

ANEXO 10

GUÍA SOBRE TRANSFORMACIÓN/DISOLUCIÓN DE METALES Y COMPUESTOS METÁLICOS EN MEDIO ACUOSO

Anexo 10

GUÍA SOBRE TRANSFORMACIÓN/DISOLUCIÓN DE METALES Y COMPUESTOS METÁLICOS EN MEDIO ACUOSO¹

A10.1 Introducción

A10.1.1 Este documento guía sirve para determinar la tasa y la extensión con las que metales y compuestos metálicos poco solubles pueden producir especies metálicas solubles iónicas y otras, que contengan dicho metal en medio acuoso, bajo un conjunto de condiciones normalizadas de laboratorio que representen las que generalmente se dan en el medio ambiente. Una vez obtenida, se puede usar esa información para evaluar la toxicidad acuática a corto y largo plazo del metal o del compuesto metálico poco soluble del cual proceda la especie soluble. Este documento es el resultado de una labor internacional, bajo los auspicios de la OCDE, encaminada a desarrollar un procedimiento para evaluar la toxicidad e interpretar los datos de metales y compuestos metálicos inorgánicos poco solubles (referencia 1 de este anexo y sección A9.7 del anexo 9). Como resultado de reuniones y discusiones recientes celebradas en la OCDE y la UE, se han realizado y publicado trabajos experimentales (referencias 5 a 11) sobre varios metales y compuestos metálicos en los que se basa este documento guía.

A10.1.2 La evaluación de la toxicidad acuática a corto y largo plazo de metales y compuestos metálicos poco solubles se hace comparando a) la concentración del ión metálico en disolución, producida durante la transformación o disolución en un medio acuoso normalizado con b) los valores de referencia pertinentes de ecotoxicidad obtenidos con la sal metálica soluble (toxicidad aguda y crónica). El presente documento es una guía para realizar los ensayos de transformación/disolución. El procedimiento que hay que seguir al clasificar los peligros para el medio ambiente mediante el protocolo de disolución/transformación queda fuera del ámbito de este documento guía y se describe en el anexo 9, sección A9.7.

A10.1.3 En este documento guía las transformaciones de metales y compuestos metálicos poco solubles se definen y caracterizan dentro del contexto del ensayo como sigue:

- a) Los metales, M^0 , en estado elemental, no son solubles en agua, pero pueden transformarse en su forma disponible. En otras palabras, un metal en estado elemental puede, al reaccionar con el medio, formar cationes o aniones solubles; en ese proceso, el metal se oxida, es decir, pasa de un estado de oxidación cero (neutro) a uno de oxidación superior;
- b) En un compuesto metálico simple, un óxido o un sulfuro, el metal se encuentra ya en estado oxidado, de tal suerte que es improbable que se oxide más cuando el compuesto se introduce en un medio acuoso. No obstante, si el estado de oxidación no cambia, la interacción con el medio puede producir otras formas solubles. Se considera que un compuesto metálico poco soluble es el que produce una pequeña cantidad de la forma disponible por disolución y del que se puede calcular su producto de solubilidad. Hay que reconocer, sin embargo, que la concentración de la disolución final puede verse influida por varios factores, como el producto de solubilidad de ciertos compuestos metálicos precipitados durante el ensayo de transformación/disolución, por ejemplo el hidróxido de aluminio.

A10.2 Principios

A10.2.1 Este documento guía se propone proporcionar un protocolo normalizado para los ensayos de transformación/disolución en laboratorio; ese protocolo se basa en un procedimiento experimental sencillo consistente en agitar diferentes cantidades de la sustancia de ensayo en un medio acuoso regulado en pH y tomar y analizar muestras a intervalos de tiempo fijos, a fin de determinar la concentración de los iones metálicos disueltos en el agua. Seguidamente se describen dos tipos de ensayos.

¹ *Publicaciones de la OCDE sobre el medio ambiente, la salud y la seguridad; Serie de ensayos y evaluaciones, N° 29, Dirección del Medio Ambiente, Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos, abril de 2001.*

A10.2.2 *Ensayo preliminar de transformación/disolución – compuestos metálicos poco solubles*

A10.2.2.1 En los compuestos metálicos poco solubles, la concentración máxima de metal disuelto puede determinarse con el límite de solubilidad del compuesto metálico o mediante un ensayo preliminar de selección. La finalidad del ensayo preliminar de selección, efectuado con una carga única del producto del ensayo, es identificar los compuestos que se disuelven o que se transforman rápidamente, de tal modo que su potencial de ecotoxicidad no puede distinguirse del de las formas solubles.

