ ESEGUITO COME:			
	Studio a sé stante	Studio abbinato a uno studio su 28 giorni	Studio abbinato a uno studio su 90 giorni	Studio abbinato a uno studio di tossicità cronica
Numero totale di animali per gruppo	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine	15 maschi e 15 femmine	25 maschi e 25 femmine
Numero di animali scelti per gli esami funzionali, comprese le osservazioni cliniche dettagliate	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine	10 maschi e 10 femmine
Numero di animali scelti per la perfusione <i>in situ</i> e l'esame neuroistopatologico	5 maschi e 5 femmine	5 maschi e 5 femmine	5 maschi e 5 femmine	5 maschi e 5 femmine
Numero di animali scelti per le osservazioni sulla tossicità per dose ripetuta/subcronica/ cronica, gli esami ematologici, di biochimica clinica, istopatologici, ecc. conformemente alle indicazioni delle rispettive linee guida		5 maschi e 5 femmine	10 maschi [†] e 10 femmine [†]	20 maschi [†] e 20 femmine [†]
Eventuali osservazioni supplementari	5 maschi e 5 femmine			

† Compresi cinque animali scelti per gli esami funzionali e le osservazioni cliniche dettagliate nello studio di neurotossicità.

Tabella 2:

Frequenza dell'osservazione clinica e degli esami funzionali

Tipo di osservazioni		Durata dello studio			
		Acuto	28 giorni	90 giorni	Cronico
In tutti gli animali	Condizioni di salute generali	una volta al giorno	una volta al giorno	una volta al giorno	una volta al giorno
	Mortalità/morbilità	due volte al giorno	due volte al giorno	due volte al giorno	due volte al giorno
Negli animali scelti per le osservazioni funzionali	Osservazioni cliniche dettagliate	<ul style="list-style-type: none"> — prima dell'esposizione iniziale — entro 8 ore dalla somministrazione nel momento di massimo effetto previsto — il 7 e 14 giorno dopo la somministrazione 	<ul style="list-style-type: none"> — prima dell'esposizione iniziale — successivamente una volta alla settimana 	<ul style="list-style-type: none"> — prima dell'esposizione iniziale — una volta durante la prima o seconda settimana di esposizione — successivamente una volta al mese 	<ul style="list-style-type: none"> — prima dell'esposizione iniziale — una volta alla fine del primo mese di esposizione — successivamente ogni tre mesi
	Esami funzionali	<ul style="list-style-type: none"> — prima dell'esposizione iniziale — entro 8 ore dalla somministrazione nel momento di massimo effetto previsto — il 7 e 14 giorno dopo la somministrazione 	<ul style="list-style-type: none"> — prima dell'esposizione iniziale — durante la quarta settimana di trattamento il più vicino possibile alla fine del periodo di esposizione 	<ul style="list-style-type: none"> — prima dell'esposizione iniziale — una volta durante la prima o seconda settimana di esposizione — successivamente una volta al mese 	<ul style="list-style-type: none"> — prima dell'esposizione iniziale — una volta alla fine del primo mese di esposizione — successivamente ogni tre mesi»

ALLEGATO 2I

«C.21. MICRORGANISMI DEL SUOLO: TEST DI TRASFORMAZIONE DELL'AZOTO

1. METODO

Questo metodo di prova corrisponde al TG 216 (2000) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Qui di seguito è descritto un metodo di laboratorio messo a punto per studiare gli effetti a lungo termine delle sostanze chimiche, dopo un'unica esposizione, sull'attività di trasformazione dell'azoto ad opera dei microrganismi del suolo. Il test si basa principalmente sulle raccomandazioni dell'Organizzazione europea e mediterranea per la protezione delle piante (1), ma tiene conto anche delle linee guida formulate dal Centro federale tedesco di ricerca biologica per l'agricoltura e la silvicoltura (*Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft*) (2), dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (*Environmental Protection Agency*) (3), dal SETAC (4) e dall'Organizzazione internazionale di normalizzazione (ISO) (5). Il numero ed il tipo di suoli da utilizzare nel test sono stati concordati in occasione di un *workshop* dell'OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, svoltosi a Belgirate nel 1995 (6). Le raccomandazioni riguardanti il prelievo, la manipolazione e lo stoccaggio dei campioni di suolo si basano su linee guida ISO (7) e sulle raccomandazioni formulate dal *workshop* di Belgirate. Per accertare e valutare le caratteristiche tossiche delle sostanze di prova può essere necessario determinarne gli effetti sull'attività microbica del suolo, ad esempio quando occorre disporre di dati sui potenziali effetti collaterali dei prodotti fitosanitari sulla microflora del suolo o quando si prevede un'esposizione dei microrganismi del suolo ad altri tipi di sostanze chimiche. Il test di trasformazione dell'azoto viene effettuato per determinare gli effetti di queste sostanze chimiche sulla microflora del suolo. Qualora siano testati prodotti agrochimici (ad es. fitosanitari, fertilizzanti, prodotti chimici per la silvicoltura), oltre al test di trasformazione dell'azoto si effettua anche il test di trasformazione del carbonio. Per le altre sostanze chimiche è invece sufficiente il test di trasformazione dell'azoto. Tuttavia se i valori CE_{50} riscontrati per queste sostanze nel test di trasformazione dell'azoto corrispondono a quelli degli inibitori della nitrificazione disponibili in commercio (ad es. nitrapirina), per ottenere maggiori informazioni può essere effettuato anche il test di trasformazione del carbonio.

I suoli sono costituiti da miscele eterogenee e complesse di componenti viventi e non viventi. I microrganismi svolgono un ruolo importante nella decomposizione e nella trasformazione della materia organica in suolo fertile, contribuendo in maniera differente a seconda delle specie ai vari aspetti della fertilizzazione. Eventuali interferenze con questi processi biochimici rischiano a lungo termine di influenzare il ciclo delle sostanze nutritive e di alterare la fertilità del suolo. La trasformazione del carbonio e dell'azoto avviene in tutti i suoli fertili; anche se le comunità microbiche responsabili di questi processi variano a seconda del tipo di suolo, le vie di trasformazione sono sostanzialmente le stesse.

Il metodo di prova di seguito descritto è stato concepito per individuare gli effetti nocivi a lungo termine di una sostanza sul processo di trasformazione dell'azoto nei suoli aerobici superficiali, ma consente anche di stimarne gli effetti sulla trasformazione del carbonio ad opera della microflora del suolo. La formazione di nitrati avviene in seguito alla degradazione del legame carbonio-azoto; di conseguenza, qualora nei campioni di suolo trattato ed in quelli di controllo si riscontrino gli stessi tassi di produzione di nitrati, è molto probabile che le principali vie di degradazione del carbonio siano intatte e funzionali. Il substrato scelto per il test (farina di erba medica in polvere) presenta un buon rapporto carbonio/azoto (compreso normalmente tra 12:1 e 16:1). Per questo motivo durante il test la carenza di carbonio è ridotta e le comunità microbiche eventualmente danneggiate da una sostanza chimica possono ristabilirsi entro 100 giorni.

I test su cui si basa questo metodo di prova sono stati originariamente concepiti per sostanze di cui è possibile stimare la quantità che penetra nel suolo. È il caso, ad esempio, dei prodotti fitosanitari, la cui dose di applicazione nel terreno è conosciuta. Per i prodotti agrochimici è sufficiente utilizzare due concentrazioni di prova, corrispondenti alla dose di applicazione prevista o stimata; tali prodotti possono essere testati come ingredienti attivi (i.a.) o come prodotti formulati. Tuttavia, cambiando sia la quantità della sostanza di prova applicata al suolo sia le modalità di valutazione dei dati il test può essere utilizzato non soltanto per i prodotti agrochimici ma anche per altre sostanze chimiche di cui non si conosca la quantità che penetra nel suolo; in questo caso è possibile determinare gli effetti sulla trasformazione dell'azoto di una serie di concentrazioni. I dati ottenuti sono utilizzati per costruire una curva dose-risposta e calcolare i valori CE_x , dove x è la percentuale di effetto.

1.2 DEFINIZIONI

Trasformazione dell'azoto: degradazione ad opera dei microrganismi di materia organica contenente azoto attraverso il processo di ammonificazione e nitrificazione, con formazione del relativo prodotto finale inorganico, il nitrato.

CE_x (concentrazione efficace): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione dell' x per cento nella trasformazione dell'azoto in nitrato.

CE₅₀ (concentrazione efficace media): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione del 50 % nella trasformazione dell'azoto in nitrato.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Dopo essere stato setacciato il suolo viene ammendato con farine vegetali in polvere ed una parte viene trattata con la sostanza di prova mentre un'altra parte non viene sottoposta ad alcun trattamento (controllo). Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, si raccomanda di utilizzare almeno due concentrazioni di prova, scelte in relazione alla massima concentrazione prevista nel terreno. Dopo 0, 7, 14 e 28 giorni di incubazione si utilizza un solvente adeguato per estrarre i campioni trattati e i campioni controllo e si determinano le quantità di nitrati presenti negli estratti. La velocità di formazione dei nitrati nei campioni trattati viene comparata con quella dei campioni di controllo, calcolando la percentuale di scarto tra campione trattato e campione controllo. Tutti i test durano almeno 28 giorni. Se al ventottesimo giorno le differenze tra i campioni di suolo trattati e non trattati sono uguali o superiori al 25 % le misurazioni continuano fino ad un massimo di 100 giorni. Se il test è effettuato su prodotti non agrochimici ai campioni di suolo viene aggiunta la sostanza di prova in diverse concentrazioni e dopo 28 giorni di incubazione vengono misurate le quantità di nitrati formate nei campioni trattati ed in quelli di controllo. I risultati dei test effettuati con concentrazioni multiple sono analizzati mediante un modello di regressione ed infine vengono calcolati i valori CE_x (CE₅₀, CE₂₅ e/o CE₁₀. Cfr. in proposito le definizioni).

1.5 VALIDITÀ DEL TEST

Le analisi dei risultati del test sui prodotti agrochimici si basano su differenze relativamente modeste (valore medio ± 25 %) tra le concentrazioni di nitrati presenti nei campioni controllo e in quelli trattati, e dunque la presenza di forti variazioni tra i campioni controllo può portare a falsi risultati. Pertanto la variazione tra le diverse repliche dei campioni controllo deve essere inferiore a ± 15 %.

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.6.1 **Apparecchiatura**

Per il test sono utilizzati contenitori di materiale chimicamente inerte, di capacità adeguata al metodo di incubazione del suolo utilizzato (ad es. in un campione globale o in una serie di sottocampioni; cfr. paragrafo 1.7.1.2). Occorre adottare le precauzioni necessarie per ridurre al minimo l'evaporazione di acqua e consentire lo scambio di gas durante il test (ad es. i contenitori utilizzati per il test possono essere coperti con un foglio di polietilene perforato). Per i test su sostanze volatili devono essere utilizzati contenitori a chiusura ermetica e a tenuta di gas, di dimensioni tali che il campione di suolo occupi all'incirca un quarto del volume.

Si utilizza attrezzatura da laboratorio di uso comune tra cui:

- agitatore: agitatore meccanico o dispositivo equivalente;
- centrifuga (3 000 g) o sistema filtrante (con carta da filtro priva di nitrati);
- strumento di sensibilità e riproducibilità adeguata per l'analisi dei nitrati.

1.6.2 **Selezione e numero di suoli**

Si utilizza un unico suolo, per il quale si raccomandano le seguenti caratteristiche:

- contenuto in sabbia: non inferiore al 50 % e non superiore al 75 %;
- pH: 5.5-7.5;

- contenuto di carbonio organico: 0,5-1,5 %;
- deve essere misurata la biomassa microbica (8)(9): il contenuto di carbonio di quest'ultima deve corrispondere almeno all'1 % del carbonio organico totale del suolo.

Nella maggior parte dei casi un suolo con queste caratteristiche rappresenta l'ipotesi più sfavorevole, in quanto l'adsorbimento della sostanza chimica di prova è minimo, mentre la disponibilità per la microflora è massima e dunque in genere non è necessario effettuare il test con altri suoli. Tuttavia in alcune circostanze, ad esempio quando si prevede un uso prevalente della sostanza di prova su particolari tipi di suolo, (ad es. suoli forestali acidi) o per sostanze chimiche con carica elettrostatica, può essere necessario utilizzare un suolo aggiuntivo.

1.6.3 **Prelievo e stoccaggio dei campioni di suolo**

1.6.3.1 *Prelievo*

Devono essere disponibili informazioni dettagliate sulla storia del sito di campionamento, tra cui l'esatta ubicazione, il tipo di copertura vegetale, le date dei trattamenti con prodotti fitosanitari e con fertilizzanti organici o inorganici, l'eventuale applicazione di materiali biologici ed i casi di contaminazione accidentale. Il sito scelto per il prelievo del suolo deve consentire cicli molto lunghi; sono perciò adatti i pascoli permanenti, i terreni destinati a colture cerealicole annuali (ad eccezione del granturco) o da sovescio a semina fitta. Il sito di campionamento scelto non deve essere stato sottoposto a trattamenti con prodotti fitosanitari da almeno un anno e da almeno sei mesi non devono essere stati applicati fertilizzanti organici. L'uso di fertilizzanti minerali è ammesso solo se richiesto dal tipo di coltura in atto ed in questo caso il prelievo di campioni di suolo deve essere effettuato almeno tre mesi dopo l'applicazione del fertilizzante. Bisogna evitare di utilizzare suoli trattati con fertilizzanti di cui siano noti gli effetti biocidi (ad es. calciocianamide).

Il prelievo di campioni non deve avvenire durante o subito dopo lunghi periodi (> 30 giorni) di siccità o di saturazione idrica del terreno. Nei suoli arati i campioni devono essere prelevati ad una profondità compresa tra 0 e 20 cm. Nei suoli a prato o a pascolo o in altri suoli che non vengono arati per lunghi periodi (almeno un ciclo vegetativo) la profondità massima di campionamento può essere leggermente superiore a 20 cm (ad es. fino a 25 cm).

I campioni devono essere trasportati in contenitori adeguati e in condizioni di temperatura tali da garantire che le proprietà iniziali del suolo non vengano alterate in maniera significativa.

1.6.3.2 *Stoccaggio*

È preferibile utilizzare suoli appena prelevati dal terreno. Qualora non si possa evitare lo stoccaggio in laboratorio, i suoli possono essere conservati al buio ad una temperatura di 4 ± 2 °C per un massimo di tre mesi. Durante lo stoccaggio deve essere assicurato il mantenimento in condizioni aerobiche. Se i suoli vengono prelevati da zone in cui gelano per almeno tre mesi l'anno, si può prendere in considerazione lo stoccaggio per sei mesi ad una temperatura compresa tra -18 °C e -22 °C. Prima di ogni esperimento viene misurata la biomassa microbica dei suoli: il carbonio presente nella biomassa deve essere pari almeno all'1 % del contenuto di carbonio organico totale nel suolo (cfr. paragrafo 1.6.2).

1.6.4 **Manipolazione e preparazione del suolo**

1.6.4.1 *Pre-incubazione*

Se il suolo è stato stoccato (cfr. paragrafo 1.6.3.2), si raccomanda la pre-incubazione per un periodo compreso tra 2 e 28 giorni. Durante la pre-incubazione la temperatura e il contenuto di umidità del suolo devono essere analoghi a quelli del test (cfr. paragrafi 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Caratteristiche fisico-chimiche*

Dopo la rimozione manuale di particelle di grandi dimensioni (ad es. sassi, parti di piante, ecc.) il suolo viene setacciato ad umido, evitando l'eccessiva essiccazione, in modo tale che la dimensione dei granuli sia inferiore o uguale a 2 mm. Il contenuto di umidità del campione di suolo deve essere regolato con acqua distillata o deionizzata ad un valore compreso tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica.

1.6.4.3 *Ammendamento con substrato organico*

Il suolo deve essere ammendato con idoneo substrato organico, ad es. farina di erba medica verde in polvere (componente principale: *Medicago sativa*) con un rapporto carbonio-azoto (C/N) compreso tra 12:1 e 16:1. Si raccomanda una proporzione di 5 g di erba medica per ogni chilogrammo di terreno (peso secco).

1.6.5 **Preparazione della sostanza di prova per l'applicazione al suolo**

Normalmente la sostanza di prova è applicata utilizzando un vettore, che può essere l'acqua (per le sostanze idrosolubili) o un solido inerte come la sabbia di quarzo fine (diametro: 0,1-0,5 mm). Si deve evitare l'uso di vettori liquidi diversi dall'acqua (ad es. solventi organici come l'acetone o il cloroformio) in quanto possono danneggiare la microflora. Se il vettore utilizzato è la sabbia, quest'ultima può essere rivestita con la sostanza di prova, disciolta o posta in sospensione in un solvente adeguato. In questi casi il solvente deve essere eliminato per evaporazione prima della miscelazione con il suolo. Per consentire una distribuzione ottimale della sostanza di prova nel suolo, si raccomanda una proporzione di 10 g di sabbia per ogni chilogrammo di suolo (peso secco). I campioni controllo sono trattati esclusivamente con una quantità equivalente di acqua e/o di sabbia di quarzo.

Se il test viene effettuato su sostanze chimiche volatili, occorre per quanto possibile evitare dispersioni durante il trattamento e cercare di assicurare una distribuzione omogenea nel suolo (ad es. la sostanza di prova deve essere iniettata in diversi punti del suolo).

1.6.6 **Concentrazioni di prova**

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, devono essere utilizzate almeno due concentrazioni. La concentrazione più bassa deve corrispondere almeno alla quantità massima che si prevede possa effettivamente penetrare nel suolo, mentre la concentrazione più elevata deve essere un multiplo della concentrazione più bassa. Le concentrazioni della sostanza di prova aggiunte al suolo sono calcolate supponendo un'incorporazione uniforme ad una profondità di 5 cm ed una densità apparente del suolo di 1,5 g/cm³. Per i prodotti agrochimici applicati direttamente al suolo o per le sostanze chimiche di cui si può prevedere la quantità che penetra nel suolo, le concentrazioni di prova raccomandate sono la massima concentrazione ambientale prevista (PEC) ed il suo quintuplo. Le sostanze per le quali si prevedono più applicazioni al suolo nel corso di una stagione devono essere testate a concentrazioni calcolate moltiplicando la PEC per il numero massimo di applicazioni previste. Tuttavia la più alta concentrazione testata non deve superare il decuplo della dose massima di applicazione. Se invece il test è effettuato su altri tipi di sostanze chimiche, si utilizza una serie geometrica di almeno cinque concentrazioni. Il range delle concentrazioni testate deve essere tale da consentire di determinare i valori CE_x.

