

Determinación de fibras de amianto y otras fibras en aire. método del filtro de membrana / Microscopía óptica de contraste de fases. (Método multifibra)

MTA/MA-051/A04

Nota: recomendamos consultar el criterio/recomendación [CR-02/2005](#). Medida fiable de las concentraciones de fibras de amianto en aire. Aplicación del método de toma de muestras y análisis MTA/MA-051/A04.

Palabras clave: Amianto, fibras, aire, concentración ambiental, descontaminación, recuento, microscopía óptica.

Este método reemplaza al [MTA/MA-010/A87](#): Determinación de fibras de amianto en aire - Método del filtro de membrana / Microscopía óptica, y al [MTA/MA-033/A94](#): Determinación de fibras minerales artificiales en aire - Método del filtro de membrana / Microscopía óptica.

(Ver Anexos 1 y 2 del Real Decreto 396/2006)

Índice

0. INTRODUCCIÓN

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

2. DEFINICIONES

3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

4. REACTIVOS Y PRODUCTOS

4.1. Acetona

4.2. Triacetato de glicerina (triacetina)

4.3. Etanol

4.4. Agua desionizada

5. APARATOS Y MATERIAL

5.1. Equipo y material para la toma de muestra

5.2. Equipo y material para la preparación de la muestra

5.3. Equipo y material para el análisis (recuento de fibras)

6. TOMA DE MUESTRAS

6.1. Procedimiento de muestreo

6.2. Caudal de muestreo y duración de una muestra

6.3. Almacenamiento y transporte

7. ANÁLISIS

7.1. Preparación de la muestra

7.2. Calibrado y ajuste del microscopio

7.3. Procedimiento para el recuento y medida de las fibras

8. BLANCOS

8.1. Blancos de lote

8.2. Blancos de campo

8.3. Blancos de laboratorio

9. CÁLCULOS

9.1. Determinación del número total de fibras en la muestra

9.2. Determinación de la concentración de fibras en aire

10. PRECISIÓN, EXACTITUD Y LÍMITE DE DETECCIÓN

10.1. Precisión

10.2. Exactitud

10.3. Límite de detección

11. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

12. BIBLIOGRAFÍA

ANEXO A: Procedimientos para la obtención de vapor de acetona

A.1 Método del bloque caliente

A.2 Método de la caldera

A.3 Método de evaporación por reflujo o del refrigerante de reflujo

ANEXO B: Índices de refracción de algunas fibras empleadas industrialmente

ANEXO C: Especificaciones para la adquisición y calibrado de la retícula de ocular

C.1 Especificaciones de la retícula

C.2 Calibración de la retícula

ANEXO D: Medida del caudal de la bomba de muestreo y calibración de los medidores de caudal

D.1 Medida del caudal (calibración de la bomba)

D.2 Calibración de los medidores de caudal (caudalímetros)

ANEXO E: Muestreo en un punto fijo

E.1 Objetivo de los muestreos en un punto fijo

E.2 Toma de muestra

E.3 Criterios de recuento

ANEXO F: Determinación de la superficie efectiva del filtro

0. INTRODUCCIÓN

Este método está elaborado de acuerdo con el método "Determinación de la concentración de fibras suspendidas en el aire. Método basado en la microscopía óptica de contraste de fase" de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1997) (12.1.), que es aplicable a cualquier tipo de fibra (método multifibra). El método de la OMS es un procedimiento fiable para obtener los datos necesarios para determinar las concentraciones de fibras en el aire y se ha promovido su uso internacional para obtener resultados comparables cuando se utilice en distintos laboratorios y por diferentes analistas. El método de la OMS está recomendado para el recuento de fibras de amianto en la [Directiva 2003/18/CE](#) que modifica la [Directiva 83/477/CEE](#) sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición al amianto durante el trabajo (12.2.).



1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este método describe el procedimiento a seguir y el equipo necesario para determinar la concentración de fibras en aire expresada en número de fibras por centímetro cúbico, mediante la captación en filtro de membrana y recuento por microscopía óptica de contraste de fases. Este método puede utilizarse para evaluar la exposición personal a las distintas variedades de amianto y a cualquier otro tipo de fibras naturales, artificiales y/o sintéticas. También se puede aplicar para medir la concentración de fibras en el ambiente laboral con el fin de evaluar la eficacia de las medidas de control de procesos y protección colectiva, para la vigilancia de los efectos obtenidos con la modificación de los procedimientos de trabajo y para la detección de fuentes de contaminación. También se puede utilizar en epidemiología.

Este método no permite diferenciar los tipos de fibras por lo que, si se requiere esta identificación, es necesario utilizar otros procedimientos y técnicas analíticas como son la microscopía de luz polarizada y dispersión, la microscopía electrónica de transmisión y de barrido, la difracción de rayos X, el análisis químico, la espectrofotometría infrarroja, etc. Otro inconveniente asociado a este método es el límite de visibilidad que se puede obtener con un microscopio óptico. Así, aunque para un microscopio correctamente ajustado el límite de visibilidad está en torno a $0,13 \mu\text{m} - 0,15 \mu\text{m}$, en la práctica, las fibras visibles más pequeñas son de alrededor de $0,20 \mu\text{m} - 0,25 \mu\text{m}$ de diámetro. Por lo tanto, los resultados obtenidos por este procedimiento representan un índice de la concentración numérica de fibras y no una medida absoluta del número de fibras presentes.

El intervalo de aplicación de este método depende de los requisitos de densidad o concentración aceptable de fibras en la muestra y de los volúmenes de muestreo (véase 6.2. y 10.1.). Exceptuando las situaciones en las que el tiempo de muestreo esté forzosamente limitado, el límite inferior del intervalo de aplicación puede situarse en valores muy bajos. Así por ejemplo, con un muestreo de 1200 litros de aire se puede establecer un límite inferior de medida de $0,02 \text{ fibras/cm}^3$. Por otra parte, la reducción del volumen de muestreo permite llevar el límite superior de dicho intervalo hasta concentraciones muy altas, como por ejemplo 25 fibras/cm^3 con un muestreo de 15 minutos a un caudal de 1 litro/minuto, manteniéndose siempre los citados requisitos de densidad de fibras en la muestra.

El límite de detección de la concentración de fibras en aire depende del límite inferior de recuento de fibras en una muestra y del volumen de aire muestreado, de forma que, si se fija un volumen mínimo de 480 litros, se puede establecer un límite de detección de $0,01 \text{ fibras/cm}^3$. Pueden alcanzarse límites de detección aún más bajos, incrementando proporcionalmente el volumen de muestreo. Por el contrario, es importante resaltar que una reducción del volumen de muestreo da lugar a que el límite de detección se incremente en la misma proporción (véase 10.3.).



2. DEFINICIONES

Para los fines de este método, se aplicarán las siguientes definiciones:

Fibra: Partícula con una longitud $>5 \mu\text{m}$, diámetro o anchura $<3 \mu\text{m}$ y una relación longitud/diámetro >3 .

Campo de recuento: Zona de la superficie del filtro delimitada por la retícula de ocular donde se realiza el recuento de las fibras.

Valores de referencia o de consenso: Valor "verdadero" que caracteriza una cantidad perfectamente definida, en las condiciones existentes cuando se considera esa cantidad (12.3.).

NOTA: El valor verdadero de una cantidad es un concepto teórico y, en general, no se puede conocer exactamente.

Valor límite: Cifra de referencia para la concentración de un agente químico en aire (12.3.).

NOTA: Los valores límite están en su mayor parte establecidos para periodos de referencia de 8 horas.



3. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La muestra se recoge haciendo pasar un volumen conocido de aire a través de un filtro de membrana mediante una bomba de muestreo. El filtro se transparenta con vapor de acetona y se prepara con un líquido de contraste sobre un portaobjetos de microscopía. Utilizando un microscopio de contraste de fases que suministre alrededor de 500 aumentos y, siguiendo unos criterios

preestablecidos, se procede a contar las fibras que se encuentran en un cierto número de campos o áreas determinadas del filtro, elegidos de forma aleatoria.

A partir de las fibras contadas, el número de campos observados y la superficie efectiva del filtro se calcula el número de fibras en la muestra. Del número de fibras en la muestra y del volumen de aire recogido se obtiene la concentración ambiental, expresando el resultado final en fibras por centímetro cúbico de aire.

4. REACTIVOS Y PRODUCTOS

4.1. Acetona de calidad para análisis

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA INFLAMABLE. Frases (R):11. Frases (S): 9-16-23-33 ([Real Decreto 363/1995](#)) (12.4.).

4.2. Triacetato de glicerina (triacetina) con un índice de refracción 1,51.

NOTA: Puede ser suficiente utilizar triacetina de grado laboratorio.

4.3. Etanol para limpieza de portaobjetos y cubreobjetos

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA INFLAMABLE. Frases (R):11. Frases (S): 7-16 ([Real Decreto 363/1995](#)) (12.4.).

4.4. Agua desionizada libre de fibras (12.5.).

5. APARATOS Y MATERIAL

5.1. Equipo y material para la toma de muestra

5.1.1. Muestreador. Está constituido por (véase figura 1):

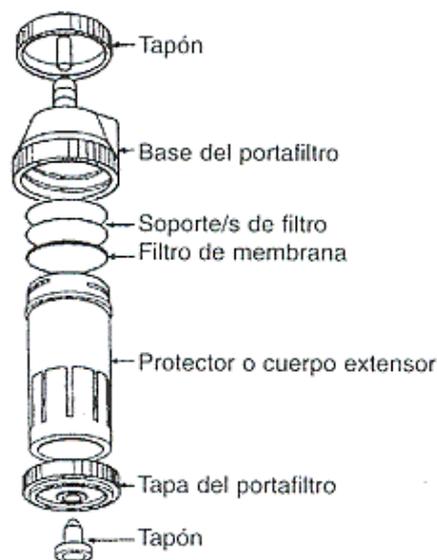
5.1.1.1. Portafiltro para filtro de 25 mm de diámetro. El portafiltro tiene una base y una tapa o cubierta, ambos con tapón de cierre.

5.1.1.2. Protector o cuerpo extensor. Elemento conductor de la electricidad de una longitud entre 1,5 y 3,0 veces el diámetro efectivo del filtro, que se une a la base del portafiltro y que sirve para mejorar la distribución del depósito de polvo y evitar la contaminación accidental. Debe ser metálico o de un material que evite el riesgo de pérdida de fibras por los efectos producidos por cargas electrostáticas.

5.1.1.3. Soporte del filtro. Uno o dos discos de celulosa (dependiendo del modelo de portafiltro) de 25 mm de diámetro para garantizar la distribución uniforme del paso de aire durante la toma de muestra.