A10.2.2.2 Los compuestos metálicos poco solubles en forma de las más pequeñas partículas comercializadas se introducen en un medio acuoso con una carga única de 100 mg/l. La disolución se obtiene mediante agitación de ese medio durante 24 horas. Al cabo de ese período, se mide la concentración del ión metálico disuelto.

A10.2.3 *Ensayo principal de transformación/disolución – metales y compuestos metálicos poco solubles*

A10.2.3.1 El ensayo principal de transformación/disolución sirve para determinar el grado de disolución o transformación de metales y compuestos metálicos transcurrido un cierto período, para diferentes cantidades introducidas en la fase acuosa. Normalmente, las formas masivas y/o en polvo se introducen en el medio acuoso a tres concentraciones diferentes: 1, 10 y 100 mg/l. Si no se prevé una aparición apreciable de especie metálica disuelta cabe usar una sola carga de 100 mg/l. La transformación/disolución se lleva a cabo con un procedimiento de agitación normalizado que no cause la abrasión de las partículas. El resultado de ese proceso a corto plazo se calcula en función de la concentración en iones metálicos disueltos obtenida transcurrido un período de 7 días. En cuanto al resultado a largo plazo, se determina con un ensayo de 28 días, efectuado con una concentración única de 1 mg/l.

A10.2.3.2 Como el pH tiene una influencia significativa en la transformación/disolución, el ensayo preliminar y el ensayo principal deberían en principio llevarse a cabo a un pH que maximizara la concentración de los iones metálicos disueltos. Habida cuenta de las condiciones que existen, por lo general, en el medio natural, es necesario aplicar un rango de pH de entre 6 y 8,5, salvo en el ensayo principal de 28 días que debe realizarse con un rango de pH comprendido entre 5,5 y 8,5 para reflejar los posibles efectos a largo plazo en los lagos ácidos.

A10.2.3.3 Como además la superficie de las partículas de la muestra influye mucho en la velocidad y extensión de la transformación/disolución, los ensayos con las sustancias en polvo se harán con las partículas más pequeñas comercializadas, mientras que las muestras en forma masiva se realizarán con un tamaño de partículas representativo de las manipulaciones y utilizaciones normales. A falta de esa información, se empleará un diámetro por defecto de 1 mm. En el caso de metales en forma masiva, ese valor por defecto sólo podrá superarse cuando esté suficientemente justificado. Será necesario determinar la superficie específica para poder caracterizar y comparar muestras semejantes.

A10.3 **Aplicabilidad del ensayo**

Este ensayo se aplica a todos los metales y compuestos metálicos inorgánicos poco solubles. Las excepciones, como en el caso de ciertos metales que reaccionan con el agua, tienen que justificarse.

A10.4 **Información sobre la sustancia de ensayo**

En los ensayos de transformación/disolución, hay que utilizar las sustancias tal como se encuentran en el mercado. Para interpretar correctamente los resultados, será necesario obtener la información siguiente sobre la sustancia o las sustancias de ensayo:

- a) Nombre, fórmula y utilización de la sustancia en el mercado;
- b) Método fisicoquímico de preparación;
- c) Identificación del lote que se somete a ensayo;
- d) Características químicas: pureza total (%) e impurezas específicas (% o ppm);
- e) Densidad (g/cm^3) o peso específico;
- f) Superficie específica (m^2/g) – medida por adsorción-desorción de N_2 según el procedimiento BET (Brunauer, Emmett y Teller) o una técnica equivalente;
- g) Almacenamiento, fecha de caducidad;

- h) Datos conocidos sobre la solubilidad y los productos de solubilidad;
- i) Identificación de los peligros y precauciones en la manipulación;
- j) Fichas de datos de seguridad (FDS) del material o información equivalente.