1.7 ESECUZIONE DEL TEST

1.7.1 **Condizioni di esposizione**

1.7.1.1 *Trattamento e controllo*

Qualora il test sia condotto su prodotti agrochimici, il suolo viene suddiviso in tre porzioni di uguale peso. Due di esse sono miscelate con il vettore contenente la sostanza chimica, mentre la terza è miscelata soltanto con il vettore, senza aggiunta di alcuna sostanza (campione controllo). Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato, sia per quelli di controllo. Nei test su altri tipi di sostanze chimiche il suolo viene suddiviso in sei porzioni di uguale peso. Cinque campioni vengono miscelati con il vettore contenente la sostanza di prova, mentre il sesto è miscelato unicamente con il vettore, senza aggiungere la sostanza chimica. Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato sia per quelli di controllo. Bisogna cercare di assicurare una distribuzione omogenea della sostanza di prova nei campioni di suolo trattati. Durante la miscelazione occorre evitare di compattare o agglomerare il suolo.

1.7.1.2 *Incubazione dei campioni*

L'incubazione dei campioni di suolo può essere effettuata in due modi: utilizzando un campione globale di suolo trattato ed uno di suolo non trattato o invece una serie di sottocampioni elementari e di uguali dimensioni di suolo trattato e di suolo non trattato. Tuttavia per le sostanze volatili il test deve necessariamente essere effettuato utilizzando una serie di sottocampioni. Se si opta per l'incubazione in un campione globale occorre preparare grandi quantità sia di suolo trattato sia di suolo non trattato e, durante il test, procedere secondo necessità al prelievo dei vari sottocampioni da analizzare. La quantità inizialmente preparata per il trattamento e per i controlli dipende dalla dimensione dei sottocampioni, dal numero di repliche utilizzate per l'analisi e dal numero massimo di tempi di campionamento previsti. I suoli incubati in un campione globale devono essere accuratamente mescolati prima di procedere al prelievo di sottocampioni. Se invece i suoli sono incubati in una serie di sottocampioni, il suolo trattato e quello non trattato vengono suddivisi nel numero di sottocampioni necessario, e questi ultimi vengono utilizzati a seconda del bisogno. Negli esperimenti in cui si possono prevedere più di due tempi di campionamento deve essere

preparato un numero sufficiente di sottocampioni per tener conto di tutte le repliche e di tutti i tempi di campionamento. Per il test devono essere incubate in condizioni aerobiche almeno tre repliche di campioni di suolo (cfr. paragrafo 1.7.1.1.) Durante tutti i test devono essere utilizzati appositi contenitori con uno spazio di testa sufficiente ad evitare che si sviluppino condizioni anaerobiche. Se il test è effettuato su sostanze volatili, il metodo da impiegare è necessariamente quello dei sottocampioni.

1.7.1.3 *Condizioni e durata del test*

Il test viene eseguito al buio ad una temperatura ambiente di 20 ± 2 °C. Durante il test il contenuto di umidità dei campioni deve essere mantenuto tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica del suolo (cfr. paragrafo 1.6.4.2), con un margine di variazione di ± 5 %. Se necessario può essere aggiunta acqua distillata e deionizzata.

La durata minima dei test è di 28 giorni. Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, i tassi di formazione di nitrati nei campioni trattati vengono comparati con quelli riscontrati nei campioni controllo. Se al ventottesimo giorno la differenza è superiore al 25 %, il test prosegue fino al raggiungimento di una differenza uguale o inferiore al 25 % o per un massimo di 100 giorni. Per le sostanze diverse dai prodotti agrochimici il test termina dopo 28 giorni. Al ventottesimo giorno vengono determinate le quantità di nitrati nei campioni trattati e nei campioni controllo e calcolati i valori CE_x .

1.7.2 **Campionamento e analisi dei suoli**

1.7.2.1 *Programma di campionamento*

Se il test è condotto su prodotti agrochimici occorre analizzare i campioni di suolo per misurare la quantità di nitrati nei giorni 0, 7, 14 e 28. Qualora la durata del test debba essere prolungata, le successive misurazioni vengono effettuate ad intervalli di 14 giorni a partire dal ventottesimo giorno.

Se il test è condotto su sostanze diverse dai prodotti agrochimici, si utilizzano almeno cinque concentrazioni di prova e l'analisi dei nitrati sui campioni di suolo viene effettuata all'inizio (giorno 0) e alla fine del periodo di esposizione (giorno 28). Se necessario si può ricorrere ad una misurazione intermedia, ad esempio il giorno 7. I dati ottenuti il ventottesimo giorno sono utilizzati per determinare il valore CE_x per la sostanza chimica. Eventualmente i dati ottenuti dai campioni controllo il giorno 0 possono essere utilizzati come misura della quantità iniziale di nitrati nel suolo.

1.7.2.2 *Analisi dei campioni di suolo*

Ad ogni campionamento viene determinata la quantità di nitrati formata in ciascuna replica dei campioni trattati e dei campioni controllo. I nitrati vengono estratti dal suolo agitando i campioni con idoneo solvente di estrazione, ad es. una soluzione 0.1 M di cloruro di potassio. Si raccomanda di utilizzare 5 ml di soluzione KCl per grammo di suolo (peso secco equivalente). Per ottimizzare l'estrazione il campione di suolo e la soluzione di estrazione non devono occupare più della metà del volume del contenitore. La miscela viene agitata a 150 giri al minuto per 60 minuti e poi centrifugata o filtrata; vengono quindi analizzate le fasi liquide per misurare i nitrati. Gli estratti liquidi privi di particelle possono essere stoccati prima dell'analisi ad una temperatura di -20 ± 5 °C per un massimo di sei mesi.

2. **DATI**

2.1 **TRATTAMENTO DEI RISULTATI**

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici si registra la quantità di nitrati formata in ciascun campione replicato di suolo, e i valori medi di tutti i campioni replicati devono essere riportati in una tabella. I tassi di trasformazione dell'azoto devono essere analizzati con metodi statistici adeguati e comunemente accettati (ad es. F-test, soglia di significatività del 5 %). La quantità di nitrati è espressa in mg/kg di suolo (peso secco)/die. Il tasso di formazione di nitrati riscontrato in ciascun campione trattato viene comparato con quello del campione controllo e viene calcolato lo scarto percentuale tra i due campioni.

Se il test è effettuato su altre sostanze chimiche, viene determinata la quantità di nitrati formata in ciascun campione replicato e viene costruita una curva dose-risposta per stimare i valori CE_x . La quantità di nitrati ottenuta dopo 28 giorni nei campioni trattati, espressa in mg di nitrati/kg di suolo (peso secco), viene comparata con quella riscontrata nei campioni controllo. I risultati vengono utilizzati per calcolare i valori

percentuali di inibizione per ogni concentrazione di prova. Su un grafico si riportano le percentuali ottenute in funzione delle concentrazioni e con metodi statistici vengono calcolati i valori CE_x . Con procedure standard vengono determinati anche gli intervalli di confidenza ($p = 0.95$) dei valori CE_x (10)(11)(12).

Le sostanze di prova che contengono elevate quantità di azoto possono contribuire alla quantità di nitrati che si forma nel corso del test. Se queste sostanze sono testate a concentrazioni elevate (come avviene ad es. per le sostanze chimiche per cui si prevedono applicazioni ripetute) il test deve prevedere adeguati controlli, ad esempio aggiungendo al suolo la sostanza di prova ma non la farina vegetale. I risultati dei controlli devono essere presi in considerazione nel calcolo dei valori CE_x .

2.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nella valutazione dei risultati dei test sui prodotti agrochimici, se in un qualsiasi campionamento effettuato dopo il ventottesimo giorno la differenza tra i tassi di formazione dei nitrati nel campione di suolo trattato con la concentrazione più bassa (cioè la massima concentrazione prevista) e nel campione controllo è uguale o inferiore al 25 %, si può ritenere che la sostanza testata non produce effetti a lungo termine sulla trasformazione dell'azoto nel suolo. Per la valutazione dei risultati dei test su sostanze diverse dai prodotti agrochimici si utilizzano i valori CE_{50} , CE_{25} e/o CE_{10} .

3. RELAZIONE

La relazione sull'esecuzione del test deve contenere le seguenti informazioni:

Completa identificazione del suolo utilizzato comprendente:

- coordinate geografiche del sito (latitudine, longitudine);
- informazioni sulla storia del sito (tipo di copertura vegetale, trattamenti con prodotti fitosanitari, trattamenti con fertilizzanti, casi di contaminazione accidentale, ecc.);
- destinazione (ad es. suolo agricolo, forestale, ecc.);
- profondità del campionamento (cm);
- contenuto in sabbia/limo/argilla (% peso secco);
- pH (in acqua);
- contenuto di carbonio organico (% peso secco);
- contenuto di azoto (% peso secco);
- concentrazione iniziale di nitrati (mg di nitrati/kg peso secco);
- capacità di scambio cationico (mmol/kg);
- biomassa microbica (in termini di percentuale del carbonio organico totale);
- indicazione dei metodi utilizzati per la determinazione di ciascun parametro;
- tutte le informazioni relative al prelievo e allo stoccaggio dei campioni di suolo;
- informazioni dettagliate sulla eventuale pre-incubazione del suolo.

Sostanza di prova:

- natura fisica e (se pertinenti) proprietà fisico-chimiche;
- dati di identificazione chimica (se pertinenti), compresa la formula strutturale, la purezza (per i prodotti fitosanitari, la percentuale di ingrediente attivo), il contenuto di azoto.

Substrato:

- origine del substrato;
- composizione (farina di erba medica, farina di erba medica verde);
- contenuto di carbonio e di azoto (% peso secco);
- dimensione delle maglie del setaccio (mm).

Condizioni del test:

- informazioni dettagliate sull'ammendamento del suolo con substrato organico;
- numero di concentrazioni della sostanza chimica di prova utilizzata e, ove opportuno, giustificazione delle concentrazioni scelte;
- informazioni dettagliate sulle modalità di applicazione al suolo della sostanza di prova;
- temperatura di incubazione;
- contenuto di umidità del suolo all'inizio e nel corso del test;
- metodo di incubazione del suolo (campione globale o serie di sottocampioni);
- numero di repliche dei campioni;
- tempi di campionamento;
- metodi utilizzati per l'estrazione dei nitrati dal suolo.

Risultati:

- procedure analitiche e strumenti utilizzati per l'analisi dei nitrati;
- tabelle dei risultati, con i valori singoli ed i valori medi della misurazione dei nitrati;
- variazioni tra le differenti repliche dei campioni trattati e dei campioni controllo;
- giustificazioni delle eventuali correzioni apportate ai calcoli;
- scarto percentuale tra i tassi di formazione dei nitrati per ciascun campionamento o, se opportuno, valore CE_{50} con un intervallo di confidenza del 95 per cento, altri valori CE_x (CE_{25} o CE_{10}) con i rispettivi intervalli di confidenza e grafico della curva dose-risposta;
- trattamento statistico dei risultati;
- altre informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati.

4.

BIBLIOGRAFIA

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

- (5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality - Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality - Biological Methods*.
- (6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.
- (10) Litchfield, J.T. - Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99-113.
- (11) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (12) Finney, D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

C.22. MICRORGANISMI DEL SUOLO: TEST DI TRASFORMAZIONE DEL CARBONIO**1. METODO**

Questo metodo di prova corrisponde al TG 217 (2000) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Qui di seguito è descritto un metodo di laboratorio messo a punto per studiare i potenziali effetti a lungo termine di un'unica esposizione a prodotti fitosanitari e possibilmente ad altre sostanze chimiche sull'attività di trasformazione del carbonio ad opera dei microrganismi del suolo. Il test si basa principalmente sulle raccomandazioni dell'Organizzazione europea e mediterranea per la protezione delle piante (1), ma tiene conto anche delle linee guida formulate dal Centro federale tedesco di ricerca biologica per l'agricoltura e la silvicoltura (*Biologische Bundesanstalt für Land und Forstwirtschaft*) (2), dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente degli Stati Uniti (*Environmental Protection Agency*) (3), e dal SETAC (4). Il numero ed il tipo di suoli da utilizzare nel test sono stati concordati in occasione di un *workshop* dell'OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, svoltosi a Belgirate nel 1995 (5). Le raccomandazioni riguardanti il prelievo, la manipolazione e lo stoccaggio dei campioni di suolo si basano su linee guida ISO (6) e sulle raccomandazioni formulate dal *workshop* di Belgirate.

Per accertare e valutare le caratteristiche tossiche delle sostanze di prova può essere necessario determinare gli effetti sull'attività microbica del suolo, ad esempio quando occorre disporre di dati sui potenziali effetti collaterali dei prodotti fitosanitari sulla microflora del suolo o quando si prevede un'esposizione dei microrganismi del suolo ad altri tipi di sostanze chimiche. Il test di trasformazione del carbonio viene effettuato per determinare gli effetti di tali sostanze chimiche sulla microflora del suolo. Qualora siano testati prodotti agrochimici (ad es. fitosanitari, fertilizzanti, prodotti chimici per la silvicoltura), oltre al test di trasformazione dell'azoto si effettua anche il test di trasformazione del carbonio. Per le altre sostanze chimiche è invece sufficiente il test di trasformazione dell'azoto. Tuttavia se i valori CE_{50} riscontrati per queste sostanze nel test di trasformazione dell'azoto corrispondono a quelli degli inibitori della nitrificazione disponibili in commercio (ad es. nitrapirina), per ottenere maggiori informazioni può essere effettuato anche il test di trasformazione del carbonio.

I suoli sono costituiti da miscele eterogenee e complesse di componenti viventi e non viventi. I microrganismi svolgono un ruolo importante nella decomposizione e nella trasformazione della materia organica in suolo fertile, contribuendo in maniera differente a seconda delle specie ai vari aspetti della fertilizzazione. Eventuali interferenze con questi processi biochimici rischiano a lungo termine di influenzare il ciclo delle sostanze nutritive e di alterare la fertilità del suolo. La trasformazione del carbonio e dell'azoto avviene in tutti i suoli fertili; anche se le comunità microbiche responsabili di questi processi variano a seconda del tipo di suolo, le vie di trasformazione sono sostanzialmente le stesse.

Il metodo di prova di seguito descritto è stato concepito per individuare gli effetti nocivi a lungo termine di una data sostanza sul processo di trasformazione del carbonio nei suoli aerobici superficiali. Il test è sensibile alle variazioni di dimensione e di attività delle comunità microbiche responsabili della trasformazione del carbonio in quanto sottopone tali comunità sia ad uno stress chimico che ad una carenza di carbonio. Viene utilizzato un suolo sabbioso con un basso contenuto di materia organica, che viene trattato con la sostanza di prova ed incubato in condizioni che consentono un rapido metabolismo microbico. In tali condizioni, le fonti di carbonio prontamente disponibile nel suolo si esauriscono rapidamente. Ciò provoca una carenza di carbonio, che da un lato provoca la morte delle cellule microbiche e dall'altro induce dormienza e/o sporulazione. Se il test prosegue per più di 28 giorni, la somma di queste reazioni può essere misurata nei campioni controllo (costituiti da suolo non trattato) come perdita progressiva di biomassa microbica metabolicamente attiva (7). Se nelle condizioni di esecuzione del test la biomassa del suolo sottoposto a stress da carenza di carbonio subisce la presenza di una sostanza chimica, è possibile che essa non riesca a tornare allo stesso livello del campione controllo, per cui si può dedurre che le perturbazioni provocate dalla sostanza di prova in un qualsiasi momento del test spesso dureranno fino alla fine del test.

I test su cui si basa questo metodo di prova sono stati originariamente concepiti per sostanze di cui è possibile stimare la quantità che penetra nel suolo. È il caso, ad esempio, dei prodotti fitosanitari, la cui dose di applicazione nel terreno è conosciuta. Per i prodotti agrochimici è sufficiente utilizzare due concentrazioni di prova, corrispondenti alla dose di applicazione prevista o stimata; tali prodotti possono essere testati come ingredienti attivi (i.a.) o come prodotti formulati. Tuttavia il test non si limita alle sostanze chimiche le cui concentrazioni ambientali siano prevedibili; cambiando sia la quantità della sostanza di prova applicata al suolo sia le modalità di valutazione dei dati il test può infatti essere utilizzato anche per altre sostanze chimiche, di cui non si conosca la quantità che penetra nel suolo; in questo caso è possibile determinare gli effetti sulla trasformazione del carbonio di una serie di concentrazioni. I dati ottenuti sono utilizzati per costruire una curva dose-risposta e calcolare i valori CE_x , dove x è la percentuale di effetto.

1.2 DEFINIZIONI

Trasformazione del carbonio: degradazione ad opera dei microrganismi di materia organica, con formazione di un prodotto finale inorganico, l'anidride carbonica.

CE_x (concentrazione efficace): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione dell'*x* per cento nella trasformazione del carbonio in anidride carbonica.

CE₅₀ (concentrazione efficace media): concentrazione della sostanza di prova nel suolo che determina un'inibizione del 50 % nella trasformazione del carbonio in anidride carbonica.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Nessuna.

1.4 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Dopo la setacciatura, una parte del suolo viene trattata con la sostanza di prova mentre un'altra parte non è sottoposta ad alcun trattamento (controllo). Se il test è effettuato su prodotti agrochimici si raccomanda di utilizzare almeno due concentrazioni di prova, scelte in relazione alla massima concentrazione prevista nel terreno. Dopo 0, 7, 14 e 28 giorni di incubazione, i campioni di suolo trattati con la sostanza di prova e i campioni controllo sono miscelati con glucosio e per 12 ore consecutive vengono misurati i tassi di respirazione indotta dal glucosio, espressi in termini di anidride carbonica emessa (mg di anidride carbonica/kg di suolo peso secco/ora) o di ossigeno consumato (mg di ossigeno/kg di suolo/ora). Il tasso di respirazione medio dei campioni di suolo trattato viene comparato con quello dei campioni controllo e viene calcolata la percentuale di scarto del campione trattato rispetto al campione controllo. Tutti i test durano almeno 28 giorni. Se al ventottesimo giorno le differenze tra i campioni trattati e non trattati sono uguali o superiori al 25 %, le misurazioni continuano ad intervalli di 14 giorni fino ad un massimo di 100 giorni. Se il test è effettuato su prodotti non agrochimici, ai campioni di suolo viene aggiunta la sostanza di prova in diverse concentrazioni e dopo 28 giorni vengono misurati i tassi di respirazione indotta dal glucosio (cioè la media delle quantità di anidride carbonica prodotta o di ossigeno consumato). I risultati dei test effettuati con una serie di concentrazioni sono analizzati mediante un modello di regressione; infine vengono calcolati i valori CE_x (CE₅₀, CE₂₅ e/o CE₁₀. Cfr. in proposito le definizioni).