5.1.1.4. Filtro de membrana de ésteres de celulosa o nitrato de celulosa de 25 mm de diámetro y un tamaño de poro de 0,8 - 1,2 μm . Es recomendable que presente cuadrícula impresa para la localización de los planos focales en los que se encuentran las fibras. La calidad de los filtros a utilizar se comprobará mediante los blancos de lote como se especifica en el [capítulo 8](#).

FIGURA 1
Vista de los componentes de un muestreador para la captación de fibras en aire



NOTA: Con el fin de reducir al mínimo la contaminación de las muestras, los portafiltros y los protectores estarán perfectamente limpios y libres de fibras por lo que se limpiarán minuciosamente en el caso de que sean reutilizados. Los filtros se manipularán únicamente con pinzas de puntas planas y sólo se sacarán de sus cajas cuando vayan a necesitarse.

5.1.2. Tubo flexible. Tubo de plástico o goma para conectar la bomba de muestreo al muestreador. Debe ser de longitud y diámetro adecuado a fin de evitar estrangulamientos y fugas en las conexiones.

5.1.3. Bomba de muestreo. Bomba capaz de mantener un funcionamiento continuo durante todo el tiempo de muestreo y adecuada al procedimiento establecido. La fluctuación del caudal no debe ser superior a $\pm 10\%$ del valor requerido para caudales < 2 l/min y a $\pm 5\%$ para caudales ≥ 2 l/min.

Para muestreos con caudal volumétrico nominal ≤ 5 l/min se recomiendan bombas para el muestreo personal del tipo P que cumplan los requisitos de la norma UNE EN 1232 (12.6.). Para muestreos con caudales superiores a 5 litros por minuto se recomiendan bombas que cumplan los requisitos de la norma UNE EN 12919 (12.7.).

5.1.4. Medidor de caudal (caudalímetro). Instrumento o sistema que permita medir el caudal de la bomba con una sensibilidad mínima de $\pm 10\%$ para caudales ≤ 2 l/min y de $\pm 5\%$ para caudales > 2 l/min. El medidor de caudal puede ser de burbuja de jabón, de superficie variable, de flotación con apoyo (rotámetro), etc. y debe estar calibrado y ser trazable a patrones nacionales o internacionales.



5.2. Equipo y material para la preparación de la muestra

5.2.1. Portaobjetos de vidrio adecuados al tamaño del filtro (por ejemplo, de 76x25 mm y de 0,8-1,0 mm de espesor).

5.2.2. Cubreobjetos de vidrio adecuados al tamaño del portaobjetos y del filtro con grosor compatible con el diseño del objetivo utilizado (normalmente entre 0,16 y 0,19 mm de espesor).

NOTA: Un grosor incorrecto iría en detrimento de la calidad de la imagen final.

5.2.3. Pinzas para la manipulación del filtro. Deben ser de alta calidad y sin ranuras en la punta. Pueden ser tanto de tipo punta ancha como punta fina.

5.2.4. Dispensador de gotas o micropipeta

5.2.5. Papel especial para limpieza de lentes que no desprenda fibras.

5.2.6. Generador de vapor de acetona para transparentar el filtro. Existen de diferentes tipos siendo los más empleados el evaporador de reflujo, el sistema de caldera y el dispositivo de bloque caliente, también llamado evaporador automático (véase Anexo A).

5.2.7. Horno de plasma que permite emplear un plasma de oxígeno generado mediante radiofrecuencias. Se utiliza para atacar la superficie de los filtros después del transparentado con acetona.

NOTA: Este equipo sólo es necesario en el caso de que las fibras a analizar tengan un índice de refracción (n_f) menor o igual a 1,51 (véase Anexo B).



5.3. Equipo y material para el análisis (recuento de fibras)

5.3.1. Microscopio que cumpla las siguientes especificaciones:

5.3.1.1. Iluminación mediante una fuente de luz Kohler o similar, que ilumine la muestra de manera uniforme.

NOTA: Se recomienda un filtro óptico verde para garantizar las mejores condiciones de contraste de fases, ya que la óptica está diseñada para esta longitud de onda ($\lambda = 500 \text{ nm} - 570 \text{ nm}$).

5.3.1.2. Oculares. Deberán elegirse entre los que dan un aumento total de 400X a 600X, preferiblemente de 500X, que corresponde, por ejemplo, a un objetivo de 40X y ocular de 12,5X. Al menos un ocular debe permitir la inserción de una retícula; es preferible que el ocular sea del tipo enfocable.

5.3.1.3. Telescopio centrador o lente Bertrand para comprobar que los anillos de fase del condensador están centrados con respecto al objetivo.

5.3.1.4. Retícula del ocular para delimitar la superficie de recuento en el filtro. La retícula recomendada es la retícula circular de Walton-Beckett del tipo G-22, concebida expresamente para el recuento de fibras con las dimensiones especificadas en este método. Esta retícula proyecta un círculo de 100 μm de diámetro en el plano del objeto, que corresponde a lo que se denomina campo de recuento. Véase Anexo C para especificación de la retícula.

5.3.1.5. Objetivos. Se dispondrá de objetivos de contraste de fases positivo de 10 y 40 aumentos. El objetivo de 10X se utiliza para el control preliminar de la uniformidad del depósito de polvo en el filtro y la localización de la cuadrícula impresa en el filtro. El objetivo de 40X se emplea para el recuento de fibras, recomendándose que su apertura numérica esté comprendida entre 0,65 y 0,75 (a ser posible de 0,65 a 0,70), y que tenga una absorción del anillo de fases entre el 65 % y el 85 % (preferiblemente 65 % y 75 %).

5.3.1.6. Condensador de contraste de fases Abbe o acromático, en un soporte enfocable y centrable. El ajuste del centrado del anillo de fases tiene que ser independiente del mecanismo de centrado del condensador.

5.3.1.7. Platina con dispositivo mecánico ajustable para desplazamiento X-Y y pinzas de sujeción para el portaobjetos.

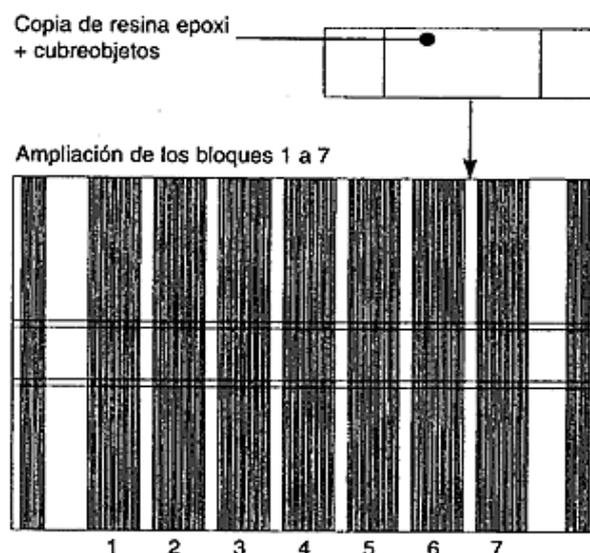
5.3.2. Accesorios del microscopio

5.3.2.1. Micrómetro de objeto para calibrar la retícula del ocular. Debe tener una escala de 1 milímetro de longitud con divisiones en intervalos de 10 μm , siendo preferible que estas divisiones fueran de 2 μm . Debe estar calibrado y ser trazable a patrones nacionales e internacionales.

NOTA: Se recomienda disponer de dos micrómetros de objeto; uno se puede utilizar como micrómetro patrón y otro como micrómetro de trabajo. El micrómetro de trabajo se calibrará por comparación con el micrómetro patrón.

5.3.2.2. Portaobjetos de verificación del límite de visibilidad para evaluar la resolución del microscopio. El único comercializado hasta la fecha es el portaobjetos para contraste de fases "Mark II" HSE/NPL (véase figura 2). Consiste en un portaobjetos convencional que tiene grabadas una serie de líneas paralelas de anchura decreciente agrupadas en siete bloques, separados por espacios intermedios de 20 μm .

FIGURA 2
Representación de un portaobjetos de verificación del límite de visibilidad Mark II (HSE/NPL)



6. TOMA DE MUESTRAS

6.1. Procedimiento de muestreo

6.1.1. Se prepara la bomba de muestreo (5.1.3.) y se ajusta al caudal de trabajo según se indica en el apartado 6.2. y Anexo D.

6.1.2. Se dispone un nuevo muestreador, se retira la tapa, se comprueba que el filtro no está dañado y se conecta a la bomba mediante el tubo flexible asegurándose de que no existen fugas.

6.1.3. Se sujeta la bomba de muestreo en el cinturón del trabajador o en su bolsillo. Se coloca el muestreador en la zona de respiración del trabajador (por ejemplo: sujeto a la parte superior de la solapa o al hombro), orientado hacia abajo y procurando evitar estrangulamientos del tubo flexible. En el caso de muestreos en lugares fijos, véanse las indicaciones del Anexo E.

6.1.4. Se pone en marcha la bomba y se anota la hora, la temperatura, la presión atmosférica y el caudal que corresponden al inicio del muestreo. Se controla la duración de la muestra de acuerdo con lo indicado en el apartado 6.2.

6.1.5. Transcurrido el tiempo de muestreo se desconecta la bomba y se vuelve a colocar la tapa del muestreador, cerrándolo debidamente para su almacenamiento y transporte (véase 6.3.). Se vuelve a anotar la hora, la temperatura, la presión atmosférica y el caudal que corresponden al final del muestreo.

NOTA 1: Si se observase que el filtro está dañado, debe rechazarse la muestra correspondiente.

NOTA 2: Si la diferencia medida en las lecturas del caudal antes y después de la toma de muestra es superior al 10%, debe rechazarse la muestra.

6.1.6. Se identifican las muestras de forma clara poniendo una etiqueta en el exterior del portafiltro. Se disponen las muestras en lotes para su traslado al laboratorio. Con cada lote de muestras debe incluirse un blanco de campo (véase 6.3. y 8.2.).

NOTA: El filtro no debe extraerse hasta su análisis.



6.2. Caudal de muestreo y duración de una muestra

El caudal de muestreo y la duración de la muestra deben ser adecuados para que el filtro presente una densidad de fibras óptima o al menos aceptable para el recuento, según se indica en el apartado 10.1. Esto requiere hacer una estimación previa de la posible concentración de fibras existente en el aire, para lo que pueden ser útiles los datos de mediciones anteriores u otras de similares características. Si no se dispone de ninguna otra información al respecto, se recomienda tomar el valor límite como punto de partida.

Se recomienda que el caudal de la bomba esté comprendido entre 0,5 y 2,0 l/min, aunque para muestras de corta duración o cuando se esperen concentraciones muy bajas de fibras, el caudal puede aumentarse hasta un máximo de 16 l/min (véase 5.1.3.). Para la medida del caudal se tendrán en cuenta las indicaciones del Anexo D.