A10.5 Descripción del método de ensayo

A10.5.1 Material y reactivos

A10.5.1.1 Para llevar a cabo los ensayos se necesitan el material y los reactivos siguientes:

- a) Frascos de cristal de recogida de las muestras provistos de un dispositivo de cierre, lavados previamente y aclarados con ácido (véase A10.5.1.2);
- b) Medio de transformación/disolución (ISO 6341) (véase A10.5.1.3);
- c) Dispositivos para tamponar la disolución de ensayo (véase A10.5.1.4);
- d) Agitadores: agitador helicoidal, agitador con palas verticales, agitador de laboratorio o aparato equivalente (véase A10.5.1.5);
- e) Filtros apropiados (por ejemplo, Acrodisc de 0,2 µm) o centrifugadora para la separación sólido/líquido (véase A10.5.1.7); el filtro Acrodisc debe enjuagarse abundantemente por lo menos tres veces con medio líquido limpio para evitar la presencia de una cantidad elevada de metales traza en la muestra en el tiempo 0;
- f) Dispositivo de regulación de la temperatura de los reactores a $\pm 1,5^{\circ}\text{C}$ en el intervalo comprendido entre 20 y 23°C, tal como una cabina de temperatura controlada o un baño maría;
- g) Jeringas y/o pipetas automáticas;
- h) pH-metro que de resultados fiables en un intervalo de 0,2 unidades de pH;
- i) Aparato para medir el oxígeno disuelto con indicador de temperatura;
- j) Termómetro o termopar; y
- k) Equipo para analizar metales (por ejemplo espectrómetro de absorción atómica, espectrómetro de emisión de plasma axial acoplado por inducción) de exactitud aceptable, de preferencia con un límite de cuantificación cinco veces inferior al valor de referencia de la ecotoxicidad crónica más bajo.

A10.5.1.2 Todo el material de vidrio deberá limpiarse cuidadosamente, según las prácticas normalizadas de laboratorio, enjuagarse con ácido (por ejemplo HCl) y después con agua desionizada. El reactor experimental (cubeta de uno a dos litros) deberá ser lo suficientemente grande como para contener esas cantidades de medio acuoso sin que el líquido se desborde durante la agitación estipulada. Si el medio está tamponado respecto del aire (ensayos hechos a pH 8), se aconseja aumentar la capacidad de tamponamiento del medio mediante un incremento de la relación espacio libre /líquido (por ejemplo, 1 l de medio en un recipiente de 2,8 l).

A10.5.1.3 Debería utilizarse un agua reconstituida conforme a la norma ISO 6341², como medio de transformación/disolución normalizado. El medio deberá estar esterilizado por filtración (0,2 µm) antes de emplearse en

² A efectos de la clasificación de los peligros, los resultados obtenidos con el protocolo de disolución/transformación se comparan con los datos de ecotoxicidad existentes para metales y compuestos metálicos. No obstante, cuando se trata de validar datos, podrá estar indicado en algunos casos usar el medio acuoso de un ensayo de transformación (finalizado) directamente en un ensayo de ecotoxicidad de la OCDE sobre dafnias y peces (Directrices 202 o 203). Si las concentraciones de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ del medio de transformación se reducen

los ensayos. La composición química del medio de transformación/disolución normalizado (para ensayos hechos a pH 8 o superior) es la siguiente:

NaHCO ₃ :	65,7 mg/l
KCl:	5,75 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O:	294 mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O:	123 mg/l

En A10.5.1.7 figuran las composiciones químicas adaptadas a los ensayos efectuados con valores de pH inferiores.

A10.5.1.4 *La concentración de carbono orgánico total en el medio no deberá rebasar los 2,0 mg/l.*

A10.5.1.5 Además del medio de agua dulce, también se puede utilizar un medio marino normalizado si se prevé que la solubilidad o la transformación del compuesto metálico se verán significativamente afectadas por el elevado contenido en cloruros o por otras características químicas propias del agua de mar y si se dispone de datos experimentales de toxicidad en especies marinas. Cuando se emplee agua de mar, la composición química del medio marino normalizado será la siguiente:

NaF:	3 mg/l
SrCl ₂ ·6H ₂ O:	20 mg/l
H ₃ BO ₃ :	30 mg/l
KBr:	100 mg/l
KCl:	700 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O:	1,47 g/l
Na ₂ SO ₄ :	4,0 g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O:	10,78 g/l
NaCl:	23,5 g/l
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O:	20 mg/l
NaHCO ₃ :	200 mg/l

La salinidad deberá ser $34 \pm 0,5$ g/kg y el pH deberá ser $8,0 \pm 0,2$. El agua de mar reconstituida deberá también depurarse de toda traza de metales (ASTM E 729-96).

A10.5.1.6 Los ensayos de transformación/disolución deben llevarse a cabo a un pH que maximice la concentración de los iones metálicos disueltos en el intervalo del pH prescrito. Se usará un rango de pH de 6 a 8,5 en el ensayo preliminar y en el de 7 días, y un rango de 5,5 a 8,5 en el ensayo principal de 28 días (véase A10.2.3.2).