1.5 VALIDITÀ DEL TEST

Le analisi dei risultati del test sui prodotti agrochimici si basano su differenze relativamente modeste (valore medio \pm 25 %) tra l'anidride carbonica emessa o l'ossigeno consumato nei (o dai) campioni di suolo trattato e nei controlli, e dunque la presenza di forti variazioni tra i campioni controllo può portare a falsi risultati. Pertanto la variazione tra le diverse repliche dei campioni controllo deve essere inferiore a \pm 15 %.

1.6 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.6.1 **Apparecchiatura**

Per il test sono utilizzati contenitori di materiale chimicamente inerte, di capacità adeguata al metodo di incubazione del suolo utilizzato (ad es. in un campione globale o in una serie di campioni singoli: cfr. paragrafo 1.7.1.2). Occorre adottare le precauzioni necessarie per ridurre al minimo l'evaporazione di acqua e consentire lo scambio di gas durante il test (ad es. i contenitori utilizzati per il test possono essere coperti con un foglio di polietilene perforato). Per i test su sostanze volatili, devono essere utilizzati contenitori a chiusura ermetica e a tenuta di gas, di dimensioni tali che il campione di suolo occupi all'incirca un quarto del volume.

Per determinare i tassi di respirazione indotta dal glucosio sono necessari sistemi di incubazione e strumenti per la misurazione della produzione di anidride carbonica o del consumo di ossigeno. La letteratura scientifica citata in bibliografia riporta alcuni esempi di sistemi e strumenti utilizzabili [cfr. (8) (9) (10) (11)].

1.6.2 **Selezione e numero di suoli**

Si utilizza un unico suolo, per il quale si raccomandano le seguenti caratteristiche:

- contenuto in sabbia: non inferiore al 50 % e non superiore al 75 %;
- pH: 5.5-7.5;

- contenuto di carbonio organico: 0,5-1,5 %;
- deve essere misurata la biomassa microbica (12)(13), il cui contenuto di carbonio deve corrispondere almeno all'1 % del carbonio organico totale del suolo.

Nella maggior parte dei casi un suolo con queste caratteristiche rappresenta l'ipotesi più sfavorevole, in quanto l'adsorbimento della sostanza chimica di prova è minimo, mentre la disponibilità per la microflora è massima e dunque in genere non è necessario effettuare il test con altri suoli. Tuttavia in alcune circostanze, ad esempio quando si prevede un uso prevalente della sostanza di prova su particolari tipi di suolo (ad es. i suoli forestali acidi) o per sostanze chimiche con carica elettrostatica, può essere necessario utilizzare un suolo aggiuntivo.

1.6.3 **Prelievo e stoccaggio dei campioni di suolo**

1.6.3.1 *Prelievo*

Devono essere disponibili informazioni dettagliate sulla storia del sito di campionamento, tra cui l'esatta ubicazione, il tipo di copertura vegetale, le date dei trattamenti con prodotti fitosanitari e con fertilizzanti organici o inorganici, l'eventuale applicazione di materiali biologici ed i casi di contaminazione accidentale. Il sito scelto per il prelievo del suolo deve consentire cicli molto lunghi; sono perciò adatti i pascoli permanenti, i terreni destinati a colture cerealicole annuali (ad eccezione del granturco) o da sovescio a semina fitta. Il sito di campionamento scelto non deve essere stato sottoposto a trattamenti con prodotti fitosanitari da almeno un anno e da almeno sei mesi non devono essere stati applicati fertilizzanti organici. L'uso di fertilizzanti minerali è ammesso solo se richiesto dal tipo di coltura in atto ed in questo caso il prelievo di campioni di suolo deve essere effettuato almeno tre mesi dopo l'applicazione del fertilizzante. Bisogna evitare di utilizzare suoli trattati con fertilizzanti di cui siano noti gli effetti biocidi (ad es. calciocianamide).

Il prelievo di campioni non deve avvenire durante o subito dopo lunghi periodi (> 30 giorni) di siccità o di saturazione idrica del terreno. Nei suoli arati i campioni devono essere prelevati ad una profondità compresa tra 0 e 20 cm. Nei suoli a prato o a pascolo o in altri suoli che non vengono arati per lunghi periodi (almeno un ciclo vegetativo) la profondità massima di campionamento può essere leggermente superiore a 20 cm (ad es. fino a 25 cm). I campioni devono essere trasportati in contenitori adeguati e in condizioni di temperatura tali da garantire che le proprietà iniziali del suolo non vengano alterate in maniera significativa.

1.6.3.2 *Stoccaggio*

È preferibile l'uso di suoli appena prelevati dal terreno. Qualora non si possa evitare lo stoccaggio in laboratorio, i suoli possono essere conservati al buio ad una temperatura di 4 ± 2 °C per un massimo di tre mesi. Durante lo stoccaggio deve essere assicurato il mantenimento in condizioni aerobiche. Se i suoli vengono prelevati da zone in cui gelano per almeno tre mesi l'anno, si può prendere in considerazione lo stoccaggio per sei mesi ad una temperatura compresa tra -18 °C e -22 °C. Prima di ogni esperimento viene misurata la biomassa microbica dei suoli: il carbonio presente nella biomassa deve essere pari almeno all'1 % del contenuto di carbonio organico totale nel suolo (cfr. paragrafo 1.6.2).

1.6.4 **Manipolazione e preparazione del suolo**

1.6.4.1 *Pre-incubazione*

Se il suolo è stato stoccato (cfr. paragrafi 1.6.4.2 e 1.7.1.3), si raccomanda la pre-incubazione per un periodo compreso tra 2 e 28 giorni. Durante la pre-incubazione la temperatura e il contenuto di umidità del suolo devono essere analoghi a quelli del test (cfr. paragrafi 1.6.4.2 e 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Caratteristiche fisico-chimiche*

Dopo la rimozione manuale di particelle di grandi dimensioni (ad es. sassi, parti di piante, ecc.) il suolo viene setacciato ad umido, evitando l'eccessiva essiccazione, in modo tale che la dimensione dei granuli sia inferiore o uguale a 2 mm. Il contenuto di umidità del campione di suolo deve essere regolato con acqua distillata o deionizzata ad un valore compreso tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica.

1.6.5 **Preparazione della sostanza di prova per l'applicazione al suolo**

Normalmente la sostanza di prova è applicata utilizzando un vettore, che può essere l'acqua (per le sostanze idrosolubili) o un solido inerte come la sabbia di quarzo fine (diametro: 0,1-0,5 mm). Si deve evitare l'uso di vettori liquidi diversi dall'acqua (ad es. solventi organici come l'acetone o il cloroformio) in quanto possono danneggiare la microflora. Se il vettore utilizzato è la sabbia, quest'ultima può essere rive-

stita con la sostanza di prova, disciolta o posta in sospensione in un solvente adeguato. In questi casi il solvente deve essere eliminato per evaporazione prima della miscelazione con il suolo. Per consentire una distribuzione ottimale della sostanza di prova nel suolo, si raccomanda una proporzione di 10 g di sabbia per ogni chilogrammo di suolo (peso secco). I campioni controllo sono trattati esclusivamente con la quantità equivalente di acqua e/o di sabbia di quarzo.

Se il test viene effettuato su sostanze chimiche volatili, occorre per quanto possibile evitare dispersioni durante il trattamento e cercare di assicurare una distribuzione omogenea nel suolo (ad es. la sostanza di prova deve essere iniettata in diversi punti del suolo).

1.6.6 **Concentrazioni di prova**

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici o su altre sostanze chimiche le cui concentrazioni ambientali siano prevedibili, devono essere utilizzate almeno due concentrazioni di prova. La concentrazione più bassa deve corrispondere almeno alla quantità massima che si prevede possa effettivamente penetrare nel suolo, mentre la concentrazione più elevata deve essere un multiplo della concentrazione più bassa. Le concentrazioni della sostanza di prova aggiunte al suolo sono calcolate supponendo un'incorporazione uniforme ad una profondità di 5 cm ed una densità apparente del suolo di 1,5 g/cm³. Per i prodotti agrochimici applicati direttamente al suolo o per le sostanze chimiche di cui si può prevedere la quantità che penetra nel suolo, le concentrazioni di prova raccomandate sono la massima concentrazione ambientale prevista (PEC) ed il suo quintuplo. Le sostanze per le quali si prevedono più applicazioni al suolo nel corso di una stagione devono essere testate a concentrazioni calcolate moltiplicando la PEC per il numero massimo di applicazioni previste. Tuttavia la più alta concentrazione testata non deve superare il decuplo della dose massima di applicazione.

Se invece il test è effettuato su altri tipi di sostanze chimiche, si utilizza una serie geometrica di almeno cinque concentrazioni. Il range delle concentrazioni testate deve essere tale da consentire di determinare i valori CE_x.

1.7 ESECUZIONE DEL TEST

1.7.1 **Condizioni di esposizione**

1.7.1.1 *Trattamento e controllo*

Qualora il test sia condotto su prodotti agrochimici, il suolo viene suddiviso in tre porzioni di uguale peso. Due di esse sono miscelate con il vettore contenente la sostanza chimica, mentre la terza è miscelata soltanto con il vettore, senza aggiunta della sostanza (campione controllo). Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato sia per quelli di controllo. Nei test su altri tipi di sostanze chimiche il suolo viene suddiviso in sei porzioni di uguale peso. Cinque campioni vengono miscelati con il vettore contenente la sostanza di prova, mentre il sesto è miscelato unicamente con il vettore, senza aggiungere la sostanza chimica. Si raccomanda di utilizzare almeno tre repliche sia per i campioni di suolo trattato sia per quelli di controllo. Bisogna cercare di assicurare una distribuzione omogenea della sostanza di prova nei campioni di suolo trattati. Durante la miscelazione, bisogna evitare di compattare o di agglomerare il suolo.

1.7.1.2 *Incubazione dei campioni*

L'incubazione dei campioni di suolo può essere effettuata in due modi: utilizzando un campione globale di suolo trattato ed uno di suolo non trattato o invece una serie di sottocampioni elementari e di uguali dimensioni di suolo trattato e di suolo non trattato. Tuttavia per le sostanze volatili il test deve necessariamente essere effettuato utilizzando una serie di sottocampioni. Se si opta per l'incubazione in un campione globale, occorre preparare grandi quantità sia di suolo trattato sia di suolo non trattato e, durante il test, procedere secondo necessità al prelievo dei vari sottocampioni da analizzare. La quantità inizialmente preparata per il trattamento e i controlli dipende dalla dimensione dei sottocampioni, dal numero di repliche utilizzate per l'analisi e dal numero massimo di tempi di campionamento previsti. I suoli incubati in un campione globale devono essere accuratamente mescolati prima di procedere al prelievo di sottocampioni. Se invece i suoli sono incubati in una serie di sottocampioni, il suolo trattato e quello non trattato vengono suddivisi nel numero di sottocampioni necessario, e questi ultimi vengono utilizzati a seconda del bisogno. Negli esperimenti in cui si possono prevedere più di due tempi di campionamento deve essere preparato un numero sufficiente di sottocampioni per tener conto di tutte le repliche e di tutti i tempi di campionamento. Per il test devono essere incubate in condizioni aerobiche almeno tre repliche di campioni di suolo (cfr. paragrafo 1.7.1.1.) Durante tutti i test devono essere utilizzati appositi contenitori con uno spazio di testa sufficiente ad evitare che si sviluppino condizioni anaerobiche. Se il test è effettuato su sostanze volatili, il metodo da impiegare è necessariamente quello dei sottocampioni.

1.7.1.3 *Condizioni e durata del test*

Il test viene eseguito al buio ad una temperatura ambiente di 20 ± 2 °C. Durante il test il contenuto di umidità dei campioni deve essere mantenuto tra il 40 % ed il 60 % della capacità massima di ritenzione idrica del suolo (cfr. paragrafo 1.6.4.2), con un margine di variazione di ± 5 %. Se necessario può essere aggiunta acqua distillata e deionizzata.

La durata minima dei test è di 28 giorni. Se il test è effettuato su prodotti agrochimici, viene comparata la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato nei campioni trattati e nei controlli. Se al ventottesimo giorno la differenza è superiore al 25 %, il test prosegue fino al raggiungimento di una differenza uguale o inferiore al 25 % o per un massimo di 100 giorni. Per le sostanze diverse dai prodotti agrochimici il test termina dopo 28 giorni. Al ventottesimo giorno viene determinata la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato nei campioni trattati e in quelli di controllo e vengono calcolati i valori CE_x .

1.7.2 **Campionamento e analisi dei suoli**

1.7.2.1 *Programma di campionamento*

Se il test è condotto su prodotti agrochimici occorre analizzare i campioni di suolo per misurare i tassi di respirazione indotta dal glucosio nei giorni 0, 7, 14 e 28. Qualora la durata del test debba essere prolungata, le successive misurazioni vengono effettuate ad intervalli di 14 giorni a partire dal ventottesimo giorno.

Se il test è condotto su sostanze diverse dai prodotti agrochimici, si utilizzano almeno cinque concentrazioni di prova e l'analisi dei tassi di respirazione indotta dal glucosio viene effettuata all'inizio (giorno 0) e alla fine del periodo di esposizione (giorno 28). Se necessario si può ricorrere ad una misurazione intermedia, ad esempio il giorno 7. I dati ottenuti il ventottesimo giorno sono utilizzati per determinare il valore CE_x per la sostanza chimica. Eventualmente i dati ottenuti dai campioni controllo il giorno 0 possono essere utilizzati come misura della quantità iniziale di biomassa microbica metabolicamente attiva nel suolo (12).

1.7.2.2 *Misura dei tassi di respirazione indotta dal glucosio*

Ad ogni campionamento viene determinato il tasso di respirazione indotta dal glucosio in ciascuna replica dei campioni trattati e dei campioni controllo. I campioni di suolo vengono miscelati con una quantità di glucosio sufficiente a provocare una reazione respiratoria massima immediata. La quantità di glucosio necessaria per provocare una reazione respiratoria massima in un dato suolo può essere determinata in un test preliminare con una serie di concentrazioni della sostanza (14). Tuttavia, nel caso di suoli sabbiosi con un contenuto di carbonio organico compreso tra lo 0,5 e l'1,5 %, in genere è sufficiente una quantità di glucosio compresa tra 2 000 e 4 000 mg per chilogrammo di suolo (peso secco). Il glucosio può essere ridotto in polvere con sabbia di quarzo fine [10 g di sabbia /kg di suolo (peso secco)] e miscelato con il suolo in modo tale da assicurarne una distribuzione omogenea.

I campioni di suolo arricchiti con glucosio vengono incubati a 20 ± 2 °C in un apparecchio che consenta di misurare i tassi di respirazione in modo continuo, ogni ora, oppure ogni due ore (cfr. paragrafo 1.6.1). Per 12 ore consecutive vengono misurati l'anidride carbonica emessa o l'ossigeno consumato. Le misurazioni devono iniziare quanto prima, cioè entro 1-2 ore dall'aggiunta del glucosio. Dopo aver misurato la quantità totale di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato nel corso delle 12 ore, vengono determinati i tassi medi di respirazione.

2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Se il test è effettuato su prodotti agrochimici si registra la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato da ciascun campione replicato di suolo e si riportano in una tabella i valori medi di tutti i campioni replicati. I risultati devono essere analizzati con metodi statistici adeguati e comunemente accettati (ad es. F-test, soglia di significatività del 5 %). I tassi di respirazione indotta dal glucosio sono espressi in mg di anidride carbonica/ kg di suolo (peso secco)/ora o in mg di ossigeno/soilo (peso secco)/ora. Il tasso medio di produzione di anidride carbonica o il tasso medio di consumo di ossigeno riscontrato in ciascun campione trattato viene comparato con quello del campione controllo e viene calcolato lo scarto percentuale fra i due campioni.

Se il test è effettuato su altre sostanze chimiche, viene determinata la quantità di anidride carbonica emessa o di ossigeno consumato da ciascun campione replicato e viene costruita una curva dose-risposta per sti-

mare i valori CE_x . I tassi di respirazione indotta dal glucosio riscontrati dopo 28 giorni nei campioni trattati [espressi in mg di anidride carbonica /kg di suolo (peso secco)/ora o in mg di ossigeno/soilo (peso secco)/ora] sono comparati con quelli dei campioni controllo. I risultati vengono utilizzati per calcolare i valori percentuali di inibizione per ogni concentrazione di prova. Su un grafico si riportano le percentuali ottenute in funzione delle concentrazioni e con metodi statistici vengono calcolati i valori CE_x . Con procedure standard vengono determinati anche gli intervalli di confidenza ($p = 0.95$) dei valori CE_x (15)(16)(17).

2.2 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Nella valutazione dei risultati dei test sui prodotti agrochimici, se in un qualsiasi campionamento effettuato dopo il ventottesimo giorno la differenza tra i tassi di respirazione nel campione di suolo trattato con la concentrazione più bassa (cioè la massima concentrazione prevista) e nel campione controllo è uguale o inferiore al 25 %, si può ritenere che la sostanza testata non produce effetti a lungo termine sulla trasformazione del carbonio nel suolo. Per la valutazione dei risultati dei test su sostanze diverse dai prodotti agrochimici si utilizzano i valori CE_{50} , CE_{25} e/o CE_{10} .

3. RELAZIONE

3.1 RELAZIONE SULL'ESECUZIONE DEL TEST

La relazione sull'esecuzione del test deve contenere le seguenti informazioni:

Completa identificazione del suolo utilizzato comprendente:

- coordinate geografiche del sito (latitudine, longitudine);
- informazioni sulla storia del sito (tipo di copertura vegetale, trattamenti con prodotti fitosanitari, trattamenti con fertilizzanti, casi di contaminazione accidentale, ecc.);
- destinazione (ad es. suolo agricolo, forestale, ecc.);
- profondità del campionamento (cm);
- contenuto in sabbia/limo/argilla (% peso secco);
- pH (in acqua);
- contenuto di carbonio organico (% peso secco);
- contenuto di azoto (% peso secco);
- capacità di scambio cationico (mmol/kg);
- biomassa microbica iniziale (in termini di percentuale del carbonio organico totale);
- indicazione dei metodi utilizzati per la determinazione di ciascun parametro;
- tutte le informazioni relative al prelievo e allo stoccaggio dei campioni di suolo;
- informazioni dettagliate sulla eventuale pre-incubazione del suolo.