NOTA: La eficacia del muestreo de las fibras es prácticamente independiente del caudal de muestreo. El caudal de muestreo se puede variar siempre que se obtenga la densidad de fibras apropiada en la muestra y que sea compatible con la capacidad de funcionamiento eficaz de la bomba y/o del muestreador. Los caudales recomendados tienen en cuenta esta circunstancia.

La duración apropiada de una muestra, para un determinado caudal de muestreo, teniendo en cuenta la concentración esperada en aire, se puede calcular mediante la expresión:

$$t = \frac{A}{a} \times \frac{L}{C_m} \times \frac{1}{1.000 Q} = \frac{A \times f}{C_m \times Q \times 1.000} \quad (1)$$

donde:

t es la duración de la muestra, en minutos;

A es el área efectiva del filtro, en mm² (véase Anexo F);

a es el área de la retícula, en mm²;

L es el depósito de fibras requerido en la superficie de la retícula, en fibras/campo;

f es la densidad de fibras requerida en la muestra en fibras/mm²;

C_m es la concentración media de fibras esperada durante el muestreo, en fibras/cm³;

Q es el caudal de muestreo, en litros por minuto. Ejemplo: Para la medida de concentraciones de 0,1 fibras/cm³, y considerando el valor mínimo aceptable de densidad de fibras en filtro de 64 fibras/mm², resulta necesario un tiempo de muestreo no inferior a 120 minutos a un caudal de 2 litros por minuto (área efectiva de filtro estimada: 385 mm²; área de retícula: 0,00785 mm²).

NOTA 1: Para medir el tiempo de muestreo se recomienda usar cronómetros calibrados que sean trazables a patrones nacionales.

NOTA 2: Cuando se tomen muestras en ambientes muy contaminados con otras partículas no fibrosas (polvo), será necesario reducir el tiempo de duración de la muestra para evitar las interferencias en el recuento de las fibras por un exceso de partículas.

6.3. Almacenamiento y transporte

Para prevenir contaminaciones lo mejor es almacenar y transportar los filtros en los propios muestreadores herméticamente cerrados. El transporte se llevará a cabo en un contenedor rígido, con material amortiguador suficiente y de forma que los filtros queden orientados hacia arriba. No se debe utilizar cajas con poliestireno expandido.

NOTA: No se empleará ningún fijador con el propósito de adherir las fibras a la superficie del filtro ya que esta operación está desaconsejada.

7. ANÁLISIS

7.1. Preparación de la muestra

NOTA: CONDICIONES DE LIMPIEZA: En todo momento se deben mantener unas condiciones de limpieza adecuadas del material y la zona de trabajo para evitar la contaminación de la muestra. En el proceso de preparación de la muestra se debe trabajar sobre superficies limpias y los portaobjetos, cubreobjetos, pinzas, etc. se revisarán y se limpiarán antes de su uso con papel de lentes o de seda industrial.

7.1.1. Se abre con cuidado el muestreador y con ayuda de las pinzas se retira el filtro, asiéndolo por el borde en la zona no expuesta. Se monta el filtro sobre un portaobjetos (5.2.1.) colocándolo hacia arriba, donde quedará sujeto por efecto de las fuerzas electrostáticas.

NOTA: Se montará preferiblemente el filtro entero. Si por alguna circunstancia especial fuera necesario dividir el filtro, el corte se realizará con un escalpelo o bisturí (nunca con tijeras), presionando verticalmente y pasando siempre por el centro del filtro. Los segmentos así obtenidos, en forma de cuña, deben tener al menos un 25 % de la superficie total. La operación de corte del filtro puede producir pérdidas importantes de fibras que afecten a los resultados de los recuentos.

7.1.2. Se transparenta el filtro haciendo incidir vapor de acetona sobre él, utilizando alguno de los métodos o sistemas que se describen en el Anexo A. Una vez transparentado, se dejan pasar unos minutos para permitir que la acetona se evapore totalmente del filtro.

NOTA: MEDIDAS DE SEGURIDAD: El vapor de acetona es muy inflamable y ligeramente tóxico. En ningún caso debe utilizarse en las proximidades de una llama. El transparentado de la muestra se hará en una zona aislada y ventilada o en campana de humos.

7.1.3. Se procederá a completar el montaje de la muestra con la aplicación del líquido de contraste y la colocación del cubreobjetos (5.2.2.). Para ello, dependiendo del índice de refracción de las fibras (n_f) (véase Anexo B), se utilizará el método de la triacetina o el tratamiento plasma de oxígeno/agua, según se describe a continuación.

7.1.3.1. Montaje con triacetina para fibras de amianto y otras fibras con $n_f > 1,51$.

Se añade una gota (alrededor de 10 µl) de triacetina con una micropipeta sobre el filtro transparentado y se coloca un cubreobjetos, depositándolo en posición inclinada suavemente y sin presionar, para que no queden burbujas de aire atrapadas. La triacetina debe cubrir todo el filtro evitando que sobrepase los bordes.

Se deja pasar unas 24 horas para dar tiempo a que el filtro sea embebido completamente por la triacetina. Transcurrido ese tiempo la muestra está lista para el análisis. Se puede acelerar este proceso calentando la preparación durante 15 minutos a unos 50 °C aproximadamente.

NOTA: Una vez preparada, la muestra será estable y podrá ser conservada durante más de un año sin deterioro apreciable, siendo

conveniente guardarla en posición horizontal. La aplicación de una capa de barniz sobre los bordes del cubreobjetos sella la muestra y mejora su conservación.

7.1.3.2. Tratamiento plasma de oxígeno/agua, aplicable a las fibras con $n_f < 1,51$.

El filtro transparentado con la acetona se coloca en el recinto del portamuestras del horno de plasma (5.2.6.). Durante unos 7 minutos, se somete a la muestra a un caudal de oxígeno de 8 ml/min y a una radiación por radiofrecuencias con una potencia directa y reflejada de 100 y 2 W, respectivamente (12.8.). La muestra así tratada se deja enfriar, se saca y se le añaden una o dos gotas de agua destilada, cantidad que, al igual que en el caso de la triacetina, debe ser capaz de cubrir todos los espacios entre la muestra y el cubreobjetos sin que llegue a rebosar.

NOTA: Hay que asegurarse de que el agua utilizada esté libre de fibras contaminantes. En caso necesario, se deberá proceder a su filtrado. Las muestras preparadas con este procedimiento no se pueden considerar permanentes ya que se deterioran con el tiempo.

7.1.4. Por cada grupo de muestras preparadas simultáneamente se prepara un blanco de laboratorio (véase 8.3.).



7.2. Calibrado y ajuste del microscopio

7.2.1. Ajuste del microscopio. Se seguirán cuidadosamente las instrucciones del fabricante para el ajuste del microscopio, incluyendo el centrado de los anillos de fase. La verificación de este ajuste se realizará en cada jornada de trabajo, antes de comenzar la sesión de recuentos, y siempre que se cambie cualquier lente o se realice una operación que pueda afectar al mismo.

7.2.2. Calibrado de la retícula del ocular. Una vez instalada la retícula Walton-Beckett (5.3.1.4.) se procederá a su calibración. Este proceso consiste en medir, con ayuda del micrómetro de objeto, el tamaño de las divisiones y el diámetro del círculo que corresponde al área del campo de recuento, como se especifica en el Anexo C. Se recomienda verificar la calibración de la retícula antes de comenzar cada sesión de recuento.

7.2.3. Verificación del límite de visibilidad. La verificación del límite de visibilidad o resolución del microscopio se llevará a cabo con ayuda del portaobjetos de verificación Mark II HSE/NPL (5.3.2.2.). Para considerar una combinación microscopio/observador satisfactoria, las líneas del bloque 5 tienen que ser visibles, las del bloque 6 pueden serlo parcialmente y las de 7 no deben verse en absoluto. Se recomienda realizar esta verificación antes de comenzar cada sesión de recuento.



7.3. Procedimiento para el recuento y medida de las fibras

7.3.1. Exploración previa. Se coloca la muestra preparada en el microscopio y se enfocan las fibras. Con un objetivo de bajos aumentos (10X) se hace un barrido visual de la superficie completa del filtro a fin de verificar la uniformidad del depósito de las fibras.

La distribución de las fibras debe verse uniforme, salvo en la zona correspondiente al borde del filtro que, al estar protegida por el cuerpo intermedio del portafiltros, debe quedar libre de polvo y fibras. Si se pone de manifiesto que hay marcadas diferencias de densidad de fibras en los distintos campos o agregación masiva de fibras o de polvo, el filtro debe ser rechazado.

7.3.2. Recuento de fibras. Una vez realizada satisfactoriamente la exploración, se cambia al objetivo de 40X y se enfoca el plano de la muestra, fácilmente localizable al coincidir con el de la retícula impresa de los filtros. Se procede al recuento de las fibras y a la selección de los campos de recuento aplicando los criterios que se indican en 7.3.2.1. y 7.3.2.2.

El recuento finalizará al alcanzar un número de 100 fibras contadas; si ese número de fibras no se alcanzase, se seguirá hasta examinar 100 campos. Sin embargo, se contarán las fibras de 20 campos como mínimo, aunque haya en ellos más de 100 fibras.

7.3.2.1. Criterios de recuento.

NOTA: Las fibras suspendidas en aire y recogidas en filtros de membrana presentan gran variedad de formas, desde fibras aisladas de formas sencillas hasta configuraciones y aglomerados complejos, que pueden dificultar la caracterización y discriminación de las fibras para realizar su recuento.