A10.5.1.7 El medio podrá taponarse a pp. 8 mediante un equilibrio con el aire, en el que la concentración de CO₂ proporcione una capacidad de tamponamiento suficiente para mantener el pH en un promedio de $\pm 0,2$ unidades durante un período de una semana (referencia 7, anexo 10). Para mejorar la capacidad de tamponamiento del aire del medio acuoso cabe aumentar la relación espacio libre/líquido.

En la tabla A10.1 figuran las composiciones químicas recomendadas para ajustar el medio líquido a pH 6 y 7 y hasta un pH de 8 y 8,5, así como las concentraciones de CO₂ que hay que mantener en el aire que se insufla a través de la superficie libre por encima del líquido, y los valores calculados del pH a esas condiciones.

a una quinta parte de las del medio ISO 6341, podrá también utilizarse el medio final del ensayo de transformación (después de haber añadido micronutrientes) en el ensayo de ecotoxicidad con algas (Directriz 201).

Tabla A10.1: Composición química recomendada del medio de ensayo

Composición química del medio	NaHCO ₃	6,5 mg/l	12,6 mg/l	64,75 mg/l	194,25 mg/l
	KCl	0,58 mg/l	2,32 mg/l	5,75 mg/l	5,74 mg/l
	CaCl ₂ .2H ₂ O	29,4 mg/l	117,6 mg/l	294 mg/l	29,4 mg/l
	MgSO ₄ .7H ₂ O	12,3 mg/l	49,2 mg/l	123,25 mg/l	123,25 mg/l
Concentración de CO ₂ (el resto es aire) en el recipiente de ensayo		0,50%	0,10%	0,038% (aire)	0,038% (aire)
pH calculado		6,09	7,07	7,98	8,5

NOTA 1: Los valores del pH se calculan usando el sistema FACT (Facility for the Analysis of Chemical Thermodynamics), (<http://www.crct.polymtl.ca/fact/fact.htm>).

NOTA 2: Aunque el protocolo sólo se ha validado para el intervalo de pH de 6,0 a 8,0, esta tabla no impide alcanzar un pH de 5,5. La composición correspondiente al pH 8,5 no se ha verificado experimentalmente en presencia de metales.

A10.5.1.8 Para tamponar el medio líquido pueden usarse otros métodos equivalentes si el tampón elegido sólo ejerce una influencia mínima en la velocidad de transformación y especiación química de la fracción metálica disuelta. El pH no debe ajustarse durante el ensayo utilizando un ácido o una base.

A10.5.1.9 Durante los ensayos principales de transformación/disolución, deberá recurrirse a una agitación suficiente para mantener el flujo del medio acuoso en la sustancia de ensayo y preservar la integridad de la superficie de esa sustancia y de todos los productos de reacción sólidos que se formen en dicha superficie durante el ensayo. Para 1 l de medio acuoso, esto puede lograrse con el uso de:

- un agitador de palas verticales que gire a 200 vueltas por minuto, con las palas dispuestas a 5 cm del fondo de una cubeta de ensayo de 1 l. Los agitadores de palas verticales radiales consisten en dos palas de polipropileno de 40 mm de ancho por 15 mm de alto insertadas en un eje de acero recubierto de PVC de 8 mm de diámetro y de 350 mm de largo; o
- una cubeta de 1,0 a 3,0 l cerrada con un tapón de caucho y colocada en un agitador orbital o un agitador de laboratorio ajustado a 100 vueltas por minuto.

Se puede emplear otros métodos de agitación suave siempre que se cumplan los criterios de integridad de la superficie de la sustancia de ensayo y la homogeneidad de la disolución.

A10.5.1.10 La elección del método de separación sólido-líquido dependerá de que los iones metálicos solubles se adsorban en los filtros y de que el método de agitación prescrito en A10.5.1.9 entrañe o no una suspensión, lo que a su vez dependerá de la distribución del tamaño de las partículas y de su densidad. En sólidos de densidad superior a 6 g/cm³ aproximadamente, y cuyas partículas sean tan pequeñas que el 50 % < 8 µm, la experiencia ha mostrado que es poco probable que los métodos de agitación suave descritos en A10.5.1.9 provoquen suspensiones. En consecuencia, la filtración de una muestra a través de un filtro de membrana de poliéter sulfónico hidrófilo de 25 mm de diámetro y 0,2 µm (con la posibilidad de recubrirla de un prefiltro de 0,8 µm) conducirá a una disolución básicamente exenta de sólidos.