Sostanza di prova:

- natura fisica e (se pertinenti) proprietà fisico-chimiche;
- dati di identificazione chimica (se pertinenti), compresa la formula strutturale, la purezza (per i prodotti fitosanitari, la percentuale di ingrediente attivo), il contenuto di azoto.

Condizioni del test:

- informazioni dettagliate sull'ammendamento del suolo con substrato organico;
- numero di concentrazioni della sostanza chimica di prova utilizzata e, ove opportuno, giustificazione delle concentrazioni scelte;

- informazioni dettagliate sulle modalità di applicazione al suolo della sostanza di prova;
- temperatura di incubazione;
- contenuto di umidità del suolo all'inizio e nel corso del test;
- metodo di incubazione del suolo utilizzato (campione globale o serie di sottocampioni);
- numero di repliche dei campioni;
- tempi di campionamento.

Risultati:

- metodo e strumenti utilizzati per misurare i tassi di respirazione;
- tabelle dei risultati, con i valori singoli e i valori medi delle quantità di anidride carbonica o di ossigeno;
- variazioni tra le differenti repliche dei campioni trattati e dei campioni controllo;
- giustificazioni delle eventuali correzioni apportate ai calcoli;
- scarto percentuale tra i tassi di respirazione indotta dal glucosio registrati in ciascun campionamento o, se del caso, valore CE_{50} con un intervallo di confidenza del 95 %, altri valori CE_x (CE_{25} o CE_{10}) con i rispettivi intervalli di confidenza e grafico della curva dose-risposta;
- trattamento statistico dei risultati, ove opportuno;
- altre informazioni e osservazioni utili per l'interpretazione dei risultati.

4.

BIBLIOGRAFIA

- (1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.
- (2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).
- (3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.
- (4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.
- (5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality - Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in "Pesticide Effects on Soil Microflora". Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45-60.
- (8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in "Methods of Soil Analysis - Part 2: Chemical and Microbiological Properties". Agronomy Monograph N° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831-871.
- (9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality - Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.
- (10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality - Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

- (11) Heinemeyer O., Insam, H., Kaiser, E.A, Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116: 77-81.
- (12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method.
- (13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.
- (14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig*, 38: 113-120.
- (15) Litchfield, J.T. - Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99-113.
- (16) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.
- (17) Finney D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

C.23. TRASFORMAZIONE AEROBICA E ANAEROBICA NEL SUOLO

1. METODO

Questo metodo corrisponde al TG 307 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Il presente metodo di test è basato sulle linee guida esistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9). Il metodo descritto è progettato per determinare la trasformazione aerobica ed anaerobica delle sostanze chimiche nel suolo. Gli esperimenti eseguiti hanno l'obiettivo di determinare (i) la velocità di trasformazione della sostanza di prova e (ii) la natura e la velocità di formazione e di diminuzione dei prodotti di trasformazione ai quali possono essere esposti piante ed organismi del suolo. Tali studi sono necessari per le sostanze chimiche che vengono applicate direttamente sul suolo o che abbiano probabilità di raggiungere l'ambiente del suolo. I risultati di questi studi di laboratorio possono essere utilizzati anche per sviluppare protocolli di campionamento e di analisi per studi correlati sul campo.

Per la valutazione delle vie di trasformazione sono in genere sufficienti gli studi aerobici ed anaerobici con un solo tipo di suolo (8)(10)(11). I tassi di trasformazione vanno determinati in almeno altri tre suoli (8)(10).

Un workshop dell'OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, tenutosi a Belgirate nel 1995 (10), ha definito, in particolare, il numero e i tipi di suoli da usarsi in questo test. I tipi di suoli esaminati devono essere rappresentativi delle condizioni ambientali in cui la sostanza verrà usata o rilasciata. Per esempio, le sostanze chimiche che potrebbero essere rilasciate in climi subtropicali e tropicali vanno testate utilizzando Ferrasols o Nitosols (sistema FAO). Il workshop ha inoltre espresso raccomandazioni circa la raccolta, la manipolazione e la conservazione dei campioni, sulla base delle linee guida ISO (15). Questo metodo prevede anche l'uso di suoli per risaia.

1.2 DEFINIZIONI

Sostanza di prova: qualsiasi sostanza, sia un composto progenitore che i relativi prodotti di trasformazione.

Prodotti di trasformazione: tutte le sostanze derivanti da reazioni di trasformazione biotica o abiotica della sostanza di prova, compresi CO₂ e i prodotti che si trovano in residui non estraibili.

Residui non estraibili: i "residui non estraibili" sono sostanze nel suolo, nelle piante o negli animali, che dopo estrazione persistono nella matrice sotto forma di sostanza progenitrice o dei suoi metaboliti o prodotti di trasformazione. Il metodo di estrazione non deve alterare in modo considerevole le sostanze stesse o la struttura della matrice. La natura del legame può essere in parte chiarita mediante metodi di estrazione che alterano la matrice e sofisticate tecniche analitiche. Fino ad oggi, ad esempio, in questo modo sono stati identificati i legami ionici covalenti e di assorbimento/adsorbimento, oltre alle catture. In generale, la formazione di residui non estraibili riduce significativamente la bioaccessibilità e la biodisponibilità (12) [modificato da IUPAC 1984 (13)].

Trasformazione aerobica: reazioni che hanno luogo in presenza di ossigeno molecolare (14).

Trasformazione anaerobica: reazioni che hanno luogo in assenza di ossigeno molecolare (14).

Suolo: miscela di costituenti chimici organici e inorganici (questi ultimi contengono sostanze ad elevato contenuto di carbonio e azoto e di elevato peso molecolare), contenente organismi vitali di piccole dimensioni (soprattutto microrganismi). Il suolo può essere manipolato in due stati:

- (a) indisturbato, come si è sviluppato nel tempo, in strati caratteristici di diversi tipi di suolo;
- (b) disturbato, come si trova generalmente nei campi arabili o come si riscontra quando ne vengono prelevati campioni mediante scavo, che vengono utilizzati in questo metodo di test (14).

Mineralizzazione: completa degradazione di un composto organico in CO₂ e H₂O in condizioni aerobiche, e in CH₄, CO₂ e H₂O in condizioni anaerobiche. Nel contesto del presente metodo di test, quando si

utilizza una sostanza marcata al ^{14}C , per mineralizzazione si intende una prolungata degradazione durante la quale un atomo di carbonio marcato viene ossidato con rilascio della corretta quantità di $^{14}\text{CO}_2$ (14).

Tempo di dimezzamento: $t_{0,5}$, è il tempo necessario per una trasformazione del 50 % di una sostanza di prova, quando la trasformazione può essere descritta mediante cinetica di primo ordine; è indipendente dalla concentrazione.

DT₅₀ (Tempo di scomparsa 50): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 50 %; è diverso dal tempo di dimezzamento $t_{0,5}$ quando la trasformazione non segue la cinetica di primo ordine.

DT₇₅ (Tempo di scomparsa 75): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 75 %.

DT₉₀ (Tempo di scomparsa 90): tempo entro cui la concentrazione della sostanza di prova si riduce del 90 %.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Per la caratterizzazione e/o l'identificazione dei prodotti di trasformazione mediante metodi spettroscopici e cromatografici si utilizzano sostanze di riferimento.

1.4 APPLICABILITÀ DEL TEST

Il metodo è applicabile a tutte le sostanze chimiche (non marcate o radiomarcate) per le quali è disponibile un metodo analitico sufficientemente accurato e sensibile. È applicabile a sostanze lievemente volatili, non volatili, idrosolubili e non idrosolubili. Il test non va applicato a sostanze chimiche altamente volatili dal suolo (ad es. fumiganti, solventi organici) che non possono essere tenute all'interno del suolo nelle condizioni sperimentali necessarie per questo test.

1.5 INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Per misurare la velocità di trasformazione è possibile usare una sostanza di prova non marcata o marcata. Il materiale marcato è necessario per lo studio della via di trasformazione e per definire un bilancio di massa. Si raccomanda la marcatura con ^{14}C , sebbene possa essere utile anche l'uso di altri isotopi, quali ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P . Per quanto possibile, la marcatura va applicata alla parte o alle parti più stabili della molecola ⁽¹⁾. La purezza della sostanza di prova deve essere almeno del 95 %.

Prima di eseguire un test sulla trasformazione aerobica ed anaerobica nel suolo, devono essere disponibili le seguenti informazioni sulla sostanza di prova:

- (a) solubilità in acqua (Metodo A.6)
- (b) solubilità in solventi organici;
- (c) tensione di vapore (Metodo A.4) e costante della legge di Henry;
- (d) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (Metodo A.8);
- (e) stabilità chimica al buio (idrolisi) (Metodo C.7);
- (f) pK_a se una molecola è soggetta a protonazione o deprotonazione [Linee guida OCSEb 112] (16).

Altre informazioni utili possono essere costituite da dati sulla tossicità della sostanza di prova per i microrganismi del suolo [Metodi di test C.21 e C.22] (16).

Dovrebbero essere disponibili metodi analitici (compresi metodi per l'estrazione e di depurazione) per la quantificazione e l'identificazione della sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione.

⁽¹⁾ Per esempio, se la sostanza di prova contiene un solo anello, è necessario marcare tale anello; se la sostanza contiene due anelli o più, possono risultare necessari studi separati per valutare il destino di ciascun anello marcato e per ottenere informazioni adeguate sulla formazione dei prodotti di trasformazione.

1.6 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

I campioni di suolo vengono trattati con la sostanza di prova e incubati al buio in contenitori per biometria o in sistemi a flusso continuo in condizioni controllate di laboratorio (a temperatura e umidità costante del suolo). Dopo adeguati intervalli di tempo, i campioni di suolo vanno estratti e analizzati alla ricerca della sostanza progenitrice e dei prodotti di trasformazione. Mediante adeguati dispositivi di assorbimento vengono raccolti anche i prodotti volatili e sottoposti ad analisi. Impiegando materiale ^{14}C -marcato è possibile misurare i tassi di mineralizzazione della sostanza di prova intercettando il $^{14}\text{CO}_2$ evoluto e determinare un bilancio di massa, compresa la formazione di residui non estraibili.

1.7 CRITERI DI QUALITÀ

1.7.1 **Recupero**

L'estrazione e l'analisi di campioni di suolo almeno duplicati, immediatamente dopo l'aggiunta della sostanza di prova, forniscono una prima indicazione della ripetibilità del metodo analitico e dell'uniformità della procedura di applicazione per la sostanza di prova. Le percentuali di recupero per le fasi successive degli esperimenti sono determinate dai rispettivi bilanci di massa e dovrebbero essere comprese tra 90 % e 110 % per le sostanze chimiche marcate (8) e tra 70 % e 110 % per le sostanze chimiche non marcate (3).

1.7.2 **Ripetibilità e sensibilità del metodo di analisi**

La ripetibilità del metodo di analisi (esclusa l'efficienza di estrazione iniziale) per quantificare la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione può essere controllata duplicando l'analisi dello stesso estratto di suolo, incubato sufficientemente a lungo perché si formino prodotti di trasformazione.

Il limite di rivelabilità del metodo di analisi per la sostanza di prova e per i prodotti di trasformazione deve essere di almeno $0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ di suolo (come sostanza di prova) o dell'1 % della dose applicata (scegliere il dato inferiore). Il limite di quantificazione va anch'esso specificato.

1.7.3 **Accuratezza dei dati sulla trasformazione**

L'analisi di regressione delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo fornisce dati adeguati circa l'affidabilità della curva di trasformazione e consente di calcolare gli intervalli di confidenza per i tempi di dimezzamento (in caso di cinetica di pseudo primo ordine) o i valori DT_{50} e, se del caso, DT_{75} e DT_{90} .

1.8 DESCRIZIONE DEL METODO DI PROVA

1.8.1 **Apparecchiature e reagenti chimici**

I sistemi di incubazione sono costituiti da sistemi statici chiusi o adeguati sistemi a flusso continuo (7)(17). Le figure 1 e 2 mostrano rispettivamente esempi di apparecchi di flusso adatti all'incubazione del suolo e contenitori per biometria. Entrambi i tipi di sistemi di incubazione presentano vantaggi e limiti (7)(17).

È necessario disporre di un'attrezzatura standard da laboratorio, e in particolare:

- strumentazione analitica quale apparecchi per GLC, HPLC, TLC, compresi adeguati sistemi di rilevazione per l'analisi di sostanze radiomarcate e non radiomarcate, o il metodo di diluizione isotopica inversa;
- strumenti di identificazione (ad esempio. MS, GC-MS, HPLC-MS, RMN, ecc.);
- rivelatore a scintillazione a liquido;
- ossidatore per la combustione del materiale radioattivo;
- centrifuga;

- apparecchio per l'estrazione (per esempio tubi da centrifuga per l'estrazione a freddo ed estrattore di Soxhlet per l'estrazione continua sotto riflusso);
- strumentazione per la concentrazione di soluzioni ed estratti (ad es. evaporatore a rotazione);
- bagnomaria;
- apparecchio per miscelatura meccanica (ad es. impastatrice, miscelatore a rotazione).

I reagenti chimici usati sono, ad esempio:

- NaOH, grado analitico, $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, o un'altra base adeguata (ad es. KOH, etanolamina);
- H_2SO_4 , grado analitico, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$;
- glicole etilenico, grado analitico;
- materiali assorbenti solidi, quali calce sodata e tappi in poliuretano;
- solventi organici, grado analitico, quali acetone, metanolo, ecc.;
- liquido per scintillazione.

1.8.2 Applicazione della sostanza di prova

Per introdurre e distribuire la sostanza di prova nel suolo la si può sciogliere in acqua (distillata o deionizzata) o, se necessario, in minime quantità di acetone o di altri solventi organici (6) nei quali la sostanza di prova sia sufficientemente solubile e stabile. La quantità di solvente scelto non deve però esercitare un'influenza significativa sull'attività microbica del suolo (vedi sezioni 1.5 e 1.9.2-1.9.3). Va evitato l'impiego di solventi che inibiscono l'attività microbica, quali il cloroformio, il diclorometano e altri solventi alogenati.

La sostanza di prova può essere aggiunta anche in forma solida, ad es. mista a sabbia quarzosa (6) o in un piccolo sottocampione del suolo sperimentale che sia stato asciugato all'aria e sterilizzato. Se la sostanza di prova viene aggiunta con l'ausilio di un solvente, occorre permettere al solvente di evaporare prima di aggiungere il sottocampione arricchito al campione di suolo originale non sterile.

Per le sostanze chimiche generiche, che entrano nel suolo soprattutto attraverso i fanghi delle acque di scarico e le pratiche agricole, la sostanza di prova va prima aggiunta al fango, che viene poi introdotto nel campione di suolo (vedi sezioni 1.9.2 e 1.9.3).

Di norma non si consiglia l'impiego di prodotti formulati, che possono però costituire una valida alternativa, ad esempio, per le sostanze di prova scarsamente solubili.

1.8.3 Suoli

1.8.3.1 Selezione del suolo

Per determinare la via di trasformazione è possibile usare un suolo rappresentativo; è consigliabile impiegare un limo sabbioso, un limo fangoso, un limo glaciale o una sabbia limosa [secondo la classificazione FAO e USDA (18)] con un pH di 5,5-8,0, un contenuto di carbonio organico dello 0,5-2,5 % e una biomassa microbica pari ad almeno l'1 % del carbonio organico totale (10).

Per gli studi dei tassi di trasformazione occorre usare almeno tre suoli aggiuntivi che rappresentino una gamma di suoli attinenti. I suoli devono differire tra loro in quanto a contenuto di carbonio organico, pH, contenuto di argilla e biomassa microbica (10).

Tutti i suoli devono essere caratterizzati per lo meno per quanto concerne struttura (% di sabbia, % di limo, % di argilla) [secondo la classificazione FAO e USDA (18)], pH, capacità di scambio dei cationi, carbonio organico, peso specifico apparente, caratteristiche di ritenzione idrica ⁽²⁾ e biomassa microbica (solo per gli studi aerobici). Per l'interpretazione dei risultati possono essere utili ulteriori informazioni sulle proprietà

⁽²⁾ La caratteristica della ritenzione idrica di un suolo può essere misurata come capacità di campo, come capacità idrica di ritenuta o come tensione di aspirazione dell'acqua (pF). Per le spiegazioni, cfr. l'allegato 1. Nella relazione è necessario riferire se le caratteristiche di ritenzione idrica e il peso specifico apparente dei suoli sono stati determinati in campioni di campi indisturbati o in campioni disturbati (lavorati).

del suolo. Per determinare le caratteristiche del suolo è possibile usare i metodi raccomandati nelle voci bibliografiche (19)(20)(21)(22)(23). La biomassa microbica va determinata utilizzando il metodo della respirazione indotta dal substrato (25)(26) o metodi alternativi (20).

1.8.3.2 *Raccolta, manipolazione e conservazione dei suoli*

Occorre fornire possibilmente informazioni dettagliate circa la storia del sito da cui è stato raccolto il suolo per il test. Tali dettagli comprendono il luogo esatto, la copertura vegetale, i trattamenti con sostanze chimiche, i trattamenti con fertilizzanti organici e inorganici, l'aggiunta di materiali biologici e altri tipi di contaminazione. I suoli trattati con la sostanza di prova o con i suoi analoghi strutturali nei precedenti quattro anni non vanno usati per gli studi sulla trasformazione (10)(15).

Il suolo deve essere raccolto di fresco sul campo (dall'orizzonte A o dallo strato superficiale di 20 cm) ad un tasso di umidità tale da facilitarne la setacciatura. Per suoli diversi da quelli provenienti dalle risaie, occorre evitare la raccolta di campioni durante o immediatamente dopo lunghi periodi (> 30 giorni) di siccità, gelo o inondazione (14). I campioni vanno trasportati in modo da ridurre al minimo l'alterazione del tasso di umidità del suolo e vanno tenuti al buio ma, per quanto possibile, con libero passaggio dell'aria. A tale scopo risulta generalmente adeguata una busta di polietilene con l'apertura allentata.