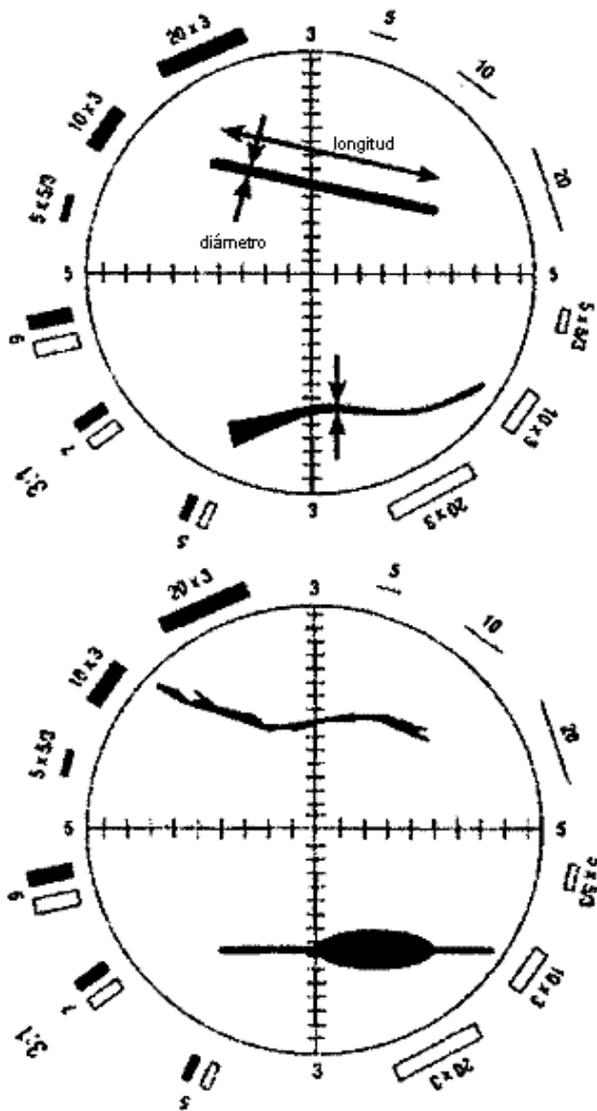
Los recuentos se llevaran a cabo aplicando los siguientes criterios:

1. Se considerará fibra toda partícula con longitud mayor de 5 μm , diámetro menor de 3 μm y relación longitud/diámetro superior a 3.
2. Si el diámetro de la fibra no es uniforme, se estimará un diámetro medio para comparar con su longitud a efectos del criterio anterior. Las protuberancias que aparecen en las fibras, muchas veces debido a la presencia de sustancias como la resina, no serán consideradas en la estimación diámetro (figura 3 (a)). En caso de duda, se considerará que el diámetro es inferior a 3 μm .
3. Cuando la fibra tiene ambos extremos dentro del campo de recuento, se cuenta como una unidad, y, si sólo tiene un extremo dentro del campo, se contará como media fibra. No se contarán las fibras que, aún estando parcialmente dentro del campo de

recuento, tienen ambos extremos fuera de él (figura 3 (a) y figura 3 (b)).

- Una fibra hendida o dividida es aquella que en alguna de sus partes aparece como única y sólida, y en otras, presenta un aspecto enramado (figura 3 (b)). Las fibras hendidas se considerarán como fibras individuales y su diámetro debe medirse en la parte entera y no en la ramificada.
- Cuando varias fibras están agrupadas, pero es posible distinguir cada una de ellas, se contarán por separado (figura 3 (c)). Si no es posible distinguir las fibras fácilmente, no se considerarán a menos que el aglomerado se ajuste a las dimensiones de una fibra individual, en cuyo caso se contará como una unidad.
- Las fibras que aparezcan unidas a partículas no fibrosas se considerarán, a efectos del recuento, como si la partícula no existiera. La longitud de la fibra se considerará únicamente en su parte visible salvo en el caso de que, se observe claramente que la fibra continúa al otro lado de la partícula (figura 3 (d)).

FIGURA 3 (a)
Ejemplos de aplicación de los criterios de recuento: fibras aisladas



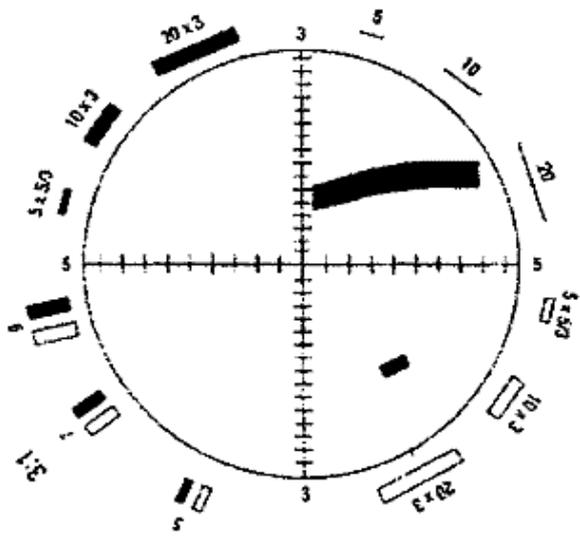
1 fibra;
cumple con los criterios de longitud, diámetro y aspecto

1 fibra;
el diámetro se mide en el punto considerado como "promedio"

1 fibra

1 fibra;
al estimar el diámetro se ignora la partícula o "bulbo" de resina

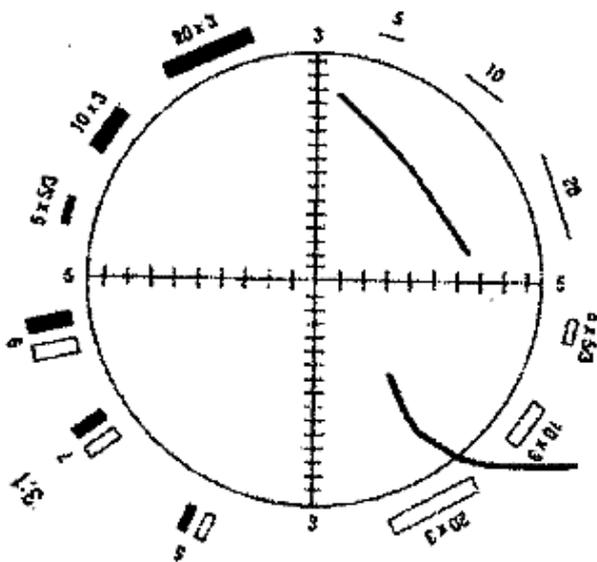
0 fibras;
diámetro demasiado ancho



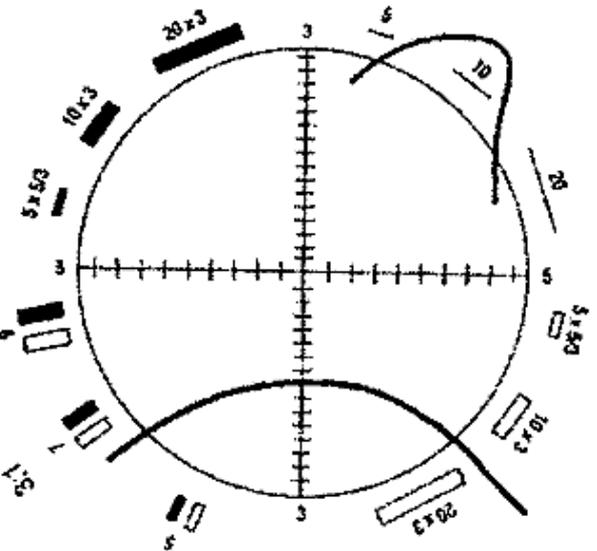
0 fibras;
la razón de su aspecto es menor de 3:1

FIGURA 3 (b)

Ejemplos de aplicación de los criterios de recuento: fibras con los extremos dentro del campo y fibras divididas



1 fibra;
fibra completa dentro del campo

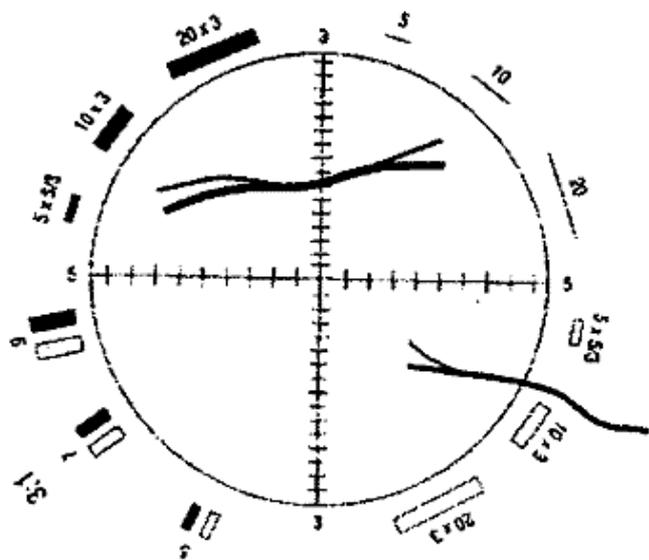


1/2 fibra;
1 extremo en el campo

1 fibra;
ambos extremos en el campo

0 fibras;
ningún extremo en el campo

1 fibra;
fibra con extremos divididos



1/2 fibra;
2 extremos de la fibra, dividida, cuentan con un extremo

FIGURA 3 (c)
Ejemplos de aplicación de los criterios de recuento: agrupaciones de fibras

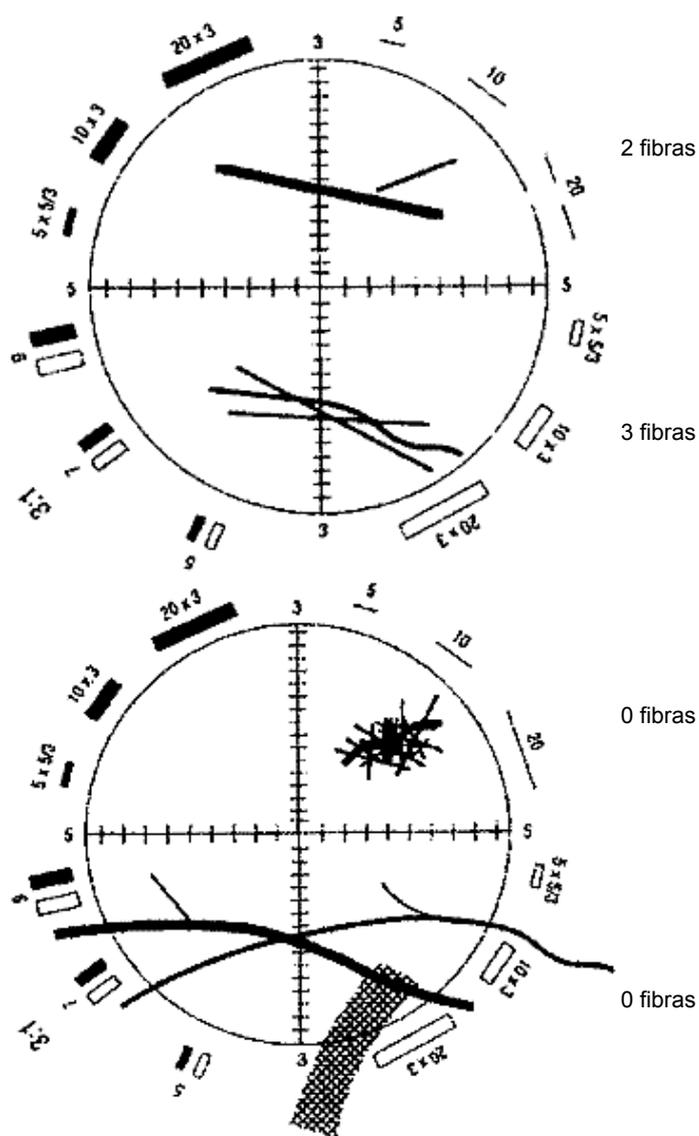


FIGURA 3 (d)
Ejemplos de aplicación de los criterios de recuento: fibras unidas a partículas

NOTA: CONDICIONES DE TRABAJO DURANTE EL RECUESTO: Las condiciones de trabajo durante el recuento, es decir, prácticas de trabajo y condiciones de laboratorio fundamentalmente, pueden afectara la calidad de los resultados. Así, factores como la anotación de los recuentos, el entorno que rodea al microscopista, la carga de trabajo o la fatiga ocular, pueden dar lugar a importantes discrepancias en los resultados de los recuentos. A ser posible, se debe reducir al mínimo la fatiga ocular mediante un entorno sin vibraciones, con una iluminación suave que evite la luz natural fuerte, con un asiento cómodo y estableciendo periodos de descanso entre recuentos.