No obstante, en el caso de que se produzcan suspensiones, al detenerse la agitación durante unos 5 minutos, las partículas en suspensión se depositarán y podrá tomarse una muestra de la disolución.

A10.5.2 *Requisitos previos*

A10.5.2.1 *Método de análisis*

Para el estudio es fundamental un método debidamente validado que analice los metales disueltos totales. El límite de detección analítica debe ser inferior al valor pertinente obtenido con ensayos de ecotoxicidad crónica o a largo plazo.

Para la validación analítica habrá que señalar al menos los aspectos siguientes:

- a) Límite de detección y cuantificación del método analítico;
- b) Intervalo de linealidad analítica en el rango analítico aplicable;
- c) Ensayo control (blanco) sobre el medio de transformación (puede hacerse durante los ensayos);
- d) Efecto matricial del medio de transformación sobre la medición del ión metálico disuelto;
- e) Balance de masas (%) al final del ensayo de transformación;
- f) Reproducibilidad de los análisis;
- g) Propiedades de adsorción de los iones metálicos solubles sobre los filtros (si la filtración se utiliza para separar los iones metálicos solubles del metal sólido).

A10.5.2.2 *Determinación del pH apropiado del medio de disolución*

Si no existen datos en los trabajos publicados puede necesitarse un ensayo preliminar para asegurar que el ensayo se hace a un pH que maximice la transformación/disolución en el rango de pH descrito en A10.2.3.2 y A10.5.1.6.

A10.5.2.3 *Reproducibilidad de los resultados de la transformación*

A10.5.2.3.1 Para un montaje normalizado de tres ensayos iguales en cubeta y de dos muestras por cubeta en cada período de muestreo, es razonable prever que con una cantidad constante de sustancia, sometida a ensayo en un estrecho rango de tamaño de partícula (por ejemplo, 37 a 44 μm) y de superficie total, la variación en la misma cubeta de los datos de transformación debería ser $< 10\%$ y la variación entre cubetas $< 20\%$ (referencia 5 de este anexo).

A10.5.2.3.2 Para estimar la reproducibilidad del ensayo de transformación, seguidamente se dan algunas indicaciones. Los resultados pueden usarse para mejorar en su caso esa reproducibilidad ajustando el montaje final de ensayo, variando el número de cubetas replicadas iguales y/o de muestras replicadas o seleccionando mejor las partículas. Los ensayos preliminares también permiten una primera evaluación de la tasa de transformación de la sustancia de ensayo y pueden utilizarse para establecer la frecuencia de muestreo.

A10.5.2.3.3 Al preparar el medio de transformación/disolución, su pH deberá ajustarse al valor deseado (tamponamiento con aire o CO_2) agitándolo durante una media hora, a fin de lograr que el medio acuoso esté en equilibrio con la atmósfera que hace de tampón. Se tomarán al menos tres muestras (por ejemplo, de 10 a 15 ml) del medio de ensayo antes de agregar la sustancia y se medirán las concentraciones de metal disuelto que se consideren como controles y de fondo.

Al menos cinco de las cubetas de los experimentos, que contengan el metal o el compuesto metálico (por ejemplo 100 mg de sólido/l de medio), se agitarán de conformidad con las instrucciones del párrafo A10.5.1.9, a una temperatura de $\pm 1,5\text{ }^\circ\text{C}$ en el rango de $20 - 23\text{ }^\circ\text{C}$, y se tomarán tres muestras con jeringa en cada cubeta experimental al cabo de 24 horas. El sólido y la disolución se separan mediante un filtro de membrana tal como se describe en A10.5.1.10, y la disolución se acidifica con una o dos gotas de HNO_3 para análisis de trazas de metal con el pH de referencia 1 y se analiza la concentración total del metal disuelto.

A10.5.2.3.4 Se calculan las medias y coeficientes de variación de las concentraciones medidas de metal disuelto en el interior de una misma cubeta y entre cubetas.

A10.5.2.3.5 Para asegurar la reproducibilidad de los datos de transformación, se recomienda que:

- a) Los nuevos laboratorios utilicen un conjunto de sustancias de referencia;
- b) Como control estándar se emplee un metal en polvo con condiciones de superficie especificadas; y
- c) Uno o dos laboratorios se encarguen de las sustancias químicas de referencia.

Puede ser necesario controlar determinadas partes de la superficie de los polvos.