Il suolo deve essere trattato appena possibile dopo il campionamento. Occorre asportare la vegetazione, la fauna di maggiori dimensioni e le pietre, prima di passare il suolo attraverso un setaccio di 2 mm che rimuova le pietre, la fauna e i detriti delle piante di piccole dimensioni. Occorre evitare di essiccare e rompere eccessivamente il suolo prima della setacciatura (15).

Quando in inverno il campionamento sul campo risulta difficoltoso (suolo gelato o coperto da strati di neve), il campione può essere prelevato da un lotto di suolo conservato in serra sotto copertura vegetale (ad es. erba o miscugli erba-trifoglio). Sono di gran lunga preferibili gli studi con suoli appena raccolti dal campo, ma dovendo conservare il suolo raccolto e trattato prima di poter avviare lo studio, le condizioni di conservazione devono essere adeguate e limitate nel tempo (4 ± 2 °C per un massimo di tre mesi) per mantenere l'attività microbica ⁽³⁾. Istruzioni dettagliate circa la raccolta, la manipolazione e la conservazione dei suoli da usarsi per gli esperimenti di biotrasformazione sono reperibili in (8)(10)(15)(26)(27).

Prima che il suolo trattato venga usato per questo test, deve essere pre-incubato per consentire la germinazione e la rimozione dei semi, e per ristabilire l'equilibrio del metabolismo microbico successivamente al passaggio dalle condizioni di campionamento o conservazione alle condizioni di incubazione. Generalmente è ritenuto adeguato un periodo di pre-incubazione di 2-28 giorni in cui ci si avvicina alle condizioni di temperatura e umidità del test vero e proprio (15). Il tempo di conservazione e di pre-incubazione non deve superare complessivamente i tre mesi.

1.9 ESECUZIONE DEL TEST

1.9.1 **Condizioni**

1.9.1.1 *Temperatura*

Durante tutto il periodo del test, i suoli vanno incubati al buio a una temperatura costante rappresentativa delle condizioni climatiche del luogo in cui verranno usati o rilasciati. Una temperatura di 20 ± 2 °C è consigliata per tutte le sostanze sperimentali che possono raggiungere il suolo in climi temperati. La temperatura va monitorata.

Per le sostanze chimiche applicate o rilasciate in climi più freddi (ad es. nei paesi settentrionali, durante il periodo autunnale o invernale), occorre incubare anche altri campioni di suolo a una temperatura inferiore (ad es. 10 ± 2 °C).

⁽³⁾ I risultati di recenti ricerche indicano che i suoli delle zone temperate possono essere conservati anche a -20 °C per oltre tre mesi (28)(29) senza perdita significativa dell'attività microbica.

1.9.1.2 *Tenore di umidità*

Per i test di trasformazione in condizioni aerobiche, il tenore di umidità del suolo ⁽⁴⁾ deve essere regolato e mantenuto a un pF compreso fra 2,0 e 2,5 (3). Il tenore di umidità del suolo si esprime come massa di acqua per massa di suolo secco e va controllato regolarmente (ad es. a intervalli di 2 settimane) mediante pesatura dei contenitori di incubazione; eventuali perdite di acqua vanno compensate con un'aggiunta di acqua (preferibilmente acqua corrente filtrata in condizioni sterili). Nel fare questo occorre prestare attenzione in modo da prevenire o ridurre al minimo le perdite di sostanza di prova e/o dei prodotti di trasformazione per volatilizzazione e/o fotodegradazione.

Per i test di trasformazione in condizioni anaerobiche e in risaia, il suolo va saturato di acqua mediante inondazione.

1.9.1.3 *Condizioni aerobiche di incubazione*

Nei sistemi a flusso continuo le condizioni aerobiche sono mantenute mediante afflusso intermittente o ventilazione continua con aria umidificata. Nei contenitori per studi biometrici, lo scambio dell'aria viene mantenuto per diffusione.

1.9.1.4 *Condizioni aerobiche sterili*

Per ottenere informazioni sulla rilevanza della trasformazione abiotica di una sostanza di prova, i campioni di suolo possono essere sterilizzati (per i metodi di sterilizzazione, cfr. i riferimenti bibliografici 16 e 29), trattati con sostanza di prova sterile (ad es. aggiunta di soluzione attraverso un filtro sterile) e aerati con aria sterile umidificata come descritto nella sezione 1.9.1.3. Per i terreni da risaia, suolo e acqua vanno sterilizzati e l'incubazione va effettuata come descritto nella sezione 1.9.1.6.

1.9.1.5 *Condizioni anaerobiche di incubazione*

Per ottenere e mantenere condizioni anaerobiche, il suolo trattato con la sostanza di prova e incubato in condizioni aerobiche per 30 giorni o un tempo di dimezzamento o DT_{50} (il tempo più breve) viene successivamente impregnato d'acqua (strato di acqua di 1-3 cm) e il sistema di incubazione viene sommerso con un gas inerte (ad es. azoto o argon) ⁽⁵⁾. Il sistema di prova deve consentire di effettuare anche misurazioni ad es. del pH, della concentrazione di ossigeno e del potenziale di ossidoriduzione e comprendere dispositivi di cattura dei prodotti volatili. Il sistema a biometro deve essere chiuso in modo da evitare l'ingresso di aria per diffusione.

1.9.1.6 *Condizioni di incubazione in risaia*

Per studiare la trasformazione nei suoli allagati da risaia, il suolo viene allagato con uno strato di acqua di circa 1-5 cm e la sostanza di prova viene applicata alla fase acquosa (9). Si raccomanda che il suolo sia profondo almeno 5 cm. Il sistema è ventilato con aria in condizioni aerobiche. pH, concentrazione di ossigeno e potenziale di ossidoriduzione dello strato acquoso vanno monitorati e indicati nella relazione. Prima di iniziare gli studi sulla trasformazione il suolo va tenuto in pre-incubazione per almeno due settimane (cfr. sezione 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Durata del test*

Gli studi sulla velocità e la via di trasmissione non dovrebbero di norma superare i 120 giorni ⁽⁶⁾ (3)(6)(8), poiché, superato questo lasso di tempo, è molto probabile che in un sistema artificiale di laboratorio, isolato dalla naturale ricostituzione, si verifichi una riduzione dell'attività microbica. Se necessario, per caratterizzare la diminuzione della sostanza di prova e la formazione e la diminuzione dei principali prodotti di trasformazione, è possibile continuare gli studi per periodi più lunghi (ad es. 6 o 12 mesi) (8). In caso di prolungamento dei tempi di incubazione occorre dare motivazione nella relazione, aggiungendo i dati delle misurazioni della biomassa durante e alla fine dei periodi di incubazione.

⁽⁴⁾ Per areare e nutrire adeguatamente la microflora del suolo, il suolo non deve essere né troppo umido né troppo secco. I tenori di umidità raccomandati per una crescita microbica ottimale sono compresi fra il 40 e il 60 % della capacità idrica di ritenuta e fra 0,1 e 0,33 bar (6). Quest'ultima gamma di valori equivale a una gamma pF di 2,0-2,5. Nell'allegato 2 sono indicati i tenori di umidità tipici di vari tipi di suoli.

⁽⁵⁾ Le condizioni aerobiche sono dominanti nei suoli superficiali e anche negli strati sotto la superficie, come dimostrato dal progetto di ricerca sponsorizzato dall'UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Condizioni anaerobiche possono verificarsi solo occasionalmente durante l'inondazione dei suoli dopo forti piogge o quando le risaie vengono sommerse.

⁽⁶⁾ Gli studi aerobici possono essere conclusi molto prima di 120 giorni, a condizione che al momento della conclusione siano state raggiunte con certezza la via definitiva di trasformazione e la massima mineralizzazione. È possibile concludere il test dopo 120 giorni o quando almeno il 90 % della sostanza di prova è trasformata, ma solo se si è formato almeno il 5 % di CO₂.

1.9.2 Esecuzione del test

In ciascun contenitore per incubazione si sistemano circa 50-200 g di suolo (peso a secco) (cfr. figure 1 e 2 nell'allegato 3), che viene trattato con la sostanza di prova utilizzando uno dei metodi descritti nella sezione 1.8.2. Se si impiegano solventi organici per l'applicazione della sostanza di prova, è necessario eliminarli dal suolo per evaporazione. Il suolo va poi miscelato accuratamente con una spatola e/o scuotendo il contenitore. Se si conduce lo studio in condizioni di risaia, occorre miscelare accuratamente acqua e suolo dopo l'applicazione della sostanza di prova. Allo scopo di controllare la distribuzione uniforme della sostanza di prova, questa va ricercata analizzando piccole quantità (ad es. 1 g) dei suoli trattati. Per un metodo alternativo, cfr. sotto.

Il tasso di concentrazione delle sostanze per il trattamento deve corrispondere al tasso più elevato di applicazione di un prodotto fitosanitario indicato nelle istruzioni per l'uso e con incorporazione uniforme a una profondità adeguata nel terreno del campo (ad es. strato superficiale di 10 cm ⁽⁷⁾ di suolo). Per esempio, per le sostanze chimiche da applicare sul fogliame o sul suolo senza incorporazione, la profondità corretta per calcolare quanta sostanza chimica occorre aggiungere a ciascun contenitore è 2,5 cm. Per le sostanze chimiche da incorporare nel suolo, la profondità corretta è la profondità di incorporazione specificata nelle istruzioni per l'uso. Per le sostanze chimiche generiche, il tasso di applicazione va calcolato sulla base della via di somministrazione più rilevante; per esempio, quando la principale via di somministrazione nel suolo sono i fanghi di acque reflue, la sostanza chimica va dosata nel fango ad una concentrazione che rispecchi il normale carico di fanghi nei suoli agricoli. Se tale concentrazione non è sufficientemente elevata per identificare i principali prodotti di trasformazione, può essere utile l'incubazione di campioni di suolo separati con tenore più elevato, ma è importante evitare di eccedere nelle quantità per non avere reazioni che influiscono sulle funzioni microbiche (cfr. sezioni 1.5 e 1.8.2).

In alternativa è possibile trattare con la sostanza di prova un lotto più esteso (ad es. di 1-2 kg), accuratamente mescolato in un miscelatore adeguato e poi diviso in porzioni più piccole di 50-200 g nei contenitori per l'incubazione (per esempio usando inquantatori di campioni). Allo scopo di controllare la distribuzione uniforme della sostanza di prova, questa va ricercata analizzando piccole quantità (ad es. 1 g) del lotto di suolo trattato. Una procedura di questo tipo è preferibile, in quanto consente una distribuzione più uniforme della sostanza di prova nel suolo.

Anche i campioni di suolo non trattati vengono incubati nelle stesse condizioni (aerobiche) dei campioni trattati con la sostanza di prova. Tali campioni sono usati per le misurazioni della biomassa durante e alla fine degli studi.

Quando la sostanza di prova viene applicata al suolo disciolta in uno o più solventi organici, occorre incubare anche campioni di suolo trattati con la stessa quantità di solvente/i mantenendo le stesse condizioni (aerobiche) utilizzate per i campioni trattati con la sostanza di prova. I campioni trattati vengono usati per le misurazioni della biomassa all'inizio, durante e alla fine degli studi per controllare gli eventuali effetti del/i solvente/i sulla biomassa microbica.

I contenitori con il suolo trattato vengono collegati al sistema a flusso continuo descritto nella figura 1 o chiusi con la colonna di assorbimento di cui alla figura 2 (cfr. allegato 3).

1.9.3 Campionamento e misurazione

I contenitori doppi per l'incubazione vengono rimossi ad opportuni intervalli di tempo per estrarre i campioni di suolo con solventi appropriati di diversa polarità che vengono poi analizzati alla ricerca della sostanza di prova e/o di prodotti di trasformazione. Uno studio ben disegnato prevede un numero sufficiente di contenitori per consentire di sacrificare due contenitori durante ciascun campionamento. Inoltre, le soluzioni di assorbimento o i materiali solidi di assorbimento vengono rimossi a vari intervalli di tempo (intervalli di 7 giorni durante il primo mese e, successivamente, a intervalli di 17 giorni) durante e alla fine dell'incubazione di ciascun campione e analizzati alla ricerca di prodotti volatili. Oltre a un campione di suolo prelevato subito dopo l'applicazione (campione del giorno 0) occorre prevedere almeno altri 5

⁽⁷⁾ Calcolo della concentrazione iniziale su una base d'area usando la seguente equazione:

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

C_{soil} = concentrazione iniziale nel suolo [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

A = tasso di applicazione [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]; l = spessore dello strato di suolo nel campo [m]; d = peso specifico apparente secco del suolo [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$].

Di massima, con un tasso di applicazione di $1 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ si ottiene una concentrazione nel suolo di circa $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in uno strato di 10 cm (presupponendo un peso specifico apparente di $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

momenti di campionamento. Gli intervalli di tempo vanno scelti in modo da poter stabilire una costante di diminuzione della sostanza di prova e costanti di formazione e diminuzione dei prodotti di trasformazione (ad es. giorni 0, 1, 3, 7; settimane 2, 3; mesi 1, 2, 3, ecc.).

Quando si utilizza una sostanza di prova ^{14}C -marcata, la radioattività non estraibile verrà quantificata per combustione e per ogni intervallo di campionamento verrà calcolato un bilancio di massa.

Nel caso di incubazione anaerobica e in risaia, le fasi di suolo e d'acqua vengono analizzate insieme per ricercare la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione, oppure separate per filtrazione o centrifugazione prima dell'estrazione e dell'analisi.

1.9.4 Test opzionali

Studi aerobici, non sterili, ad altre temperature e diverse concentrazioni di umidità del suolo possono risultare utili per stimare gli effetti della temperatura e dell'umidità del suolo sulla velocità di trasformazione di una sostanza di prova e/o dei suoi prodotti di trasformazione nel suolo.

È possibile tentare un'ulteriore caratterizzazione della radioattività non estraibile usando, ad esempio, l'estrazione fluida supercritica.

2. DATI

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Le quantità delle sostanze di prova, dei prodotti di trasformazione e delle sostanze volatili (solo in %) e non estraibili vanno indicate come % della concentrazione iniziale applicata e, ove pertinente, in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ di suolo (in base al peso secco del suolo) per ciascun intervallo di campionamento. È necessario indicare in percentuale l'equilibrio di massa della concentrazione iniziale applicata per ciascun intervallo di campionamento. La presentazione grafica delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo consentirà una stima del suo tempo di dimezzamento o DT_{50} di trasformazione. È inoltre necessario identificare i principali prodotti di trasformazione, rappresentandone graficamente le concentrazioni in funzione del tempo per evidenziarne la velocità di formazione e di diminuzione. Per principale prodotto di trasformazione si intende qualsiasi prodotto che rappresenti $\geq 10\%$ della dose applicata in qualsiasi momento nel corso dello studio.

I prodotti volatili intrappolati forniscono una certa indicazione del potenziale di volatilità di una sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione dal suolo.

È possibile calcolare in modo più accurato i tempi di dimezzamento o i valori DT_{50} e, se pertinente, i valori DT_{75} e DT_{90} utilizzando adeguati modelli cinetici. Il tempo di dimezzamento e i valori DT_{50} vanno riportati nella relazione insieme alla descrizione del modello usato, dell'ordine della cinetica e del coefficiente di determinazione (r^2). Si preferisce la cinetica di primo ordine, a meno che $r^2 < 0.7$. Se del caso, i calcoli vanno applicati anche ai principali prodotti di trasformazione. Nei riferimenti bibliografici da 31 a 35 sono descritti esempi di modelli adeguati.

Nel caso di studi sulla velocità eseguiti a diverse temperature, le velocità di trasformazione vanno descritte come funzione della temperatura all'interno della gamma di temperature sperimentali, usando il rapporto di Arrhenius della formula:

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

dove $\ln A$ e B sono costanti di regressione, rispettivamente, dall'intercetta e dalla pendenza di una retta best fit generata dalla regressione lineare di $\ln k$ rispetto a $1/T$, k è la velocità costante alla temperatura T e T è la temperatura in Kelvin. Occorre prestare attenzione alla gamma limitata di temperature in cui il rapporto di Arrhenius sarà valido nel caso la trasformazione sia governata dall'azione microbica.

2.2 VALUTAZIONE E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Sebbene gli studi vengano eseguiti in un sistema artificiale di laboratorio, i risultati consentiranno di stimare la velocità di trasformazione della sostanza di prova, oltre che il tasso di formazione e diminuzione dei prodotti di trasformazione in condizioni paragonabili a quelle di campo (36)(37).

Lo studio della via di trasformazione di una sostanza di prova fornisce informazioni sul modo in cui la sostanza applicata viene modificata strutturalmente nel suolo da reazioni chimiche e microbiche.

3. RELAZIONE

3.1 RELAZIONE SULLESECUZIONE DEL TEST

La relazione sull'esecuzione del test deve contenere le seguenti informazioni specifiche:

Sostanza di prova:

- denominazione comune, nome chimico, numero CAS, formula di struttura (indicante la(e) posizione(i) della(e) marcatura(e) quando si utilizza materiale radiomarcato) e proprietà fisico-chimiche pertinenti (cfr. sezione 1.5);
- purezza (impurità) della sostanza di prova;
- purezza radiochimica della sostanza chimica marcata e attività specifica (ove pertinente).

Sostanze di riferimento:

- nome chimico e struttura delle sostanze di riferimento usate per la caratterizzazione e/o l'identificazione dei prodotti di trasformazione.

Suoli sperimentali:

- particolari riguardanti il sito di raccolta;
- data e procedura di campionamento dei suoli;
- proprietà dei suoli, quali pH, contenuto di carbonio organico, tessitura (% sabbia, % limo, % argilla), capacità di scambio dei cationi, peso specifico apparente, caratteristiche di ritenzione idrica e biomassa microbica;
- durata della conservazione del suolo e condizioni di conservazione (se pertinente).

Condizioni del test:

- date di esecuzione degli studi;
- quantità di sostanza di prova applicata;
- solventi usati e metodo di applicazione per la sostanza di prova;
- peso del suolo trattato inizialmente e campionato a ciascun intervallo per essere analizzato;
- descrizione del sistema di incubazione;
- tassi di flusso dell'aria (solo per i sistemi a flusso continuo);
- temperatura dell'ambiente sperimentale;
- tasso di umidità del suolo durante l'incubazione;
- biomassa microbica all'inizio, durante e alla fine degli studi aerobici;
- pH, concentrazione di ossigeno e potenziale di ossidoriduzione all'inizio, durante e alla fine degli studi anaerobici e in risaia;
- metodo/i di estrazione;
- metodi per la quantificazione e l'identificazione della sostanza di prova e dei principali prodotti di trasformazione nel suolo e nei materiali di assorbimento;
- numero di replicati e numero di controlli.