8. BLANCOS

Se utilizan tres tipos de filtros blancos:

8.1. Blancos de lote.

Filtros extraídos directamente de las cajas adquiridas al suministrador, que se montan y recuentan para verificar que los filtros son aptos para su uso. Se recomienda analizar 1 filtro por cada 25 de la misma caja o lote.

8.2. Blancos de campo.

Filtros que se someten a las mismas operaciones que los de muestreo, pero sin quitar la tapa protectora ni pasar aire a su través y sin colocárselos al trabajador. Posteriormente se preparan y recuentan como el resto de las muestras. Se recomienda que el número de blancos sea como mínimo el 2% del número total de muestras tomadas.

8.3. Blancos de laboratorio.

Filtros que se utilizan para descartar posibles contaminaciones en el laboratorio y que se toman de las cajas o lotes verificados satisfactoriamente. Estos filtros se preparan y recuentan a la vez que las muestras a analizar, tomándose un blanco de laboratorio por cada grupo de muestras preparadas simultáneamente.

La concentración máxima admisible de fibras en los filtros blancos es la que corresponde a un recuento de 5 fibras en 100 campos reticulares, que equivale a aproximadamente 6,4 fibras/mm².

Si en el recuento de un blanco se obtienen valores excesivamente altos de fibras, se investigarán primero posibles causas achacables al proceso analítico (error del microscopista, contaminación del cubreobjetos). Si se concluye que el problema tiene su origen en el filtro, se rechazará el lote completo. Si se deduce que ha habido una contaminación, los resultados obtenidos en el lote de muestras al que corresponde el blanco deberían rechazarse, aunque siempre pueden tomarse como orientativos y considerarlos sólo una estimación aproximada de la concentración de fibras en el punto de muestreo.

9. CÁLCULOS

9.1. Determinación del número total de fibras en la muestra

La cantidad de fibras en la muestra se obtendrá a partir de la siguiente expresión:

$$F = \frac{N}{a} \times \frac{A}{n} \quad (2)$$

donde:

F es el número total de fibras en el filtro;

N es el número de fibras contadas;

A es la superficie efectiva del filtro, en mm² (Véase [Anexo F](#));

n es el número de campos contados;

a es el área correspondiente a un campo de recuento, en mm².

También puede utilizarse la expresión siguiente:

$$F = 10^6 \times \frac{D^2}{d^2} \times \frac{N}{n} \quad (3)$$

donde:

F es el número total de fibras en el filtro;

D es el diámetro efectivo del filtro, en mm;

N es el número de fibras contadas;

d es el diámetro de la retícula de recuento, en μm;

n es el número de campos contados.



9.2. Determinación de la concentración de fibras en aire

La determinación de la concentración de fibras en el aire, C, expresadas en fibras por centímetro cúbico de aire Se lleva a cabo dividiendo el número de fibras en el filtro, F, obtenido a partir de las expresiones (2) o (3) entre el volumen de aire muestreado.

$$C = \frac{F}{1000 \times V} = \frac{F}{1000 \times Q \times t} \quad (4)$$

donde:

C es la concentración, en fibras/cm³;

F es el número total de fibras en el filtro;

V es el volumen de aire muestreado, en litros;

Q es el caudal de aire a través del filtro, en l/min;

t es la duración de la toma de muestra, en min.



10. PRECISIÓN, EXACTITUD Y LÍMITE DE DETECCIÓN

10.1. Precisión

La precisión de este método depende principalmente del número total de fibras contadas en la muestra y de la uniformidad de Su distribución en la Superficie del filtro. El depósito aleatorio de fibras en el filtro Se ajusta con bastante fidelidad a una distribución de Poisson, y por tanto Su desviación estándar Se calculará mediante la expresión $N^{1/2}$, Siendo N el número de fibras contadas. Esto Supone una desviación estándar relativa (s_{rP}) o coeficiente de variación del 10% para un recuento de 100 fibras y del 32% para un recuento de 10 fibras. En la [tabla 1](#) figuran los valores de s_{rP} calculados para distintos valores de N.

Tabla 1
Coefficientes de variación para distintas cantidades de fibras contadas según una distribución de Poisson

N n° de fibras	S _{RP} (%) Poisson (teórica)	S _{RP} (%) Real (experimental)	Límites de confianza del 90% para la media de determinaciones repetidas (Número de fibras)	
			inferior	superior
5	45	49	2,0	11,0
7	38	43	3,2	14,0
10	32	37	5,1	18,5
20	22	30	11,7	33,2
50	14	25	33	76
80	11	23	53	118
100	10	22	68	149
200	7	21	139	291

A partir de recuentos de 50 fibras, el coeficiente de variación de Poisson Se reduce considerablemente y Se hace prácticamente constante, llegando a valores óptimos para recuentos entre 80 fibras y 100 fibras. Los recuentos superiores a 100 fibras no presentan una mejora apreciable de la precisión.

En la práctica, la desviación estándar real es mayor, porque a la variación de Poisson hay que añadir los componentes de variación subjetivos inter e intralaboratorio. En la [tabla 1](#) se indican los valores de la desviación estándar relativa real (S_{RP}), que se proporcionan en el método de la OMS como valores medios de un laboratorio tipo que tiene implantado un sistema de calidad con un funcionamiento satisfactorio. Estos valores pueden oscilar ligeramente dependiendo de la fuente de los datos. El coeficiente de variación intralaboratorio medio para muestras de densidades >64 fibras/mm² obtenido en los 10 últimos años de ejecución del [Programa Interlaboratorios de Control de Calidad de Fibras de Amianto \(PICC-FA\)](#) es del 21%. Para muestras de densidad >90 fibras/mm² el coeficiente de variación global de los resultados obtenido en el [PICC-FA](#) es del 20%. Estos valores que corresponden a los laboratorios españoles, son algo inferiores a los encontrados en otros programas similares de otros países ([12.9.](#) y [12.10.](#)).

Tanto si se considera la precisión de Poisson como la experimental, la densidad óptima de fibras en la muestra, teniendo en cuenta el número de campos de recuento posibles ([7.3.2.](#)), se sitúa en el intervalo 100 fibras/mm² - 650 fibras/mm² aproximadamente, que es el que permite obtener recuentos entre 80 fibras y 100 fibras. Este intervalo de densidad óptima puede ser ampliado sin una reducción importante de la precisión, hasta un intervalo aceptable de 64 fibras/mm² a 1000 fibras/mm². Por debajo de 64 fibras/mm², equivalente aproximadamente a 50 fibras en 100 campos, los recuentos tienen menor precisión y en consecuencia los resultados tendrán mayor incertidumbre, por lo que esta circunstancia deberá indicarse en el informe de resultados ([12.11.](#)). En la [tabla 1](#) se indican los límites de confianza para distintos valores de fibras contadas basados en la desviación estándar experimental.

En el caso de los recuentos de otras fibras diferentes del amianto es esperable una variabilidad similar a la encontrada para las fibras de amianto. En una prueba de intercomparación para la determinación de fibras minerales artificiales (FMA) desarrollada en el año 2000 entre laboratorios españoles, se encontró que se podrían aplicar los mismos parámetros y criterios de control que en las determinaciones de fibras de amianto ([12.12.](#)).

10.2. Exactitud

La exactitud de este método no se puede evaluar al no ser posible conocer el valor verdadero de la concentración de fibras en una determinada nube de polvo. Por otra parte, no tiene sentido considerar el sesgo del método por tratarse de un método de referencia. Sin embargo, sí hay que tener en cuenta la desviación o sesgo de los resultados de los recuentos respecto de los valores de referencia o de consenso asignados a las muestras, a través de los controles de calidad internos y externos. A este respecto, los datos extraídos del [Programa Interlaboratorios de Control de Calidad de Fibras de Amianto \(PICC-FA\)](#), indican una desviación media de los resultados de los laboratorios españoles respecto a los valores de consenso del conjunto de participantes próxima a ±12% ([12.9.](#)).

La presencia en una muestra de diferentes tipos de fibras o partículas puede afectar negativamente a la exactitud del resultado. La superposición casual de partículas no fibrosas puede dar lugar a un recuento incompleto del número de fibras, dependiendo del tamaño y la concentración de las partículas que interfieren. En la práctica, los efectos de la superposición casual sobre el recuento son pequeños, por lo que no van a afectar de manera importante a los resultados obtenidos con la aplicación de este método.

Por otra parte hay que tener en cuenta que los microscopistas tienden a contar por defecto cuando la densidad de fibras es alta y por exceso cuando la densidad es baja, lo que puede conducir a una subestimación o sobrestimación de la exposición respectivamente. Nunca debe realizarse ningún tipo de corrección por este motivo.

Las particularidades de la muestra que pueden afectar a la disminución de la exactitud del recuento de las fibras deben ser indicadas en el informe de resultados.

10.3. Límite de detección

El límite de detección de este método se puede estimar en 0,01 fibras/cm³, siempre que el volumen de aire muestreado sea como mínimo de 480 litros. Este valor se deduce a partir del límite inferior de recuento de fibras en el filtro y se puede modificar dependiendo del volumen de muestreo (véase [tabla 2](#)).

El límite inferior de recuento de fibras en un filtro está estimado en 10 fibras en 100 campos. Este es un valor acordado que se ha deducido teniendo en cuenta que su límite inferior de confianza para el 90%, coincide con el número máximo aceptable de fibras en un filtro blanco (véase [tabla 1](#)). Dado que los intervalos de confianza para los resultados de los recuentos están calculados sobre la precisión intralaboratorio, no puede descartarse que en la práctica, tanto el límite inferior de recuento como el límite de detección, puedan tener valores más altos.

Los resultados por debajo del límite inferior de recuento no son cuantificables, por lo que en estos casos la concentración en aire se expresará como inferior al límite de detección que corresponda, de acuerdo con el volumen de aire muestreado.

Tabla 2
Valores del límite de detección para la concentración de fibras en aire en función del volumen de muestreo

Límite inferior de recuento			Volumen de aire muestreado litros	Límite de detección en aire fibras/cm ³
10 fibras / 100 campos	12,7 fibras/mm ² (*)	4.900 fibras en filtro (**)	10	0,50
			25	0,20
			50	0,10
			90	0,05
			120	0,04
			240	0,02
			480	0,01
			960	0,005

(*) $A_{\text{retícula}} = 0,00785 \text{ mm}^2$;

(**) $A_{\text{útil}} = 385 \text{ mm}^2$.

11. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Este método está basado en el recuento óptico de las fibras y, por tanto, existirán variaciones subjetivas sistemáticas entre diferentes laboratorios o incluso dentro de un mismo laboratorio que pueden dar lugar a discrepancias significativas en los resultados. Por esta razón, se requiere que el personal que aplique este método reciba previamente la formación y entrenamiento adecuado y que el laboratorio implante un sistema de calidad en el que se establezca un control de calidad interno y se participe de forma continua en programas de intercomparación de resultados o control de calidad externo ([12.9](#)).

12. BIBLIOGRAFÍA

12.1. Organización Mundial de la Salud. Determinación de la concentración de fibras suspendidas en aire. Método basado en la microscopía óptica de contraste de fase. Ginebra (1997).

12.2. [Directiva 2003/18/CE](#). Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición al amianto durante el trabajo. DOCE n° L097 de 15 de Abril de 2003, pgs 48-52. Modifica las [Directivas 83/477/CEE](#) del 19 de Octubre de 1983 y [91/382/CEE](#) de 25 de Junio de 1991.

12.3. UNE EN 1540. Atmósferas en el lugar de trabajo. Terminología (1999).

12.4. [Real Decreto 363/1995](#) de 10 de marzo (BOE de 5.6.95). Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas. Modificado el Anexo I por la Orden de 13.9.95 (BOE de 19.9.95).

12.5. UNE EN ISO 3696. Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y métodos de ensayo (1996).

12.6. UNE EN 1232. Atmósferas en el lugar de trabajo. Bombas para muestreos personales de agentes químicos. Requisitos y métodos de ensayo (1997).

12.7. UNE EN 12919. Atmósferas en el lugar de trabajo. Bombas para el muestreo de los agentes químicos con un caudal volumétrico superior a 5 l/min. Requisitos y métodos de ensayo (2000).

12.8. Le Guen J.M.M., Rooker S.J. y Vaghan N.P. A new technic for the scanning electron microscopy of particules collected on membrane filters. Environmental Science and Technology, vol. 14, pág. 1008-1011 (1980).

12.9. INSHT. http://www.mtas.es/insht/acreditacion/picc_fa.htm

12.10. Arroyo M.C. y Rojo J.M. A proposal for harmonising laboratory performance assessment criteria in national asbestos fibre counting schemes. Annals of Occupational Hygiene, vol. 45, N°6, pág. 447-455 (2001).

12.11. Arroyo M.C. y Rojo J.M. Ampliación del programa interlaboratorios de control de calidad de fibras de amianto (PICC-FA). Protocolo estadístico para el recuento de fibras de amianto en bajas concentraciones. "Prevención, Trabajo y Salud", vol. 27, pág. 35-40 (2003).

12.12. Prueba de Intercomparación para Determinaciones de Fibras Minerales Artificiales (FMA). Informe de resultados. Informe interno del Centro Nacional de Verificación de Maquinaria, Ref: ACT/547/71/01. CNVM-INSHT (2001).

12.13. UNE EN 689. Atmósferas en el lugar de trabajo. Directrices para la evaluación de la exposición por inhalación de agentes químicos para la comparación con los valores límite y estrategia de la medición (1997).

12.14. Methods for the determination of hazardous substances. MDHS 39/4 Asbestos fibres in air. Health and Safety Laboratory HSE (1995).

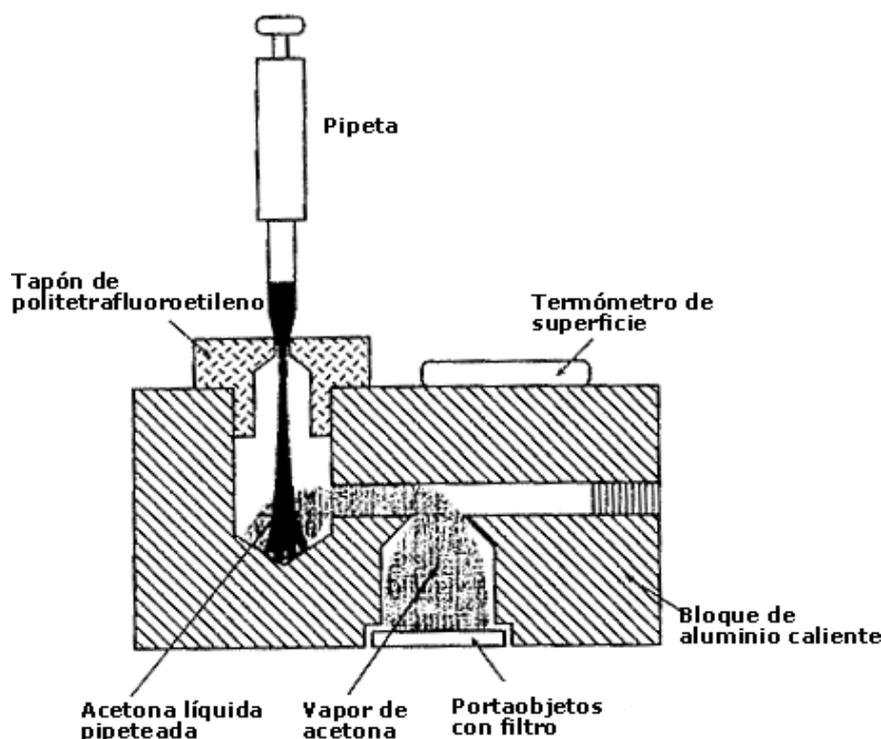
ANEXO A

Procedimientos para la obtención de vapor de acetona

A.1 Método del bloque caliente

Es el método más recomendado. Consiste en un dispositivo dotado de un calentador integral, en el que se inyecta la cantidad mínima de acetona necesaria para transparentar un filtro (véase [figura A1](#)). La acetona se evapora y sale por un orificio en forma de chorro, directamente sobre el portaobjetos en el que se ha colocado el filtro con la cara muestreada hacia arriba y las líneas del retículo impreso paralelas a los bordes del portaobjetos. Es necesario inyectar unos 0,25 ml de acetona para que el dispositivo la haga llegar en forma de pequeño chorro de vapor sobre la muestra y la transparente. Las versiones comerciales de este dispositivo se utilizarán siguiendo las instrucciones del fabricante.

FIGURA A1
Esquema que representa el método del bloque caliente



Nota 1: MEDIDAS DE SEGURIDAD: Las pequeñas cantidades de acetona utilizada en la preparación de cada muestra hacen que el

riesgo de explosión o incendio sea mínimo, pero aún así se deben mantener las adecuadas medidas de seguridad. Estos equipos generalmente no requieren un sistema de extracción localizada, siendo suficiente su ubicación en una zona bien ventilada manteniendo el recipiente de acetona cerrado cuando no se use.

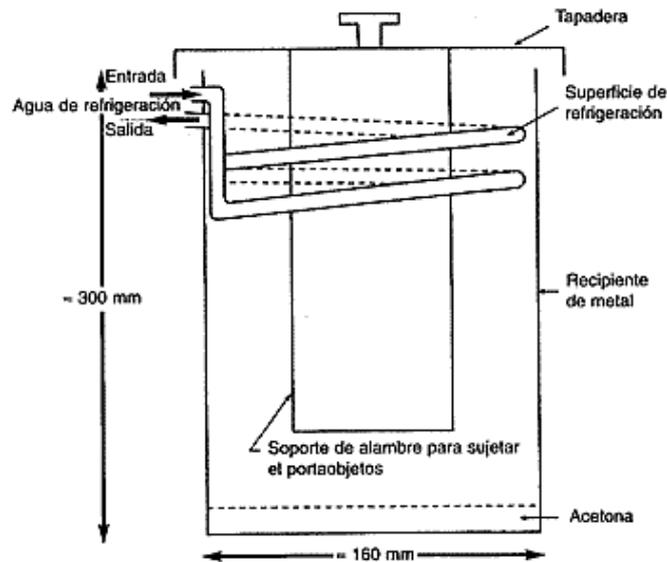
A.2 Método de la caldera

En el método de la "caldera" la acetona se evapora en un recipiente alto y estrecho de fondo plano, dotado de un serpentín refrigerante situado cerca del extremo superior (véase figura A2). Para el transparentado, el portaobjetos con el filtro se coloca en el soporte rígido que dispone la tapa del recipiente. El equipo emplea unos 30 ml de acetona para el proceso de transparentado y la fuente de calor, para evaporar la acetona sin llegar a inflamar, la produce un baño de aceite recirculante. Los vapores generados por baños de agua caliente no suelen ser suficientes para una transparentación adecuada del filtro. El agua fría que circula por el serpentín hace condensar los vapores de acetona en la parte alta del equipo de forma que éstos quedan confinados en la parte inferior del recipiente.

El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Se introducen en el fondo del recipiente unos 30 ml de acetona y se abre el agua de refrigeración para que circule por el serpentín.
- Se tapa el recipiente y se calienta por medio del baño de aceite hasta producir la ebullición de la acetona.
- Se retira la tapa y en el soporte de alambre se coloca el portaobjetos en cuyo centro se ha situado el filtro con la superficie muestreada hacia arriba y con las líneas del retículo paralelas a los bordes del portaobjetos.
- Se vuelve a colocar la tapa para que el portaobjetos quede sumergido en vapores de acetona.
- Se deja tapado los segundos necesarios para la transparentación del filtro al cabo de los cuales se puede sacar.

FIGURA A2
Esquema que representa el método de la caldera



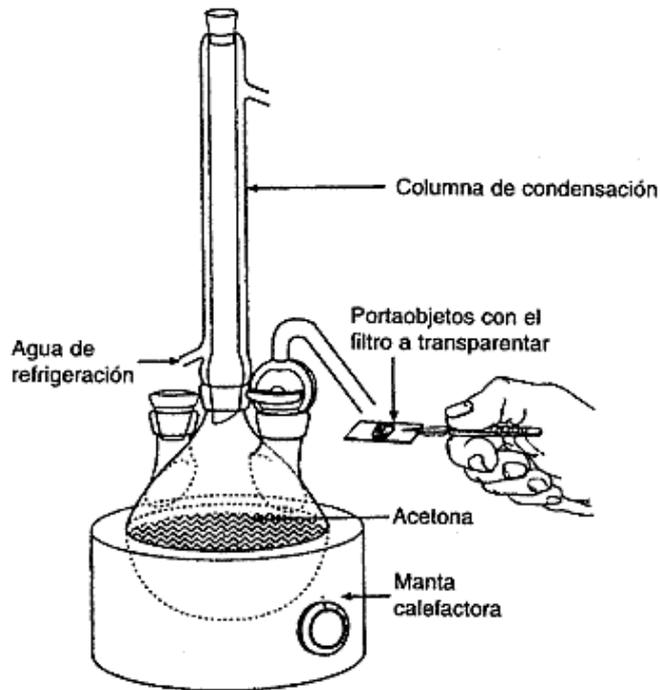
Nota 2: Aunque la refrigeración con agua del serpentín confina los vapores de acetona en una región y reduce tanto el riesgo de incendio como de inhalación de los vapores, la cantidad de acetona que se introduce en el dispositivo debe ser mínima y se retirará del mismo cuando no se vaya a usar. Es decir, la producción de vapores debe reducirse únicamente al tiempo del proceso de transparentado. El transparentado debe realizarse en una campana extractora, y siempre que sea posible el recipiente permanecerá cerrado y con la prohibición de fumar en sus proximidades.