A10.5.3 Realización de los ensayos**A10.5.3.1 Ensayo preliminar de disolución – compuestos metálicos poco solubles**

A10.5.3.1.1 Una vez preparado, el medio de disolución se reparte al menos en tres cubetas (este número dependerá de la reproducibilidad obtenida en el ensayo preliminar). Después de media hora de agitación para llevar el medio acuoso al equilibrio con la atmósfera o con el sistema de tamponamiento (véanse A10.5.1.6 a A10.5.1.8), se miden el pH, la temperatura y las concentraciones de O₂ disuelto en el medio. Seguidamente se toman al menos dos muestras de 10 – 15 ml del medio de ensayo (antes de agregar los sólidos) y se mide la concentración de metal disuelto como control y antecedentes.

A10.5.3.1.2 Se añade el compuesto metálico a la cubeta de ensayo con una carga de 100 mg/l, y los recipientes se cubren y se agitan rápida y vigorosamente. Tras 24 horas de agitación, se miden el pH, la temperatura y las concentraciones de O₂ disuelto en cada cubeta, y se toman con una jeringa de dos a tres muestras de la disolución en cada cubeta y la disolución se pasa por un filtro de membrana tal como se describe más arriba en A10.5.1.10. Se acidifica (por ejemplo, con 1% de HNO₃) y se analiza para determinar la concentración total de metal disuelto.

A10.5.3.2 Ensayo principal – metales y compuestos metálicos**A10.5.3.2.1 Repítase el procedimiento del párrafo A10.5.3.1.1**

A10.5.3.2.2 En el ensayo de 7 días, se añade sustancia en cargas de 1, 10, 100 mg/l, respectivamente, a las cubetas de ensayo (cuyo número dependerá de la reproducibilidad, tal como se establece en el párrafo A10.5.2.3) que contienen el medio acuoso. Las cubetas se cierran y se agitan tal como se describe en A10.5.1.9. Si se quiere una mayor duración, el ensayo con una carga de 1 mg/l podrá ampliarse a 28 días, siempre que se tome el mismo valor de pH en los ensayos tanto de 7 como de 28 días. No obstante, como los primeros sólo se hacen con valores de pH iguales o superiores a 6, se necesitarán ensayos adicionales de 28 días para abarcar el rango de pH comprendido entre 5,5 y 6. También será útil incluir un ensayo paralelo de control sin carga de sustancia (es decir, sin disolución de ensayo). A intervalos de tiempo fijados (por ejemplo, 2 horas, 6 horas, 1, 4 y 7 días), se miden en cada cubeta la temperatura, el pH y las concentraciones de O₂ disuelto, y se toman al menos dos muestras (por ejemplo, 10 a 15 ml) con jeringa de cada cubeta. Las fracciones sólidas y disueltas se separan como en A10.5.1.10 anterior. Las soluciones se acidifican (por ejemplo, con 1 % de HNO₃) y se analizan para medir la concentración de metal disuelto. Al cabo de las primeras 24 horas, se volverá al volumen inicial de disolución añadiendo un volumen del medio de disolución igual al retirado. Repítase esto después de cada muestreo. El volumen máximo total tomado de las soluciones no debería ser superior al 20 % del volumen inicial de la disolución de ensayo. El ensayo podrá detenerse cuando se obtengan sucesivamente tres valores de la concentración total de metal disuelto que no varíen más del 15 %. La duración máxima de los ensayos para cargas de 10 y 100 mg/l será de 7 días (ensayo a corto plazo) y de 28 días para la carga de 1 mg/l (ensayo a largo plazo).

A10.5.4 Condiciones de ensayo

A10.5.4.1 Los ensayos de transformación/disolución deberían hacerse a temperatura ambiente controlada de $\pm 1,5$ °C en el rango de 20 – 23 °C.

A10.5.4.2 Esos ensayos tienen que realizarse con los valores del pH descritos en A10.2.3.2 y A10.5.1.6. El pH debería medirse en cada intervalo de muestreo de la disolución. Cabe esperar que se mantenga constante ($\pm 0,2$ unidades) durante casi todo el ensayo, aunque se han encontrado algunas variaciones de corta duración con cargas de 100 mg/l de polvos finos reactivos (referencia 7 de este anexo), por causa de las propiedades intrínsecas de la sustancia cuando se encuentra finamente dividida.