Risultati:

- risultato della determinazione dell'attività microbica;
- ripetibilità e sensibilità dei metodi analitici usati;
- tassi di recupero (i valori % per uno studio valido sono indicati nella sezione 1.7.1);
- tabelle dei risultati espressi in % della dose iniziale applicata e, ove pertinente, in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ di suolo (base di peso secco);
- bilancio di massa durante e alla fine degli studi;
- caratterizzazione della radioattività o dei residui non estraibili nel suolo;
- quantificazione del CO_2 e di altre sostanze volatili rilasciate;
- grafici delle concentrazioni nel suolo in funzione del tempo riferiti alla sostanza di prova e, ove pertinente, ai principali prodotti di trasformazione;
- tempo di dimezzamento o DT_{50} , DT_{75} e DT_{90} della sostanza di prova e, ove pertinente, dei principali prodotti di trasformazione, compresi gli intervalli di confidenza;
- stima della velocità di degradazione abiotica in condizioni sterili;
- una valutazione della cinetica di trasformazione per la sostanza di prova e, ove pertinente, per i principali prodotti di trasformazione;
- vie di trasformazione proposte, ove pertinente;
- discussione e interpretazione dei risultati;
- dati originali (cioè cromatogrammi campione, calcoli campione dei tassi di trasformazione e metodi usati per identificare i prodotti di trasformazione).

4. BIBLIOGRAFIA

- (1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (3) Unione europea (UE) (1995). Direttiva 95/36/CE della Commissione, del 14 luglio 1995, che modifica la direttiva 91/414/CEE del Consiglio relativa all'immissione in commercio dei prodotti fitosanitari. Allegato II, parte A ed allegato III, parte A: Destino e comportamento nell'ambiente.
- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden - Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil - Part 1 : Aerobic conditions.
- (7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF - Japan 2000 - Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil - Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

- (10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.
- (12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
- (13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984)
- (14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)
- (15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality - Sampling - Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- (16) Allegato V della direttiva 67/548/CEE.
- (17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).
- (19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- (20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.
- (21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality - General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.
- (22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.
- (25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality - Determination of soil microbial biomass - Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.
- (26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.
- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.
- (28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).
- (29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).
- (30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

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

ALLEGATO 1

TENSIONE DELL'ACQUA, CAPACITÀ DI CAMPO (FC) E CAPACITÀ DI RITENUTA IDRICA (WHC) ⁽¹⁾

Altezza della colonna d'acqua [cm]	pF ^(a)	bar ^(b)	Note
10 ⁷	7	10 ⁴	Suolo secco
1,6 · 10 ⁴	4,2	16	Punto di appassimento
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 · 10 ²	2,8	0,6	
3,3 · 10 ²	2,5	0,33 ^(c)	
10 ²	2	0,1	} Gamma della capacità di campo ^(d)
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (approssimazione)
1	0	0,001	Suolo saturato d'acqua

^(a) pF = log di cm di colonna d'acqua

^(b) 1 bar = 10⁵ Pa

^(c) Corrisponde a un contenuto idrico approssimativo del 10 % in sabbia, 35 % in limo e 45 % in argilla.

^(d) La capacità di campo non è costante ma varia con il tipo di suolo fra pF 1,5 e 2,5.

La *tensione dell'acqua* si misura in cm di colonna d'acqua o in bar. A motivo dell'ampia gamma di tensione di aspirazione viene espressa semplicemente come valore pF, che è equivalente al logaritmo di cm di colonna d'acqua.

La *capacità di campo* si definisce come la quantità d'acqua che può essere conservata contro la gravità da parte di un suolo naturale 2 giorni dopo un periodo di pioggia prolungato o dopo irrigazione sufficiente. Viene determinata in suolo indisturbato in situ nel campo. La misurazione, pertanto, non è applicabile ai campioni di suolo disturbati di laboratorio. I valori FC determinati in suoli disturbati possono presentare notevoli variazioni sistematiche.

La *capacità di ritenuta idrica* (WHC) si definisce in laboratorio con suolo indisturbato e disturbato saturando una colonna di suolo con acqua per trasporto capillare. È particolarmente utile per i suoli disturbati e può essere fino al 30 % superiore alla capacità di campo (1). Inoltre, sperimentalmente è più semplice da determinare rispetto ai valori affidabili di FC.

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

ALLEGATO 2

CONTENUTO DI UMIDITÀ DEL SUOLO (g di acqua per 100 g di suolo secco) DI VARI TIPI DI SUOLO DA DIVERSI PAESI

Tipo di suolo	Paese	Contenuto di umidità del suolo a		
		WHC ⁽¹⁾	pF = 1,8	pF = 2,5
Sabbia	Germania	28,7	8,8	3,9
Sabbia limosa	Germania	50,4	17,9	12,1
Sabbia limosa	Svizzera	44,0	35,3	9,2
Limo fangoso	Svizzera	72,8	56,6	28,4
Limo argilloso	Brasile	69,7	38,4	27,3
Limo argilloso	Giappone	74,4	57,8	31,4
Limo sabbioso	Giappone	82,4	59,2	36,0
Limo fangoso	USA	47,2	33,2	18,8
Limo sabbioso	USA	40,4	25,2	13,3

⁽¹⁾ Capacità di ritenuta idrica

ALLEGATO 3

Figura 1

Esempio di apparecchio a flusso continuo per studiare la trasformazione delle sostanze chimiche nel suolo (1)(2)

- 1: valvola ad ago
- 2: bottiglia di lavaggio contenente acqua
- 3: ultramembrana (solo condizioni sterili), dimensione dei pori 0,2 μm
- 4: contenitore per metabolismo del suolo (impregnato d'acqua solo per le condizioni anaerobiche e di risaia;)
- 5: trappola a etilenglicole per composti organici volatili
- 6: trappola ad acido solforico per composti volatili alcalini
- 7, 8: trappola a idrossido di sodio per CO_2 e altre sostanze volatili acide
- 9: flussometro.

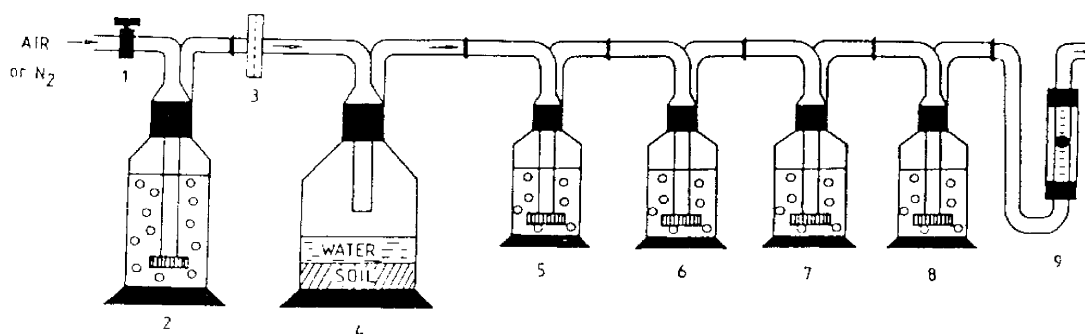
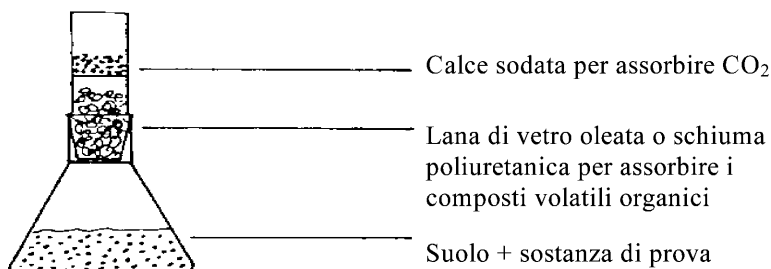


Figura 2

Esempio di contenitori per sistemi a biometro per studiare la trasformazione delle sostanze chimiche nel suolo (3)



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

C.24. TRASFORMAZIONE AEROBICA E ANAEROBICA NEI SISTEMI SEDIMENTOSI ACQUATICI

1. METODO

Questo metodo di prova corrisponde al TG 308 (2002) dell'OCSE.

1.1 INTRODUZIONE

Le sostanze chimiche possono penetrare nelle acque superficiali, basse o profonde, per applicazione diretta, deriva di sostanze nebulizzate, deflusso, drenaggio, smaltimento di rifiuti, effluenti industriali, domestici o agricoli e deposizione atmosferica. Questo metodo di prova descrive un metodo di laboratorio per determinare la trasformazione aerobica e anaerobica di sostanze chimiche organiche nei sistemi sedimentosi acquatici. Esso si basa su linee guida esistenti (1)(2)(3)(4)(5)(6). Un gruppo di lavoro OCSE sulla selezione dei suoli e dei sedimenti, tenuto a Belgirate nel 1995 (7), ha definito, in particolare, il numero e il tipo di sedimenti da usare per questo test e ha formulato alcune raccomandazioni sulla raccolta, la manipolazione e la conservazione di campioni di sedimento, sulla base di norme ISO (8). Questi studi sono necessari per esaminare le sostanze chimiche che sono direttamente introdotte nel acqua o che hanno la possibilità di raggiungere l'ambiente acquatico tramite le vie sopra menzionate.

I sistemi sedimentosi acquatici naturali hanno speso condizioni aerobiche nella fase acquosa superiore. Lo strato superficiale del sedimento può essere aerobico o anaerobico, mentre il sedimento più profondo è solitamente anaerobico. Per tenere conto di tutte queste possibilità, il presente documento descrive prove sia aerobiche, sia anaerobiche. La prova aerobica simula una colonna d'acqua aerobica sopra uno strato di sedimento aerobico sotto il quale si trova un gradiente anaerobico. La prova anaerobica simula un sistema acqua-sedimento completamente anaerobico. Vi sono altri metodi utilizzabili in circostanze nelle quali occorre scostarsi significativamente da queste raccomandazioni, per esempio impiegando nuclei di sedimento intatti o sedimenti che potrebbero essere stati esposti alla sostanza di prova (9).

1.2 DEFINIZIONI

In tutti i casi vanno applicate le unità del sistema internazionale (SI).

Sostanza di prova: qualsiasi sostanza, sia un composto progenitore che i relativi prodotti di trasformazione.

Prodotti di trasformazione: tutte le sostanze derivate da reazioni di trasformazione biotica o abiotica della sostanza di prova, compresi CO_2 e i residui non estraibili.

Residui non estraibili: composti presenti nel suolo, nelle piante o negli animali, che dopo estrazione persistono nella matrice sotto forma di sostanza progenitrice o di uno o più dei suoi metaboliti. Il metodo di estrazione non deve alterare in modo considerevole i composti stessi o la struttura della matrice. La natura del legame può essere chiarita, in parte, mediante metodi di estrazione che alterano la matrice e sofisticate tecniche analitiche. Finora, ad esempio, sono stati individuati in questo modo legami ionici covalenti e di assorbimento/adsorbimento, come pure le catture. In generale, la formazione di residui non estraibili riduce la bioaccessibilità e la biodisponibilità in maniera significativa (10) [modificato da IUPAC 1984 (11)].

Trasformazione aerobica: (ossidante): reazioni che si verificano in presenza di ossigeno molecolare (12).

Trasformazione anaerobica: (riducente): reazioni che si verificano in assenza di ossigeno molecolare (12).

Acque naturali: acque superficiali ottenute da laghi, fiumi, ruscelli, ecc.

Sedimento: miscela di costituenti chimici inorganici e organici, questi ultimi contenenti composti ad elevato contenuto di carbonio e azoto e di elevata massa molecolare. Viene depositato dall'acqua naturale con cui forma un'interfaccia.

Mineralizzazione: degradazione completa di un composto organico in CO_2 e H_2O in condizioni aerobiche, e in CH_4 , CO_2 e H_2O in condizioni anaerobiche. Nel contesto del presente metodo di prova, quando viene impiegato un composto radiomarcato, la mineralizzazione rappresenta la degradazione di una molecola, durante la quale un atomo di carbonio marcato viene ossidato o ridotto in maniera quantitativa, con rilascio della quantità appropriata di $^{14}\text{CO}_2$ o $^{14}\text{CH}_4$, a seconda dei casi.

Tempo di dimezzamento: $t_{0,5}$: il tempo occorrente per la trasformazione del 50 % di una sostanza di prova, quando la trasformazione può essere descritta mediante cinetica di primo ordine; essa è indipendente dalla concentrazione iniziale.

DT₅₀ (Tempo di scomparsa 50): tempo entro cui la concentrazione iniziale della sostanza di prova viene ridotta del 50 %.

DT₇₅ (Tempo di scomparsa 75): tempo entro cui la concentrazione iniziale della sostanza di prova viene ridotta del 75 %.

DT₉₀ (Tempo di scomparsa 90): tempo entro cui la concentrazione iniziale della sostanza di prova viene ridotta del 90 %.

1.3 SOSTANZE DI RIFERIMENTO

Per identificare e determinare quantitativamente i prodotti di trasformazione mediante metodi spettroscopici e cromatografici vengono utilizzate sostanze di riferimento.

1.4 INFORMAZIONI SULLA SOSTANZA DI PROVA

Per misurare la velocità di trasformazione è possibile utilizzare una sostanza di prova non marcata o marcata con isotopo, ma si preferisce il materiale marcato. Il materiale marcato è essenziale per lo studio delle vie di trasformazione e per determinare il bilancio di massa. È consigliata la marcatura con ¹⁴C, ma possono anche rivelarsi utili altri isotopi, quali ¹³C, ¹⁵N, ³H, ³²P. La marcatura va posizionata nei limiti del possibile nella parte o nelle parti più stabili della molecola ⁽¹⁾. La purezza chimica e/o radiochimica della sostanza di prova deve essere almeno pari al 95 %.

Prima di eseguire la prova devono essere disponibili le seguenti informazioni sulla sostanza di prova:

- (a) solubilità in acqua (Metodo A.6);
- (b) solubilità in solventi organici;
- (c) pressione di vapore (Metodo A.4) e costante della legge di Henry;
- (d) coefficiente di ripartizione n-ottanolo/acqua (Metodo A.8);
- (e) coefficiente di adsorbimento (K_d , K_f o K_{oc} , a seconda dei casi) (Metodo C.18);
- (f) idrolisi (Metodo C.7);
- (g) costante di dissociazione (pK_a) [linee guida OCSE 112] (13);
- (h) struttura chimica della sostanza di prova ed eventuale posizione della marcatura isotopica.

Nota. Va indicata la temperatura alla quale vengono effettuate queste misurazioni.

Altre informazioni utili possono comprendere i dati sulla tossicità della sostanza di prova nei confronti di microrganismi, i dati sulla biodegradabilità rapida e/o intrinseca, e i dati sulla trasformazione aerobica e anaerobica nel suolo.

Dovrebbero essere disponibili metodi analitici (compresi i metodi di estrazione e depurazione) per l'identificazione e la determinazione quantitativa della sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione nell'acqua e nel sedimento (vedi sezione 1.7.2).

1.5 PRINCIPIO DEL METODO DI PROVA

Il metodo descritto in questo test utilizza un sistema sedimentoso acquatico aerobico e uno anaerobico (vedi allegato 1) che consente:

- (i) la misurazione della velocità di trasformazione della sostanza di prova in un sistema acqua-sedimento,
- (ii) la misurazione della velocità di trasformazione della sostanza di prova nel sedimento,

⁽¹⁾ Se, per esempio, la sostanza contiene un anello, la marcatura va effettuata su questo anello; se la sostanza di prova contiene due o più anelli, potrebbero rilevarsi necessari più studi per determinare il destino di ciascun anello marcato e per ottenere informazioni adeguate sulla formazione dei prodotti di trasformazione.

- (iii) la misurazione della velocità di mineralizzazione della sostanza di prova e/o dei suoi prodotti di trasformazione (quando viene usata una sostanza di prova marcata con ^{14}C),
- (iv) l'identificazione e la determinazione quantitativa dei prodotti di trasformazione della fase acquosa e di quella sedimentosa, compreso il bilancio di massa (quando viene usata una sostanza di prova marcata),
- (v) la misurazione della distribuzione della sostanza di prova e dei suoi prodotti di trasformazione tra le due fasi durante il periodo di incubazione al buio (per evitare ad esempio la fioritura delle alghe) a temperatura costante. I tempi di dimezzamento e i valori di DT_{50} , DT_{75} e DT_{90} vengono determinati quando i dati lo dovessero consigliare, ma non vanno estrapolati di molto oltre l'intervallo sperimentale (vedi sezione 1.2).

Per ciascuno degli studi aerobico e anaerobico occorrono almeno due sedimenti con le rispettive acque (7). In determinati casi occorre però utilizzare più di due sedimenti acquatici, ad esempio nel caso di una sostanza chimica che può essere presente in ambienti di acqua dolce e/o in ambienti marini.

1.6 APPLICABILITÀ DEL TEST

Il metodo è generalmente applicabile alle sostanze chimiche (marcate o non marcate) per le quali è noto un metodo analitico sufficientemente accurato e sensibile. Esso è applicabile a composti leggermente volatili, non volatili, idrosolubili o scarsamente idrosolubili. Il test non va applicato a sostanze chimiche che presentano elevata volatilità in acqua (ad esempio fumiganti, solventi organici), che non possono pertanto essere tenute in acqua e/o nel sedimento nelle condizioni sperimentali del presente test.

Il metodo è stato applicato finora per studiare la trasformazione di sostanze chimiche in acque dolci e sedimenti, ma in linea di principio può anche essere applicato a sistemi estuari o marini. Esso non è invece idoneo alla simulazione delle condizioni di acqua corrente (ad esempio nei fiumi) o di mare aperto.

1.7 CRITERI DI QUALITÀ

1.7.1 **Recupero**

L'estrazione e l'analisi di campioni di acqua e sedimento, perlomeno in duplicato, subito dopo l'aggiunta della sostanza di prova, forniscono una prima indicazione della ripetibilità del metodo analitico e dell'uniformità della procedura di applicazione per la sostanza di prova. Le percentuali di recupero per gli stadi successivi degli esperimenti sono basate sui rispettivi bilanci di massa (quando viene usato materiale marcato) e dovrebbero essere comprese tra 90 % e 110 % per le sostanze chimiche marcate (6) e tra 70 % e 110 % per le sostanze chimiche non marcate.

