



## GUÍA TÉCNICA

# Biodegradabilidad aeróbica en sustancias orgánicas:

Un enfoque top-down para  
la estimación de la incertidumbre de medida



MAYO, 2022



CENTRO PARA LA INVESTIGACIÓN  
EN RECURSOS ACUÁTICOS  
DE NICARAGUA

CIRA/UNAN-MANAGUA



# Fondo Regional Infraestructura de la Calidad para Biodiversidad y Protección del Clima

## Institución cooperante



Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB)  
Instituto Nacional de Metrología, Alemania  
Bundesallee 100  
38116 Braunschweig, Germany  
[www.ptb.de](http://www.ptb.de)

## Participantes



### Elaboración del documento:

Lic. Mariana Papa, *Investigadora, Departamento de Manejo y Gestión de Sustancias Químicas (DMyGSQ), INTI.*

**e-mail:** [mpapa@inti.gob.ar](mailto:mpapa@inti.gob.ar)

Lic. Soledad Barbelli, *Investigadora, Departamento de Manejo y Gestión de Sustancias Químicas (DMyGSQ), INTI.*

**e-mail:** [barbelli@inti.gob.ar](mailto:barbelli@inti.gob.ar)

Lic. Jimmy Venegas Padilla, *Investigador, Departamento Metrología Química, LCM.*

**e-mail:** [jvenegas@lcm.go.cr](mailto:jvenegas@lcm.go.cr)

### Comité organizador:

Franziska Kamm, *Coordinadora de proyecto, PTB.*

Beatriz Paniagua Valverde, *Consultora, PTB.*

### Revisión técnica de la guía:

Lic. Marisa Delbon, *Investigadora, Departamento de Calidad en las Mediciones, INTI.*

Lic. Silvina Aued, *Investigadora, Departamento de Calidad en las Mediciones, INTI.*

Ricardo Irigay, *Investigador, Departamento de Calidad de Agua y Evaluación Ambiental, LATU.*

Ing. Gabriel Molina Castro, *Investigador, Departamento Metrología Química, LCM.*

Dr. Bryan Calderón Jiménez, *Investigador, Departamento Metrología Química, LCM.*



## Contenido

1. Antecedentes .....	4
2. Objetivo general y específicos .....	6
2.1. Objetivo general .....	6
2.2. Objetivos específicos .....	6
3. Abreviaciones y simbología .....	7
3.1. Abreviaciones .....	7
3.2. Simbología .....	8
4. Introducción .....	9
5. Estimación de incertidumbre por el enfoque “top-down” .....	17
5.1. Procedimiento para la estimación de incertidumbre con el enfoque “top-down” para el método de biodegradabilidad aeróbica “fácil” .....	18
6. Conclusiones .....	30
7. Agradecimientos .....	32
8. Referencias bibliográficas .....	33
9. Anexo 1 .....	38
10. Anexo 2 .....	40



# 1. Antecedentes

A partir de la *Conferencia de Estocolmo* del año 1972 se reconoció el derecho a un ambiente sano, el cual fue ratificado por la mayoría de los países a nivel mundial, y fue ampliado y vuelto a ratificar en la *Conferencia de Río* en 1992, donde el desarrollo sostenible continuó siendo el concepto central ante la evidencia de que las actividades humanas, en busca del crecimiento económico, eran responsables de las principales amenazas ambientales (Devia, Krom, & Nonna, 2019). En dicha conferencia se firmó también el *Convenio sobre la Diversidad Biológica*, cuyo objetivo principal es la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios (ONU, 1992). Otro hito importante es la firma del *Acuerdo de Escazú* que reconoce el derecho a la información, a la participación y a la justicia en asuntos ambientales para los países de Latinoamérica y el Caribe (ONU, 2018).

Con el objetivo de ratificar los *Convenios y Acuerdos* para preservar el medio ambiente se han desarrollado a nivel mundial nuevos mecanismos para mitigar el impacto de las actividades humanas en el ambiente. Específicamente, para el manejo, fabricación y comercialización de sustancias químicas actualmente se debe cumplir con normativas y reglamentaciones que apuntan al cuidado de la salud y el medio ambiente; por ejemplo, el mercado europeo se rige por el REACH (European Chemicals Agency, 2022), el cual se aplica a todas las sustancias químicas que intervienen en procesos industriales y que están presentes en productos de nuestra vida diaria (Parlamento Europeo y del Consejo, 2020). Una vez que las sustancias químicas son producidas y comercializadas a nivel global, las mismas deben ser clasificadas según el Sistema Globalmente Armonizado de productos químicos (SGA), el cual establece criterios para sustancias puras y mezclas, con el objetivo de clasificar y comunicar respecto a sus peligros físicos, a la salud y al medio ambiente (ONU, 2017).