A10.5.4.3 Por encima del medio acuoso, el espacio que queda libre en la cubeta de reacción debería ser el adecuado para mantener la concentración de oxígeno disuelto por encima de aproximadamente 6,0 mg/l, que es el 70% del nivel de saturación de 8,5 mg/l. No obstante, en ocasiones, la cinética de reacción puede verse limitada, no por la disponibilidad de oxígeno molecular en el espacio libre encima de la disolución, sino por la transferencia de oxígeno disuelto a través de la interfase sólido-disolución y por la desaparición del producto de reacción de esa interfase. En tal caso, poco se puede hacer, salvo esperar que se restablezca el equilibrio.

A10.5.4.4 Para reducir la contaminación química y biológica, así como la evaporación, las cinéticas de transformación/disolución deben hacerse en recipientes cerrados y en la oscuridad, siempre que sea posible.

A10.6 Tratamiento de los resultados**A10.6.1 Ensayo preliminar**

Se calculan las concentraciones medias de metal disuelto en 24 horas (con intervalos de confianza).

A10.6.2 Ensayo principal: Determinación del alcance de la transformación/disolución**A10.6.2.1 Ensayo a corto plazo**

Las concentraciones de metal disuelto, medidas durante los diferentes ensayos cortos (7 días), se representan gráficamente en relación con el tiempo y, de ser posible, se determinan las cinéticas de la transformación/disolución. Pueden usarse los siguientes modelos cinéticos para describir las curvas de transformación/disolución:

a) Modelo lineal:

$$C_t = C_0 + kt, \text{ mg/l}$$

donde:

$$\begin{aligned} C_0 &= \text{concentración total inicial de metal disuelto (mg/l) a tiempo } t = 0; \\ C_t &= \text{concentración total de metal disuelto (mg/l) a tiempo } t; \\ k &= \text{constante de velocidad lineal, mg/l días.} \end{aligned}$$

b) Modelo de primer orden:

$$C_t = A (1 - e^{-kt}), \text{ mg/l}$$

donde:

$$\begin{aligned} A &= \text{concentración límite de metal disuelto (mg/l) en equilibrio aparente = constante;} \\ C_t &= \text{concentración total de metal disuelto (mg/l) a tiempo } t; \\ k &= \text{constante de velocidad de primer orden, 1/días.} \end{aligned}$$

c) Modelo de segundo orden:

$$C_t = A (1 - e^{-at}) + B (1 - e^{-bt}), \text{ mg/l}$$

donde:

$$\begin{aligned} C_t &= \text{concentración total de metal disuelto (mg/l) a tiempo } t; \\ a &= \text{constante de velocidad de primer orden, 1/días;} \\ b &= \text{constante de velocidad de segundo orden, 1/días;} \\ C &= A + B = \text{concentración límite de metal disuelto (mg/l).} \end{aligned}$$

d) Ecuación de la cinética de reacción:

$$C_t = a [1 - e^{-bt} - (c/n) \{1 + (be^{-nt} - ne^{-bt})/(n - b)\}], \text{ mg/l}$$

donde:

$$\begin{aligned} C_t &= \text{concentración total de metal disuelto (mg/l) a tiempo } t; \\ a &= \text{coeficiente de regresión (mg/l);} \\ b, c, d &= \text{coeficientes de regresión (1/día);} \\ n &= c + d. \end{aligned}$$

También se pueden aplicar otras ecuaciones de la cinética de reacción (referencias 7 y 8 de este anexo).

Para cada una de las cubetas iguales del ensayo de transformación, se estimarán esos parámetros del modelo mediante análisis de regresión. Este proceder evita posibles problemas de correlación entre mediciones sucesivas de la misma cubeta. Los valores medios de los coeficientes pueden compararse mediante un análisis estándar

de la varianza si al menos se usan en el ensayo tres cubetas iguales. El coeficiente de determinación, r^2 , se considera una medida de la “bondad del ajuste” del modelo.

A10.6.2.1 *Ensayo a largo plazo*

Las concentraciones de metal disuelto, medidas con la carga de 1 mg/l durante el ensayo de 28 días, se representan gráficamente respecto del tiempo y se determinan las cinéticas de la transformación/disolución, de ser posible tal como se describe en A10.6.1 y A10.6.2.