A.3 Método de evaporación por reflujo o del refrigerante de reflujo

El equipo consta de un matraz de tres bocas: la central está equipada con una columna de condensación; una de las laterales va provista de un tapón y se utiliza para introducir la acetona líquida; la tercera boca va equipada con una llave de apertura y cierre y es la que se utiliza para la salida del vapor de acetona (véase figura A3). Utilizando un sistema de calentamiento se lleva la acetona a ebullición hasta conseguir un chorro de vapor uniforme. El filtro, montado en un portaobjetos que se sujeta con pinzas, se coloca a una distancia de 15 a 25 mm de la boca de salida del vapor de acetona durante unos tres y cinco segundos. Para conseguir un efecto uniforme se mueve el filtro lentamente delante del chorro de vapor hasta que quede transparente.

FIGURA A3

Esquema que representa el método de evaporación por reflujo



Nota 3: Si el vapor es escaso, no se conseguirá transparentar el filtro. Si es excesivo, especialmente si aparecen gotas de acetona, se destruirá el filtro debido a que lo disuelve o lo encoge hasta un tamaño que lo deja inservible. El portaobjetos no debe estar precalentado, ya que el vapor de acetona debe condensarse sobre el portaobjetos para obtener una correcta transparencia del filtro. El transparentado se debe realizar en campana extractora.

ANEXO B

Índices de refracción de algunas fibras empleadas industrialmente

En este Anexo se recoge una lista, no exhaustiva, de materiales fibrosos que se pueden encontrar con mayor frecuencia en la industria cuyo índice de refracción es mayor de 1,51.

TIPO DE FIBRA	DENOMINACIÓN
AMIANTO	Crisotilo
	Amosita
	Crocidolita
	Actinolita
	Antofilita
	Tremolita
Otros silicatos naturales fibrosos	Wollastonita
	Vermiculita
Fibras minerales artificiales	Fibra de vidrio
	Lana mineral (escoria o roca)
	Lana de vidrio
	Fibras cerámicas refractarias

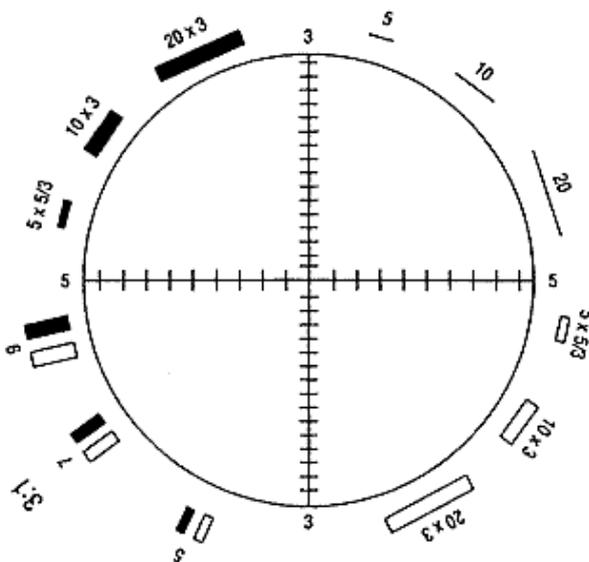
ANEXO C

Especificaciones para la adquisición y calibrado de la retícula de ocular

La utilización de una retícula de ocular nos permite delimitar y calcular el área del campo de visión utilizado para el recuento de las fibras y proporciona imágenes de referencia y escalas de tamaños para medirlas. Se recomienda la retícula de Walton-Beckett del tipo

G-22 ya que su diseño se adapta expresamente al recuento de fibras de las dimensiones especificadas en este método. La retícula (véase figura C1) es circular y está dividida en cuatro cuadrantes por dos ejes, horizontal y vertical, en los que se han insertado dos escalas de 5 µm y 3 µm, respectivamente. Alrededor del círculo se sitúan una serie de figuras con la longitud, diámetro y relación longitud-diámetro que corresponden a la definición de fibra respirable utilizada para el recuento. La retícula debe tener un diámetro de 100 µm en el plano del objeto.

FIGURA C1
Retícula de Walton-Beckett del tipo G22



C.1 Especificaciones de la retícula

Para adquirir la retícula deben especificarse el tipo de microscopio, el diámetro del disco de vidrio en el que va impresa, el diámetro real y el diámetro aparente de la misma. Estos datos se pueden determinar de la siguiente forma:

- Se ajusta el microscopio como para proceder a un recuento de fibras y se inserta en el ocular cualquier retícula disponible.
- Se coloca un micrómetro de objeto (5.3.2.1.) en la platina del microscopio y se enfoca hasta que las líneas graduadas se vean con nitidez. Se mide la longitud aparente de la retícula (L) en micras.
- Se retira la retícula del ocular y se mide su longitud real (Y) en milímetros. Esto se puede hacer utilizando el calibre que generalmente viene dispuesto en la platina del microscopio. Para ello se coloca la retícula sobre un portaobjetos y, con una observación a bajos aumentos, se mide el desplazamiento de la platina necesario para ir de un extremo a otro de la misma. La medida de Y debe realizarse con una precisión del $\pm 2\%$.
- La longitud real (x) en mm, que corresponde a una longitud aparente de 100 micras, se calcula mediante la expresión:

$$x = 100 Y/L \quad (6)$$

x será, por tanto, el diámetro real a especificar en la adquisición de la retícula.

Ejemplo: Se dispone de un disco de vidrio de 17 mm con una retícula Porton impresa que presenta una longitud aparente (L) de 108 µm y una longitud real (Y) de 4,50 mm. Por tanto, el diámetro real (x) para el diámetro aparente de 100 micras, que resulta de la expresión (6), es 4,17 mm. Se debe especificar al suministrador una retícula Walton-Beckett tipo G22 de 100 µm de diámetro aparente con un diámetro real de 4,17 mm en un disco de vidrio de 17 mm de diámetro.

C.2 Calibración de la retícula

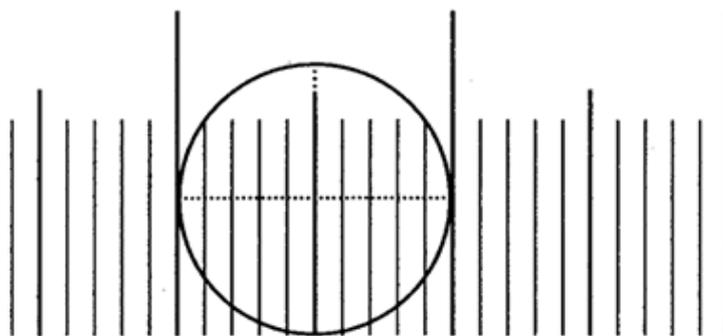
La retícula debe ser calibrada a su recepción mediante el siguiente procedimiento:

- Ajustar el microscopio en las condiciones habituales de uso.
- Colocar un micrómetro de objeto sobre la platina del microscopio (véase figura C2).
- Asegurarse de que la distancia interpupilar de los oculares está correctamente ajustada.
- Enfocar el microscopio sobre las divisiones de la escala del micrómetro de objeto.

5. Situar la retícula del ocular sobre las divisiones graduadas del micrómetro, de forma que pueda contarse el número de divisiones enteras abarcadas por la misma.
6. Si en un extremo quedara menos de una división de la escala, estimar esta fracción y sumarla al número de divisiones enteras medidas, expresando el resultado en micrómetros.

Este resultado es el diámetro aparente de la retícula del ocular (d) o diámetro de la retícula de recuento en micrómetros que se emplea para el cálculo de la cantidad de fibras en el filtro según la ecuación (3). Este diámetro debe estar comprendido entre 98 µm y 102 µm, y en caso contrario debe rechazarse la retícula por estar fuera de especificaciones.

FIGURA C2
Retícula circular superpuesta en la escala del micrómetro de objeto



ANEXO D

Medida del caudal de la bomba de muestreo y calibración de los medidores de caudal

D.1 Medida del caudal (calibración de la bomba)

El caudal de la bomba empleada en los muestreos, tanto personales como en puntos fijos, debe ser medido antes y después de realizado el muestreo. Esta operación, también conocida como calibración de la bomba, se llevará a cabo utilizando un medidor de caudal (caudalímetro) adecuado (5.1.4.).

La medida del caudal o calibración de la bomba se debe realizar en condiciones representativas de la toma de muestra, con la bomba conectada a un muestreador al que se ha retirado la tapa y colocado hacia abajo. La longitud y diámetro de los tubos de conexión serán similares a los empleados en la toma de muestra.

Es recomendable que la medida del caudal se haga en el mismo lugar de muestreo. Cuando esto no sea posible y se den diferencias superiores al 5% en la presión o la temperatura entre un lugar y otro, puede ser necesario hacer una corrección de caudal. Deben consultarse las especificaciones de la bomba para conocer en qué medida el caudal puede verse afectado por diferencias en las condiciones atmosféricas.

Cuando sea necesario hacer esta corrección, el caudal real de muestreo se determinará mediante la siguiente expresión:

$$Q_r = Q_c (P_e \times T_a / P_a \times T_c)^{1/2} \quad (5)$$

donde:

Q_r es el caudal real de muestreo, en litros por minuto;

Q_c es el caudal correspondiente a la calibración de la bomba, en litros por minuto;

P_c es la presión atmosférica en el lugar de calibración de la bomba, en kilopascales;

P_a es la presión atmosférica en el lugar del muestreo, en kilopascales;

T_c es la temperatura en el lugar de la calibración de la bomba, en grados Kelvin;

T_a es la temperatura media durante la toma de muestra, en grados Kelvin;



D.2 Calibración de los medidores de caudal (caudalímetros)

Los medidores de caudal deben calibrarse periódicamente y ser trazables a patrones nacionales o internacionales. Cuando se utilice el sistema de la bureta invertida como caudalímetro de burbuja de jabón, la calibración incluye la bureta empleada para medir el volumen y el cronómetro utilizado para medir el tiempo.

Nota: Cuando se disponga de un cierto número de medidores de caudal, puede resultar de interés disponer de un medidor patrón con el que se puedan calibrar los medidores de trabajo. El medidor patrón debe ser en este caso calibrado periódicamente y trazable a patrones nacionales o internacionales, y se utilizará solo para el control de los medidores de trabajo y no con otro fin, prestando atención a las indicaciones del certificado de calibración. El medidor patrón deberá tener una amplitud de escala igual o superior a la de los medidores de rutina.