1.7.2 **Ripetibilità e sensibilità del metodo analitico**

La ripetibilità del metodo analitico (esclusa l'efficienza dell'estrazione iniziale) utilizzato per quantificare la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione può essere controllata mediante un'analisi in duplicato dello stesso estratto dei campioni di acqua o sedimento, incubati sufficientemente a lungo per consentire la formazione di prodotti di trasformazione.

Il limite di rivelabilità del metodo analitico per la sostanza di prova e i prodotti di trasformazione deve essere pari ad almeno $0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in acqua o sedimento (come sostanza di prova) o all'1 % della quantità iniziale applicata a un sistema di prova, se minore del precedente. Va anche specificato il limite di quantificazione.

1.7.3 **Accuratezza dei dati sulla trasformazione**

L'analisi di regressione delle concentrazioni della sostanza di prova in funzione del tempo fornisce dati adeguati sull'accuratezza della curva di trasformazione e consente di calcolare gli intervalli di confidenza per i tempi di dimezzamento (in caso di cinetica del pseudo primo ordine) o i valori di DT_{50} e, se del caso, DT_{75} e DT_{90} .

1.8 DESCRIZIONE DEL METODO

1.8.1 **Sistema di prova e attrezzatura**

Lo studio va eseguito in contenitori di vetro (ad esempio bottiglie, provette da centrifuga) salvo quando dati preliminari (quali il coefficiente di ripartizione n-ottanolo-acqua, i dati di assorbimento/adsorbimento,

ecc.) indicano che la sostanza di prova può aderire al vetro, nel qual caso potrebbe essere necessario prendere in considerazione un materiale alternativo (ad esempio teflon). Se è noto che la sostanza di prova aderisce al vetro, può essere possibile ovviare al problema mediante uno o più dei metodi seguenti:

- determinazione della massa della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione assorbiti sul vetro;
- lavaggio con solvente di tutta la vetreria al termine della prova;
- impiego di prodotti formulati (vedi anche sezione 1.9.2);
- uso di una quantità maggiore di cosolvente per l'aggiunta della sostanza di prova al sistema; l'eventuale cosolvente impiegato deve essere tale da non sottoporre a solvolisi la sostanza di prova.

Gli allegati 2 e 3 riportano esempi di attrezzature di prova tipiche, ossia, rispettivamente, a flusso continuo e con sistema a biometro (14). Altri sistemi ad incubazione utili sono descritti nel riferimento bibliografico 15. L'attrezzatura sperimentale deve essere progettata in modo tale da consentire lo scambio di aria o azoto e la cattura dei prodotti volatili. Le sue dimensioni devono essere tali da soddisfare i requisiti del test (vedi sezione 1.9.1). La ventilazione può essere garantita mediante un leggero gorgogliamento o mediante il passaggio di aria o azoto sopra la superficie dell'acqua. In quest'ultimo caso può essere consigliabile agitare leggermente l'acqua dall'alto, per migliorare la distribuzione dell'ossigeno o dell'azoto nell'acqua. Non va impiegata aria priva di CO₂ che potrebbe portare all'aumento del pH dell'acqua. In entrambi i casi è bene evitare se possibile di disturbare il sedimento. Le prove su sostanze chimiche leggermente volatili vanno effettuate in un sistema a biometro con leggera agitazione della superficie dell'acqua. Si possono anche usare recipienti chiusi con uno spazio di testa di aria atmosferica o azoto e fiale interne per la cattura dei prodotti volatili (16). Nella prova aerobica il gas contenuto nello spazio di testa va scambiato ad intervalli regolari per compensare il consumo di ossigeno ad opera della biomassa.

Come trappole idonee per la cattura di prodotti di trasformazione volatili si possono impiegare, senza però alcuna limitazione, soluzioni da 1 mol·dm⁻³ di idrossido di potassio o idrossido di sodio per l'anidride carbonica ⁽²⁾, e glicole etilenico, etanolamina o paraffina al 2 % in xilene per i composti organici. Le sostanze volatili formate in condizioni anaerobiche, quali metano, possono essere raccolte per esempio mediante setacci molecolari. Tali sostanze possono ad esempio essere bruciate per produrre CO₂ facendo passare il gas attraverso un tubo in quarzo riempito con CuO alla temperatura di 900 °C e catturando la CO₂ formata in un assorbitore contenente un alcalo (17).

È necessaria una strumentazione da laboratorio per l'analisi chimica della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione (ad esempio cromatografia gas liquido (GLC), cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC), cromatografia su strato sottile (TLC), spettroscopia di massa (MS), gas cromatografia-spettroscopia di massa (GC-MS), cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS), risonanza magnetica nucleare (NMR), ecc.), ivi compresi i sistemi di rilevamento per le sostanze chimiche radiomarcate o non marcate, a seconda dei casi. Quando si usa materiale radiomarcato occorrono inoltre un contatore a scintillazione a liquido e un ossidatore a combustione (per la combustione dei campioni di sedimento prima dell'analisi della radioattività).

Servono inoltre altre normali attrezzature da laboratorio per misurazioni fisico-chimiche e biologiche (vedi la tabella 1, sezione 1.8.2.2), vetreria, sostanze chimiche e reagenti, secondo necessità.

1.8.2 Selezione e numero dei sedimenti acquatici

I siti di campionamento vanno selezionati in funzione delle finalità del test in ogni situazione sperimentale. Ai fini della selezione dei siti di campionamento occorre prendere in considerazione tutti gli eventuali apporti agricoli, industriali e domestici verificatisi nella zona interessata e nelle acque a monte. Non vanno impiegati sedimenti che sono stati contaminati con la sostanza di prova o con i suoi analoghi strutturali nel corso dei precedenti 4 anni.

⁽²⁾ Poiché queste soluzioni di assorbimento alcaline assorbono anche l'anidride carbonica proveniente dall'aria di ventilazione e quella prodotta per respirazione negli esperimenti aerobici, esse vanno cambiate ad intervalli regolari per evitarne la saturazione con conseguente perdita di capacità assorbente.

1.8.2.1 *Selezione del sedimento*

Per gli studi aerobici vengono normalmente usati due sedimenti (7). I due sedimenti selezionati dovrebbero essere diversi in quanto a contenuto di carbonio organico e tessitura. Uno dei sedimenti dovrebbe avere contenuto elevato di carbonio organico (2,5-7,5 %) e tessitura fine, mentre l'altro sedimento dovrebbe avere basso contenuto di carbonio organico (0,5-2,5 %) e tessitura grossa. La differenza tra i contenuti di carbonio organico deve essere normalmente pari almeno al 2 %. Per «tessitura fine» si intende un contenuto di [argilla + limo] ⁽³⁾ > 50 %, e per «tessitura grossa» un contenuto di [argilla + limo] < 50 %. Di norma la differenza di contenuto di [argilla + limo] dei due sedimenti deve essere almeno pari al 20 %. Nei casi in cui la sostanza chimica potrebbe anche raggiungere le acque marine è necessario che almeno uno dei sistemi acqua-sedimento abbia origine marina.

Per lo studio strettamente anaerobico vanno prelevati due campioni di sedimento (comprese le rispettive acque) da zone anaerobiche dei corpi d'acqua superficiali (7). Entrambe le fasi sedimentose e acquose vanno maneggiate e trasportate con cura in ambiente privo di ossigeno.

Potrebbero esserci altri fattori importanti nella scelta dei sedimenti, che vanno presi in considerazione caso per caso. L'intervallo di pH dei sedimenti, ad esempio, assumerebbe notevole importanza qualora la trasformazione e/o l'assorbimento della sostanza chimica oggetto della prova dipendessero dal pH. La dipendenza dal pH dell'assorbimento potrebbe riflettersi nel pK_a della sostanza di prova.

1.8.2.2 *Caratterizzazione dei campioni acqua-sedimento*

Nella tabella seguente sono riassunti i parametri principali da misurare e documentare (con riferimento al metodo utilizzato) sia per l'acqua, sia per il sedimento, con indicazione delle fasi del test in cui tali parametri vanno determinati. Per ulteriori informazioni sui metodi per la determinazione di questi parametri si rimanda ai riferimenti bibliografici (18)(19)(20)(21).

Potrebbe inoltre essere necessario misurare e documentare altri parametri, a seconda dei casi (ad esempio, per acqua dolce: particelle, alcalinità, durezza, conduttività, NO₃/PO₄ (rapporto e valori singoli); per i sedimenti: capacità di scambio cationico, capacità di trattenimento dell'acqua, carbonato, azoto e fosforo totali; per sistemi marini: salinità). Per valutare le condizioni di ossido-riduzione potrebbe inoltre rivelarsi utile l'analisi di nitrato, solfato, ferro biodisponibile ed eventualmente altri accettori elettronici nell'acqua e nei sedimenti, soprattutto in relazione alla trasformazione anaerobica.

Rilevamento dei parametri per la caratterizzazione dei campioni acqua - sedimento (7)(22)(23)

Parametro	Fase del test					
	campionatura sul campo	post-manipolazione	inizio dell'acclimatazione	inizio della prova	durante la prova	termine della prova
Acqua						
Origine/fonte	x					
Temperatura	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC			x	x		x
Concentrazione di O ₂ *	x		x	x	x	x
Potenziale Redox *			x	x	x	x
Sedimento						
Origine/fonte	x					
Profondità dello strato	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribuzione della dimensione delle particelle		x				

⁽³⁾ [Argilla + limo] è la frazione inorganica del sedimento con particelle di dimensione < 50 µm.

Parametro	Fase del test					
	campionatura sul campo	post-manipolazione	inizio dell'acclimatazione	inizio della prova	durante la prova	termine della prova
TOC		x	x	x		x
Biomassa microbica **		x		x		x
Potenziale Redox *	Osservazione (colore/odore)		x	x	x	x

* Studi recenti hanno mostrato che le misurazioni delle concentrazioni dell'ossigeno in acqua e dei potenziali redox non hanno valore meccanistico né predittivo sulla crescita e lo sviluppo di popolazioni microbiche in acque superficiali (24)(25). La determinazione della domanda biochimica d'ossigeno (BOD, in corrispondenza della campionatura sul campo, dell'inizio e del termine della prova) e delle concentrazioni dei micro/macro nutrienti Ca, Mg e Mn (all'inizio e alla fine della prova) in acqua, nonché la misurazione dell'N totale e del P totale nei sedimenti (in corrispondenza della campionatura sul campo e al termine della prova) possono rivelarsi più adatte per l'interpretazione e la valutazione delle velocità e delle vie di biotrasformazione aerobica.

** Metodo della velocità di respirazione microbica (26), metodo di fumigazione (27) o conteggi in piastra (ad esempio batteri, atinomiceti, funghi e colonie totali) per gli studi aerobici; velocità di metanogenesi per gli studi anaerobici.

1.8.3 Raccolta, manipolazione e conservazione

1.8.3.1 Raccolta

Per la campionatura del sedimento va utilizzata la bozza di linea guida ISO sulla campionatura dei sedimenti depositati sul fondo (8). I campioni di sedimento vanno prelevati dall'intero strato superiore del sedimento, avente spessore di 5-10 cm. Le relative acque vanno raccolte nello stesso sito o ubicazione da cui viene prelevato il sedimento e nello stesso istante. Per gli studi anaerobici il prelievo e il trasporto del sedimento e dell'acqua relativa vanno effettuati in assenza di ossigeno (28) (vedi sezione 1.8.2.1). Alcuni dispositivi di campionatura sono descritti in bibliografia (8)(23).

1.8.3.2 Manipolazione

Il sedimento viene dapprima separato dall'acqua per filtrazione e poi setacciato a umido con un setaccio da 2 mm impiegando un eccesso di acqua locale, che viene poi gettata. Successivamente si mescolano quantità note di sedimenti e acqua nei rapporti desiderati (vedi sezione 1.9.1) utilizzando palloni di incubazione, le quali vengono poi preparate per il periodo di acclimatazione (vedi sezione 1.8.4). Per lo studio anaerobico tutte le operazioni di manipolazione vanno effettuate in assenza di ossigeno (29)(30)(31)(32)(33).

1.8.3.3 Conservazione

Si raccomanda vivamente di utilizzare sedimento e acqua campionati di fresco, ma se vi fossero necessità di conservazione occorre setacciare il sedimento e l'acqua come sopra descritto e conservarli insieme, coperti da uno strato d'acqua di 6-10 cm, al buio, a 4 ± 2 °C₄ per un massimo di 4 settimane (7)(8)(23). I campioni da utilizzare per gli studi aerobici vanno conservati all'aria (ad esempio in contenitori aperti), mentre per gli studi anaerobici occorre eliminare la presenza di ossigeno. I campioni non vanno congelati e il sedimento non va lasciato asciugare durante il trasporto e la conservazione.

1.8.4 Preparazione dei campioni di sedimento/acqua per il test

Prima dell'aggiunta della sostanza di prova occorre prevedere un periodo di acclimatazione, ponendo ciascun campione di sedimento/acqua nel recipiente di incubazione che verrà poi utilizzato per il test principale; l'acclimatazione va eseguita esattamente nelle stesse condizioni dell'incubazione di prova (vedi sezione 1.9.1). Il periodo di acclimatazione serve per raggiungere sufficiente stabilità nel sistema, valutata in base al pH, alla concentrazione di ossigeno nell'acqua, al potenziale redox di sedimento e acqua e alla separazione macroscopica delle fasi. Il periodo di acclimatazione è di norma compreso tra una e due settimane e comunque non supera le quattro settimane. I risultati delle determinazioni effettuate durante questo periodo vanno documentati.

1.9 ESECUZIONE DEL TEST**1.9.1 Condizioni**

Il test va effettuato nell'attrezzatura di incubazione (vedi sezione 1.8.1) con rapporto volumetrico acqua/sedimento compreso tra 3:1 e 4:1 e strato del sedimento di 2,5 cm (\pm 0,5 cm) ⁽⁴⁾. Per ogni recipiente di incubazione si raccomanda una quantità minima di sedimento paria 50 g (peso secco)

Il test va condotto al buio, a temperatura costante compresa tra 10 e 30 °C. La temperatura ideale è 20 \pm 2 °C. In casi particolari può essere necessario eseguire un test anche a temperatura inferiore (ad esempio 10 °C), in funzione dei dati che si vogliono raccogliere. La temperatura d'incubazione va sottoposta a monitoraggio e documentata.

1.9.2 Trattamento e applicazione della sostanza di prova

Viene utilizzata una sola concentrazione di prova della sostanza chimica ⁽⁵⁾. Per le sostanze fitosanitarie applicate direttamente ai corpi d'acqua, la dose massima riportata sull'etichetta rappresenta il tasso di applicazione massimo calcolato sulla base dell'area superficiale dell'acqua nel recipiente di prova. In tutti gli altri casi la concentrazione da utilizzare va basata su previsioni derivate dalle emissioni ambientali. La concentrazione delle sostanze di prova applicate va studiata con cura al fine di caratterizzare la via di trasformazione, nonché la formazione e la diminuzione dei prodotti di trasformazione. Può essere necessario applicare dosi più elevate (ad esempio 10 volte maggiori) in situazioni in cui le concentrazioni delle sostanze di prova sono vicine ai limiti di rilevamento all'inizio della prova, e/o nei casi in cui alcuni importanti prodotti di trasformazione non potrebbero venire facilmente determinati se presenti in quantità pari al 10 % del tasso di applicazione della sostanza di prova. Se però vengono impiegate concentrazioni di prova più elevate, queste non devono avere significativi effetti avversi sull'attività microbica del sistema acqua-sedimento. Al fine di ottenere una concentrazione costante della sostanza di prova in recipienti di dimensione diversa, va presa in considerazione l'opportunità di modificare la quantità del materiale applicato sulla base della profondità della colonna d'acqua nel recipiente rispetto alla profondità dell'acqua sul campo (presunta pari a 100 cm, ma possono essere usate altre profondità). Un esempio di calcolo è riportato nell'allegato 4.

Nel caso ideale la sostanza di prova va applicata alla fase acquosa del sistema di prova sotto forma di soluzione acquosa. È ammesso, nei casi in cui ciò sia inevitabile, l'uso di piccole quantità di solventi miscibili in acqua (ad es. acetone, etanolo) per l'applicazione e la distribuzione della sostanza di prova, senza tuttavia superare l'1 % v/v ed evitando in ogni caso il rischio di produrre effetti avversi sull'attività microbica del sistema di prova. La soluzione acquosa della sostanza di prova va preparata con cautela; per garantire un'omogeneità completa può rivelarsi utile l'impiego di colonne di generazione e di premiscelazione. Dopo l'aggiunta della soluzione acquosa al sistema di prova si raccomanda di miscelare leggermente la fase acquosa, disturbando il meno possibile il sedimento.

L'uso di prodotti formulati non è consigliato in condizioni normali, perché gli ingredienti della formulazione possono influire sulla distribuzione della sostanza di prova e/o dei prodotti di trasformazione tra le fasi acquosa e sedimentosa. Nel caso di sostanze di prova scarsamente idrosolubili l'impiego di materiale formulato può rappresentare però un'alternativa appropriata.

Il numero di recipienti di incubazione dipende dal numero dei tempi di campionatura (vedi sezione 1.9.3). Il numero dei sistemi di prova deve essere sufficiente a consentire il sacrificio di due sistemi per ciascun tempo di campionatura. Se si impiegano unità di controllo per ciascun sistema sedimentoso acquatico, esse non vanno trattate con la sostanza di prova. Le unità di controllo possono essere usate per determinare la biomassa microbica del sedimento e il carbonio organico totale di acqua e sedimento al termine dello studio. Due unità di controllo (cioè un'unità di controllo per ciascun sedimento acquatico) possono essere utilizzate per monitorare i parametri richiesti nel sedimento e nell'acqua durante il periodo di acclimatazione (vedi tabella in sezione 1.8.2.2). Vanno incluse due unità di controllo aggiuntive nel caso in cui la sostanza di prova venga applicata mediante un solvente in modo da poter misurare gli effetti avversi sull'attività microbica del sistema di prova.

1.9.3 Durata del test e campionatura

La durata dell'esperimento non deve normalmente eccedere 100 giorni (6) e dovrebbe continuare fino alla determinazione delle vie di degradazione e delle caratteristiche di distribuzione acqua/sedimento, oppure fino alla dissipazione del 90 % della sostanza di prova a seguito di trasformazione e/o volatilizzazione. I

⁽⁴⁾ Alcuni studi recenti hanno dimostrato che la conservazione a 4 °C può comportare una diminuzione del contenuto in carbonio organico del sedimento, che potrebbe forse portare alla diminuzione dell'attività microbica (34).