A10.7 *Informe del ensayo*

En el informe del ensayo debería figurar (aunque sin limitarse a ella) la información siguiente (véanse también A10.4 y A10.5.2.1):

- a) Identificación del patrocinador y de la instalación donde se hace el ensayo;
- b) Descripción de la sustancia que se somete a ensayo;
- c) Descripción del medio de ensayo reconstituido y de las cargas de metal;
- d) Sistema de tamponamiento del medio de ensayo utilizado y validación del pH empleado (como en A10.2.3.2 y A10.5.1.6 a A10.5.1.8) y descripción del método de análisis;
- e) Descripciones detalladas del material y el procedimiento del ensayo;
- f) Preparación de la disolución de metal normalizada;
- g) Resultados de la validación del método;
- h) Resultados del análisis de las concentraciones de metal, del pH, de la temperatura y del oxígeno;
- i) Fecha de los ensayos y de los análisis en diferentes intervalos de tiempo;
- j) Concentración media del metal disuelto a diferentes intervalos de tiempo (con intervalos de confianza);
- k) Curvas de transformación (metal disuelto total en función del tiempo);
- l) Resultados de las cinéticas de transformación/disolución, si se determinan;
- m) Estimación de la ecuación de la cinética de reacción, si se determina;
- n) Desviaciones del plan de estudio de haberse producido y sus causas;
- o) Cualesquiera circunstancias que puedan haber afectado a los resultados; y
- p) Referencia a los datos anteriores y a los datos sin procesar.

Anexo 10

APÉNDICE

Referencias

1. “Draft Report of the OECD Workshop on Aquatic Toxicity Testing of Sparingly Soluble Metals, Inorganic Metal Compounds and Minerals”, 5 a 8 de septiembre, 1995, Ottawa.
2. OCDE, Reunión del Grupo de trabajo sobre los metales, París, 18 y 19 junio de 1996.
3. Oficina Europea de Sustancias Químicas. Meeting on Testing Methods for Metals and Metal Compounds, Ispra, 17 y 18 de febrero de 1997.
4. OCDE, Reunión del Grupo de trabajo sobre los metales, París, 14 y 15 de octubre de 1997.
5. LISEC¹ (Personal del), Informe final sobre “Transformation/dissolution of metals and sparingly soluble metal compounds in aqueous media - zinc”, LISEC no. BO-015 (1997).
6. J.M. Skeaff² y D. Paktunc, “Development of a Protocol for Measuring the Rate and Extent of Transformations of Metals and Sparingly Soluble Metal Compounds in Aqueous Media. Phase I, Task 1: Study of Agitation Method.” Informe final, enero de 1997. Mining and Mineral Sciences Laboratories Division Report 97-004(CR)/Contract No. 51545.
7. Jim Skeaff y Pierrette King, “Development of a Protocol For Measuring the Rate and Extent of Transformations of Metals and Sparingly Soluble Metal Compounds in Aqueous Media. Phase I, Tasks 3 and 4: Study of pH and of Particle Size/Surface Area.”, Informe final, diciembre de 1997. Mining and Mineral Sciences Laboratories Division Report 97-071(CR)/Contract No. 51590.
8. Jim Skeaff y Pierrette King, Development of Data on the Reaction Kinetics of Nickel Metal and Nickel Oxide in Aqueous Media for Hazard Identification, Informe final, enero de 1998. Mining and Mineral Sciences Laboratories Division Report 97-089(CR)/Contract No. 51605.
9. LISEC (Personal del), Informe final sobre “Transformation/dissolution of metals and sparingly soluble metal compounds in aqueous media - zinc oxide”, LISEC no. BO-016 (enero de 1997).
10. LISEC (Personal del), Informe final sobre “Transformation/dissolution of metals and sparingly soluble metal compounds in aqueous media - cadmium”, LISEC no. WE-14-002 (enero de 1998).
11. LISEC (Personal del), Informe final sobre “Transformation/dissolution of metals and sparingly soluble metal compounds in aqueous media - cadmium oxide”, LISEC no. WE-14-002 (enero de 1998).

Bibliografía

1. Directrices de la OCDE para los ensayos de productos químicos, París (1984). Directriz 201 (1984): Alga, Growth Inhibition test.
2. Directriz 202 (1984): Daphnia sp. Acute Immobilization Test and Reproduction Test.
3. Directriz 203 (1994): Fish, Acute Toxicity Test.
4. Directriz 204 (1992): Fish, Prolonged Toxicity Test: 14 – Day study³
5. Directriz 210 (1992): Fish, Early-Life Stage Toxicity Test.
6. Norma internacional ISO 6341 (1989 (E)). Calidad de agua - Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea).

¹ LISEC, Craenevenne 140, 3600 Genk, Bélgica.

² CANMY, Ressources naturelles Canada, 555 Booth St., Ottawa, Canadá K1A 0G1.

³ Esta directriz de ensayo se ha cancelado, pero puede seguir utilizándose hasta el 2 de abril de 2014.