La calibración de los medidores de rutina con el medidor patrón se hará de acuerdo con un procedimiento establecido y documentado para el que se tendrán en cuenta, entre otras, las siguientes indicaciones:

- Los dos medidores de caudal (el de trabajo y el patrón) se deben colocar en serie conectados con un tubo de goma de longitud mínima, cuyo diámetro no sea inferior al de la entrada de los medidores.
- Todas las conexiones tienen que ser herméticas y no deben existir estrechamientos o válvulas entre los dos medidores.
- La calibración debe incluir todos los posibles caudales de trabajo previstos.

Se recomienda una frecuencia anual para la calibración de los caudalímetros patrón y mensual para los de trabajo, aunque esta última dependerá de la frecuencia de los muestreos. Se pueden establecer intervalos más largos si se puede justificar documentalmente que esto es posible.



ANEXO E Muestreo en un punto fijo

E.1 Objetivo de los muestreos en un punto fijo

Los muestreos en un punto fijo o muestreos estáticos ambientales se utilizan para medir la concentración de fibras en el aire de los locales de trabajo u otros recintos con fines diversos como la detección de fuentes de contaminación, la evaluación de la eficacia de las técnicas de control y protección colectiva, la determinación de las concentraciones de fibras de fondo, etc. Los muestreos en punto fijo no sustituyen a los muestreos personales, ya que normalmente no se plantean con una estrategia que permita una medida representativa de la exposición personal (12.13.).

Cuando se trata de determinaciones de fibras de amianto, la mayor parte de las mediciones ambientales tienen como objetivo confirmar la ausencia de contaminación en el aire. Esto puede ser necesario en diferentes circunstancias entre las que se relacionan las siguientes:

- a. Después de la retirada de materiales de amianto en el interior de edificios, para asegurarse de que no existen riesgos por la presencia de amianto en el aire (índice de descontaminación).
- b. En el exterior de los encerramientos o zonas confinadas durante las intervenciones sobre materiales de amianto friables, para verificar que el sistema funciona adecuadamente y no existen fugas de aire contaminado que afecten a las áreas adyacentes.
- c. En la zona limpia del interior de las unidades de descontaminación para confirmar la ausencia de contaminación.
- d. En el aire de los locales donde existan materiales con amianto para verificar su buen mantenimiento y estado.



E.2 Toma de muestra

Los parámetros y la metodología empleada en los muestreos fijos son, en su mayoría, los mismos que se utilizan en los muestreos personales, pero, además, es necesario tener en cuenta las indicaciones particulares que se dan a continuación.

E.2.1 Localización de los puntos de muestreo

Los muestreadores se sujetarán sobre un soporte fijo, situado normalmente entre 1 y 2 m por encima del nivel del suelo, orientados

hacia abajo dejando la libre circulación de aire alrededor. Deben situarse teniendo en cuenta las posibles fuentes de polvo o aire limpio y evitando las corrientes de aire cruzadas de más de 1 m/s, ya que éstas pueden reducir el número de fibras recogidas.

Los puntos de muestreo se localizarán teniendo en cuenta las características del recinto y el objetivo del muestreo. Por ejemplo, en las mediciones para la detección de posibles fugas en los encerramientos o áreas confinadas, los puntos de muestreo deben situarse en los lugares críticos como son la proximidad de las juntas y uniones de las láminas de plástico, cerca de los extractores o unidades de presión negativa, etc.

E.2.2 Caudal de la bomba y volumen de muestreo

En los muestreos fijos el caudal puede ser superior al empleado en los muestreos personales, pudiendo llegar hasta 16 litros por minuto si la bomba y el muestreador lo permiten. De esta forma será posible muestrear los volúmenes elevados de aire que son necesarios para medir concentraciones bajas en condiciones adecuadas de precisión y exactitud (véase 10.1. y 10.2.). Se calculará el volumen mínimo de muestreo de forma que el límite de detección resultante sea adecuado para el objetivo de la medición (véase 10.3.).

E.2.3 Procedimiento de muestreo para la medida del índice de descontaminación

La toma de muestra se realizará teniendo en cuenta los siguientes puntos (12.14.):

1. Las muestras se tomarán antes de retirar los encerramientos o barreras de contención del aire, después que el recinto haya sido completamente limpiado y esté seco, y después de una detallada inspección visual en la que no se detecte ninguna traza de escombros o polvo residual.
2. Se debe provocar la suspensión en el aire de las posibles fibras sedimentadas y ocultas en zonas poco visibles. La perturbación del polvo sedimentado se puede hacer utilizando cepillos o escobas, golpeando las superficies accesibles, o provocando una corriente de aire dirigida hacia paredes, techos, suelos, columnas, etc.
3. Las acciones de perturbación de las fibras sedimentadas se harán durante al menos 5 minutos antes del comienzo del muestreo y se repetirán aproximadamente cada hora mientras dure el muestreo o cuando se tome una nueva muestra.
4. Mientras dura el muestreo se pueden disponer ventiladores de aire orientados hacia el techo funcionando a baja velocidad. Si existe alguna instalación de aspiración de aire, ésta deberá estar desconectada.
5. El volumen de muestreo debe ser de al menos 480 litros y es recomendable una duración mínima de cuatro horas. Es posible alcanzar estas condiciones con dos o más muestras consecutivas que supongan como mínimo este volumen de aire y estén tomadas a distancias menores de un metro de una a otra.

Nota: Todos los instrumentos empleados para remover el polvo deben considerarse como elementos contaminados, y por tanto, deben ser limpiados o eliminados como residuos de amianto.

E.2.4 Número de muestras

El número de muestras a tomar dependerá del objetivo de la medición. Por ejemplo, en la medida de la concentración de fibras de fondo o en las evaluaciones ambientales de seguimiento periódico, el número de muestras necesario será menor que cuando se mide el índice de descontaminación. En la medida del índice de descontaminación se recomienda calcular el número de muestras mínimo a tomar como el número entero próximo que resulte de aplicar la siguiente expresión (12.14.):

$$\text{Número de muestras} = A^{1/3} - 1$$

donde A se determina de la siguiente forma:

1. Si la altura del encerramiento es inferior o igual a 3 metros o si es superior a 3 metros pero es presumible que en la posterior ocupación de la zona de trabajo sólo habrá personas a nivel del suelo, el valor de A corresponderá a la superficie del encerramiento en metros cuadrados.
2. En los demás casos, A es 1/3 del volumen del encerramiento en metros cúbicos. Si hubiera objetos voluminosos en el interior como por ejemplo una caldera, su volumen se restará del volumen total del recinto para calcular A.

En la [tabla E1](#) se indica el número mínimo de muestras que resulta de aplicar estos cálculos a recintos de diferentes superficies y volúmenes.

Tabla E1
Número de muestras recomendadas según el tamaño del recinto

Superficie (m ²)	Volumen del recinto (m ³)	Número mínimo de muestras
	<10	1

<50	150	2
200	600	4
500	1500	6
1000	3000	9
5000	15000	16
10000	30000	20

En general, son necesarias dos muestras como mínimo, a no ser que el volumen del recinto sea menor de 10 m³ o la superficie de la zona de trabajo, inferior a 50 m². En cualquier caso, esta estimación del número de muestras es sólo aproximada y no tiene significación teórica, por lo que el responsable del muestreo puede juzgar en cada caso si fueran necesarias más muestras.

E.3 Criterios de recuento

Los criterios de recuento para las muestras tomadas en un punto fijo son las mismas que para las muestras personales aunque se recomienda contar hasta 200 campos ya que es muy probable que el número de fibras contadas en 100 campos sea muy pequeño.

En la mayor parte de las muestras es poco probable que se alcancen los valores de densidad mínima adecuada para el recuento de fibras, por lo que se deberán tener en cuenta las indicaciones del [capítulo 10](#) para la expresión e interpretación adecuada de los resultados.

Nota: Es importante considerar que en el ambiente, y por tanto en las muestras, puede haber otras fibras además de las fibras de interés. Esto puede significar una interferencia importante en el caso de las mediciones de amianto, dando lugar a que muestras de ambientes no contaminados den resultados por encima del límite inferior de recuento. Este problema no se puede resolver por este método, ya que no está permitido ningún tipo de diferenciación entre las fibras que no sea el estrictamente dimensional por lo que, si se presenta, es necesario recurrir a otros procedimientos basados en técnicas analíticas que permitan identificar cualitativamente las fibras como la microscopía electrónica.

ANEXO F

Determinación de la superficie efectiva del filtro

El área útil o superficie efectiva del filtro se calcula midiendo el diámetro de la superficie expuesta del filtro en la toma de muestra. Esta medida puede obtenerse aplicando el siguiente procedimiento:

- Se coloca una pequeña cantidad de polvo coloreado oscuro (por ejemplo, de carbón, cemento o arena) en un recipiente de 2 a 5 litros y se tapa.
- Se sacude el recipiente para provocar una nube de polvo, se quita la tapa y se introduce un muestreador conectado a una bomba de muestreo. Se muestrea aire del interior de recipiente hasta que se forme un depósito visible sobre el filtro.
- Se quita el filtro del soporte y se monta en un portaobjetos preparándolo como se describe en [7.1.3](#).
- Se coloca la preparación en la platina del microscopio. Mediante una observación a bajos aumentos se localiza el centro geométrico del círculo creado por el polvo en la superficie del filtro. A partir de dicho centro se localizan los extremos de un hipotético diámetro y se recorre de un punto a otro mediante el desplazamiento de la platina. La longitud del desplazamiento de la platina, calculada por diferencia de la posición del nonius entre ambos extremos, se tomará como una medida del diámetro de interés. Este diámetro no debe ser inferior a 20 mm.
- Se repite la medida para dos diámetros en cada filtro y tres filtros distintos en muestreadores separados. Cuando las medidas de los diámetros entre filtros no difieran en más de 1 mm se calcula su media aritmética y el resultado se utiliza como diámetro efectivo del filtro. En caso contrario, se deberá investigar el proceso de muestreo y de preparación de la muestra para descubrir las causas de esta anomalía.
- Si se utilizasen distintos tipos de muestreadores, el proceso de cálculo se debería repetir con cada uno de ellos.

Nota: Es aconsejable repetir todo el procedimiento de medida periódicamente (cada 12 meses aproximadamente) para asegurarse de que se conoce el área útil del filtro. También se ha de volver a medir si cambia alguno de los componentes del soporte que le puedan afectar.

Para cualquier observación o sugerencia en relación con este Método puede dirigirse al
Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
[Centro Nacional de Verificación de Maquinaria](#)
Camino de la Dinamita, s/n Monte Basatxu-Cruces - 48903 BARACALDO (VIZCAYA)
Tfn. 944 990 211 - 944 990 543 Fax 944 990 678
Correo electrónico.- cnvminsht@mtas.es