⁽⁵⁾ Per sostanze chimiche che raggiungono le acque superficiali per vie d'ingresso diverse, comportanti concentrazioni significativamente diverse, potrebbero rivelarsi utili prove con una seconda concentrazione, a condizione che la concentrazione inferiore possa essere analizzata con accuratezza sufficiente.

tempi di campionatura devono essere almeno sei (tempo zero compreso), ricorrendo opzionalmente ad uno studio preliminare (vedi sezione 1.9.4) per determinare un regime di campionatura appropriato e la durata del test, salvo quando esistano dati sufficienti sulla sostanza di prova ottenuti da studi precedenti. Per sostanze di prova idrofobiche potrebbero rivelarsi necessari punti di campionatura aggiuntivi durante il periodo iniziale dello studio, allo scopo di determinare la velocità di distribuzione tra le fasi acquosa e sedimentosa.

In corrispondenza dei tempi di campionatura accuratamente selezionati si rimuovono i recipienti di incubazione interi (in duplicato) da sottoporre all'analisi. Il sedimento e l'acqua soprastante vengono analizzati separatamente ⁽⁶⁾. L'acqua superficiale va rimossa con attenzione, disturbando il meno possibile il sedimento. L'estrazione e la caratterizzazione della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione devono rispettare le procedure analitiche del caso. Va rimosso con attenzione l'eventuale materiale adsorbito nei recipienti di incubazione o nei tubi di interconnessione utilizzati per catturare le sostanze volatili.

1.9.4 **Prova preliminare opzionale**

Se la durata e il regime di campionatura non possono essere stimati sulla base di altri studi effettuati sulla sostanza di prova, può essere utile svolgere una prova preliminare opzionale, che va in tal caso effettuata alle stesse condizioni di prova proposte per lo studio definitivo. Le condizioni sperimentali e i risultati dell'eventuale prova preliminare vanno documentati brevemente.

1.9.5 **Misurazioni e analisi**

È necessario misurare e riportare la concentrazione della sostanza di prova e dei prodotti di trasformazione nell'acqua e nel sedimento in corrispondenza di ciascun tempo di campionatura (espressa come concentrazione e come percentuale della sostanza applicata). In via generale, per ciascun tempo di campionatura vanno identificati i prodotti di trasformazione rilevati a ≥ 10 % della radioattività applicata al sistema totale acqua-sedimento, a meno che vi siano motivi ragionevoli che consiglino altrimenti. Va inoltre presa in considerazione l'opportunità di identificare i prodotti di trasformazione le cui concentrazioni aumentano in modo continuativo durante lo studio, pur non eccedendo i limiti sopra riportati, poiché tale aumento può essere indicativo di persistenza. Questi aspetti vanno affrontati caso per caso, motivando nella relazione le soluzioni adottate.

I risultati ottenuti dai sistemi per la cattura di gas e sostanze volatili (CO₂ e altri, cioè sostanze organiche volatili) vanno riportati per ciascun tempo di campionatura. Le velocità di mineralizzazione vanno anch'esse riportate. I residui non estraibili (legati) nel sedimento vanno riportati per ciascun punto di campionatura.

2. **DATI**

2.1 TRATTAMENTO DEI RISULTATI

Per ciascun tempo di campionatura si calcolano il bilancio di massa totale o il recupero (vedi sezione 1.7.1) della radioattività aggiunta. I risultati vanno espressi come percentuale della radioattività aggiunta. La distribuzione della radioattività tra acqua e sedimento va espressa come concentrazione e in percentuale, per ciascun tempo di campionatura.

Il tempo di dimezzamento, il DT₅₀ ed eventualmente il DT₇₅ e il DT₉₀ della sostanza di prova vanno calcolati con i rispettivi intervalli di confidenza (vedi sezione 1.7.3). I dati sulla velocità di dissipazione della sostanza di prova nell'acqua e nel sedimento possono essere ricavati mediante opportuni strumenti di valutazione. Essi possono comprendere l'applicazione di cinetiche dello pseudo primo ordine, tecniche empiriche di interpolazione con curve che applicano soluzioni grafiche o numeriche, e valutazioni più complesse, tra cui modelli a compartimento singolo o multiplo. Per maggiori dettagli si rimanda alle rispettive pubblicazioni (35)(36)(37).

Tutte le tecniche hanno punti forti e punti deboli e possono variare notevolmente in quanto a complessità. L'ipotesi di una cinetica del primo ordine può semplificare eccessivamente i processi di degradazione e distribuzione, ma in determinati casi essa consente di disporre di un valore (la costante di velocità o il tempo di dimezzamento) che può essere compreso facilmente ed è utile nei modelli di simulazione e nei calcoli di previsione delle concentrazioni ambientali. Le soluzioni empiriche o le trasformazioni lineari possono fornire interpolazioni più aderenti e consentire pertanto una stima migliore dei tempi di dimezzamento, del DT₅₀ ed eventualmente dei DT₇₅ e DT₉₀. L'uso delle costanti così derivate è però limitato. I modelli a compartimento possono dare luogo a diverse costanti utili ai fini della valutazione dei rischi, per

⁽⁶⁾ In casi in cui può verificarsi facilmente una rapida riossidazione dei prodotti di trasformazione anaerobici occorre mantenere le condizioni anaerobiche durante tutta la campionatura e l'analisi.

descrivere la velocità di degradazione in compartimenti diversi e la distribuzione delle sostanze chimiche. Essi vanno inoltre utilizzati per stimare le costanti di velocità per la formazione e la degradazione dei prodotti di trasformazione principali. In tutti i casi il metodo prescelto va motivato e lo sperimentatore deve dimostrare graficamente e/o statisticamente la bontà dell'interpolazione.

3. RELAZIONE

3.1 RELAZIONE SULLESECUZIONE DEL TEST

La relazione deve comprendere le seguenti informazioni:

Sostanza di prova:

- denominazione comune, nome chimico, numero CAS, formula di struttura (indicante la posizione della marcatura o delle marcature quando si utilizzano materiali radiomarcati) e proprietà fisico-chimiche rilevanti;
- purezza (impurità) della sostanza di prova;
- purezza radiochimica della sostanza chimica marcata e attività molare (nei casi opportuni).

Sostanze di riferimento:

- nome chimico e struttura delle sostanze di riferimento utilizzate per la caratterizzazione e/o l'identificazione dei prodotti di trasformazione.

Sedimenti e acque di prova:

- ubicazione e descrizione dei siti di campionatura dei sedimenti acquatici, precisando se possibile i casi di contaminazione che si sono verificati;
- tutte le informazioni riguardanti il prelievo, l'eventuale conservazione e l'acclimatazione dei sistemi acqua-sedimento;
- caratteristiche dei campioni acqua-sedimento come riportato nella tabella in sezione 1.8.2.2.

Condizioni del test:

- sistema di prova utilizzato (ad esempio flusso, biometro, modalità di ventilazione, metodo di agitazione, volume d'acqua, massa del sedimento, spessore degli strati acquoso e sedimentoso, dimensione dei recipienti di prova, ecc.);
- applicazione della sostanza di prova al sistema di prova: concentrazione di prova utilizzata, numero dei replicati e dei controlli, modalità di applicazione della sostanza di prova (ad esempio eventuale uso di solvente), ecc.;
- temperatura di incubazione;
- tempi di campionatura;
- metodi di estrazione e relative efficienze, oltre ai metodi analitici e ai limiti di rivelabilità;
- metodi di caratterizzazione/identificazione dei prodotti di trasformazione;
- deviazioni dai protocolli di prova o dalle condizioni di prova durante lo studio.

Risultati:

- dati grezzi delle analisi rappresentative (tutti i dati grezzi vanno conservati nell'archivio GLP);
- ripetibilità e sensibilità dei metodi analitici utilizzati;
- tassi di recupero (i valori percentuali per la validità dello studio sono riportati nella sezione 1.7.1);
- tabelle dei risultati, espressi come percentuale della dose applicata e in $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in acqua, sedimento e sistema totale (percentuale soltanto) per la sostanza di prova e, se appropriato, per i prodotti di trasformazione e la radioattività non estraibile;

- bilancio di massa durante gli studi e al termine degli studi;
- rappresentazione grafica della trasformazione nelle frazioni acquosa e sedimentosa e nel sistema totale (mineralizzazione compresa);
- velocità di mineralizzazione;
- tempo di dimezzamento, DT_{50} ed eventualmente DT_{75} e DT_{90} della sostanza di prova e, se del caso, per i principali prodotti di trasformazione, compresi gli intervalli di confidenza in acqua, nel sedimento e nel sistema totale;
- valutazione delle cinetiche di trasformazione della sostanza di prova e, se del caso, dei principali prodotti di trasformazione;
- via di trasformazione proposta, se del caso;
- discussione dei risultati.

4

BIBLIOGRAFIA

- (1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.
- (2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.
- (3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.
- (4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) - Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.
- (5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.
- (6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.
- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.
- (8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality - Sampling - Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).
- (12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC - Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.
- (15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

- (16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 631-637.
 - (17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ¹⁴C-labelled model surfactants. *Water Research* 21, 661-667.
 - (18) Black, C.A. (1965). *Methods of Soil Analysis*. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
 - (19) APHA (1989). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater* (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
 - (20) Rowell, D.L. (1994). *Soil Science Methods and Applications*. Longman.
 - (21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. *Anal. Chemistry* 44, 1038-1039.
 - (22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.
 - (23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
 - (24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. *Water Research* 31, 2858-2868.
 - (25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. *Environ. Toxicol.* 329-338.
 - (26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. *Soil Biol. Biochem.* 17, 197-203.
 - (27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method.
 - (28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990). The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. *Hydrobiol. Bull.* 24 (1), 13-21.
 - (29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. *App. Environ. Microbiol.* 47, 850-857.
 - (30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19, 1527-1550.
 - (31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. *Chemosphere* 27, 1499-1509.
 - (32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ¹⁴C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597-3603.
 - (33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
 - (34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961-968.
 - (35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*, 39, 187-203.
 - (36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz - Nachrichten Bayer*, 33, 47-60.
 - (37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases, pp 1349-1354.
-

ALLEGATO 1

LINEE GUIDA SUI SISTEMI DI PROVA AEROBICI E ANAEROBICI

Sistema di prova aerobico

Il sistema di prova aerobico descritto in questo metodo di prova consiste di uno strato di acqua aerobico (concentrazioni di ossigeno tipiche comprese tra 7 e 10 mg⁻¹) e uno strato sedimentoso aerobico in superficie e anaerobico sotto la superficie (potenziali redox (E_h) medi tipici nella zona anaerobica del sedimento compresi tra -80 e -190 mV). Dell'aria inumidita viene fatta passare sopra la superficie dell'acqua in ciascuna unità di incubazione per mantenere una quantità sufficiente di ossigeno nello spazio di testa.

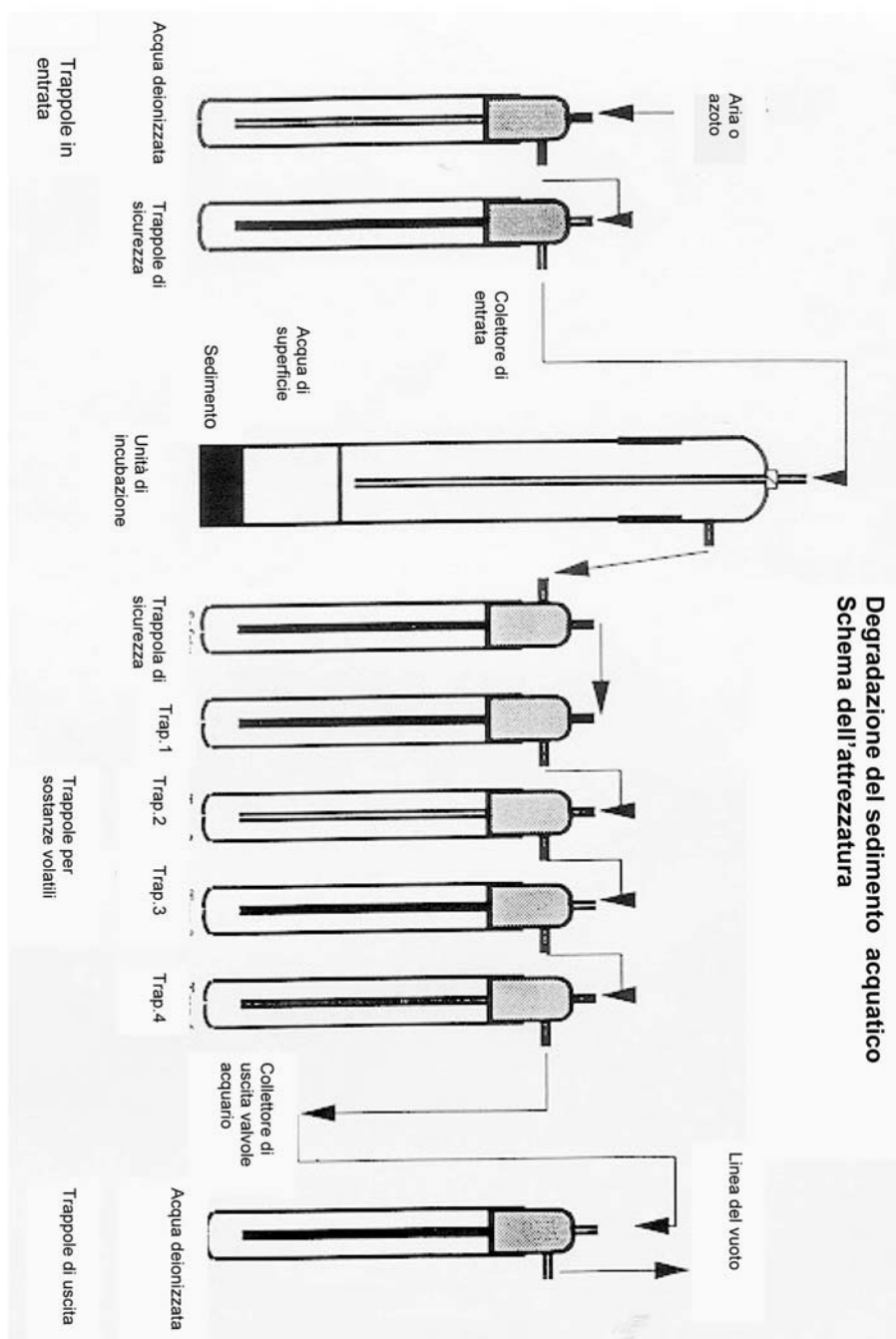
Sistema di prova anaerobico

Per il sistema di prova anaerobico la procedura di prova è sostanzialmente uguale a quella delineata per il sistema aerobico, con la differenza che viene fatto passare dell'azoto inumidito sopra la superficie dell'acqua in ciascuna unità di incubazione per mantenere uno spazio di testa di azoto. Il sedimento e l'acqua vengono considerati anaerobici se il potenziale redox (E_h) è minore di -100 mV.

Nella prova anaerobica la valutazione della mineralizzazione comprende la misurazione dell'anidride carbonica e del metano prodotti.

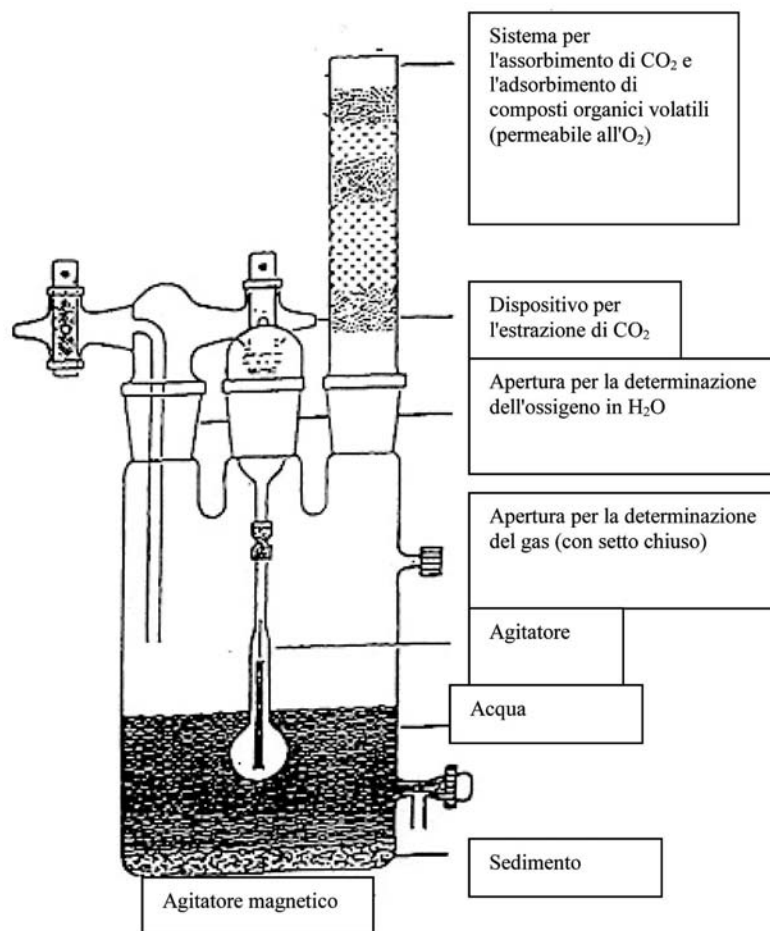
ALLEGATO 2

ESEMPIO DI UN ATTREZZATURA A FLUSSO CONTINUO



ALLEGATO 3

ESEMPIO DI UN'ATTREZZATURA A BIOMETRO



ALLEGATO 4

ESEMPIO DI CALCOLO PER LA DOSE DI APPLICAZIONE NEI RECIPIENTI DI PROVA

Diametro interno del cilindro:	= 8 cm
Profondità della colonna d'acqua, sedimento escluso:	= 12 cm
Area di superficie: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm ²
Tasso di applicazione: 500 g di sostanza di prova/ha corrispondente a 5 µg/cm ²	
Totale µg: $5 \times 50,3$	= 251,5 µg
Regolazione della quantità in relazione ad una profondità di 100 cm: $12 \times 251,5 \div 100$	= 30,18 µg
Volume della colonna d'acqua: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Concentrazione in acqua: $30,18 \div 603$	= 0,050 µg/ml oppure 50 µg/l »