## GUÍA TÉCNICA

### Biodegradabilidad aeróbica en sustancias orgánicas: Un enfoque top-down para la estimación de la incertidumbre de medida

Con el propósito de fortalecer a la región en las mediciones de parámetros de relevancia ambiental, el Ministerio Federal de Cooperación Económica y Desarrollo (BMZ, por sus siglas en alemán) de Alemania por medio del Instituto de Metrología de Alemania (PTB, por sus siglas en alemán) y en el marco del Fondo Regional de Infraestructura de la Calidad para la Protección de la Biodiversidad y el Clima en América Latina y el Caribe (PTB, 2014), financió el desarrollo del proyecto regional en Latinoamérica denominado “Aseguramiento de la calidad en las mediciones requeridas para la determinación de la biodegradabilidad de sustancias químicas”. En el cual se armonizaron criterios técnicos e implementó la determinación de la biodegradabilidad aeróbica “fácil” por el método de análisis de la demanda bioquímica de oxígeno, ensayo de botella cerrada (ISO 10707:1994), con su respectivo aseguramiento de la validez de los resultados y se evaluó la comparabilidad de las mediciones de biodegradabilidad en productos de limpieza por medio de un ensayo de aptitud (LACOMET, 2019).

Esta guía brinda a la comunidad científica y técnica una estrategia simple, práctica y económica de estimación de incertidumbre por medio del enfoque “top-down”, a partir de datos de control de calidad o datos de experimentos de verificación de ensayos de biodegradabilidad “fácil”. Los conocimientos adquiridos durante la ejecución del proyecto, las mediciones realizadas por diferentes laboratorios y el desarrollo de ensayos de aptitud, brindaron insumos e información de suma importancia para abordar la estimación de la incertidumbre para el ensayo de biodegradabilidad “fácil” por el método de análisis de la demanda bioquímica de oxígeno (ISO 10707: 1994), o su método equivalente OECD 301D Ensayo de Botella Cerrada (OECD, 1992).



## 2. Objetivo general y específicos

---

### 2.1. Objetivo general

Establecer una guía técnica para la estimación de incertidumbre de medida basada en un enfoque de análisis “top-down” que sirva de insumo metrológico para laboratorios de ensayo en las mediciones de biodegradabilidad “fácil” de sustancias orgánicas solubles en medio acuoso.

### 2.2. Objetivos específicos

1. Establecer los lineamientos para la correcta identificación y cuantificación de las fuentes de incertidumbre de medida para la medición de biodegradabilidad “fácil” por medio de un enfoque “top-down”.
2. Estimar la incertidumbre de medida en el ensayo de biodegradabilidad “fácil” en ensayos de sustancias orgánicas solubles en medio acuoso presentes en productos de limpieza, tomando como caso de estudio los datos históricos como fuente de incertidumbre por precisión y comparaciones interlaboratorios como fuente de incertidumbre por sesgo.



## 3. Abreviaciones y simbología

### 3.1. Abreviaciones

<b>C</b>	Carbono
<b>COD</b>	Carbono orgánico disuelto o DOC por sus siglas en inglés
<b>DQO</b>	Demanda química de oxígeno
<b>DMyGSQ</b>	Departamento de Manejo y Gestión de Sustancias Químicas
<b>EA</b>	Ensayos de aptitud
<b>GUM</b>	Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida por sus siglas en inglés
<b>INTI</b>	Instituto Nacional de Tecnología Industrial
<b>ISO</b>	Organización Internacional de Normalización, por sus siglas en inglés
<b>IC</b>	Intercomparaciones; comparación interlaboratorios
<b>LCM</b>	Laboratorio Costarricense de Metrología
<b>MRC</b>	Material de referencia certificado
<b>OECD</b>	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, por sus siglas en inglés
<b>REACH</b>	Reglamento relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos, por sus siglas en inglés
<b>RMS</b>	Sesgo cuadrático medio, por sus siglas en inglés
<b>SGA</b>	Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado
<b>SS</b>	Sólidos suspendidos
<b>ThIC</b>	Carbono inorgánico teórico
<b>ThOD</b>	Demanda teórica de oxígeno
<b>ThCO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono teórico

### 3.2. Simbología

$q$	Cantidad de réplicas requeridas por el método de medición
$k$	Coeficiente de cobertura de la incertidumbre expandida
$s$	Desviación típica o estándar
$u_c$	Incertidumbre estándar combinada
$u_i$	Incertidumbre estándar del componente $i$
$U$	Incertidumbre expandida
$n$	Número de datos independientes o réplicas por muestra
$m$	Número de muestras utilizados para estimar el rango promedio
$p$	Número de resultados satisfactorios en un EA o IC
$\bar{X}$	Promedio aritmético
$x_i$	Valor de dato $i$
$X_{\text{ref EA}}$	Valor de referencia o valor asignado en un EA o IC
$X_{\text{lab } i}$	Resultado del participante $i$
$S_L$	Varianza de precisión intermedia asociada al factor
$S_r$	Varianza por repetibilidad
$S_M$	Varianza por repetibilidad de las muestras de rutina

-----

**Nota:** Para una mejor comprensión de la presente guía recomendamos consultar las definiciones del Vocabulario Internacional de Metrología (JCGM 200, 2012).



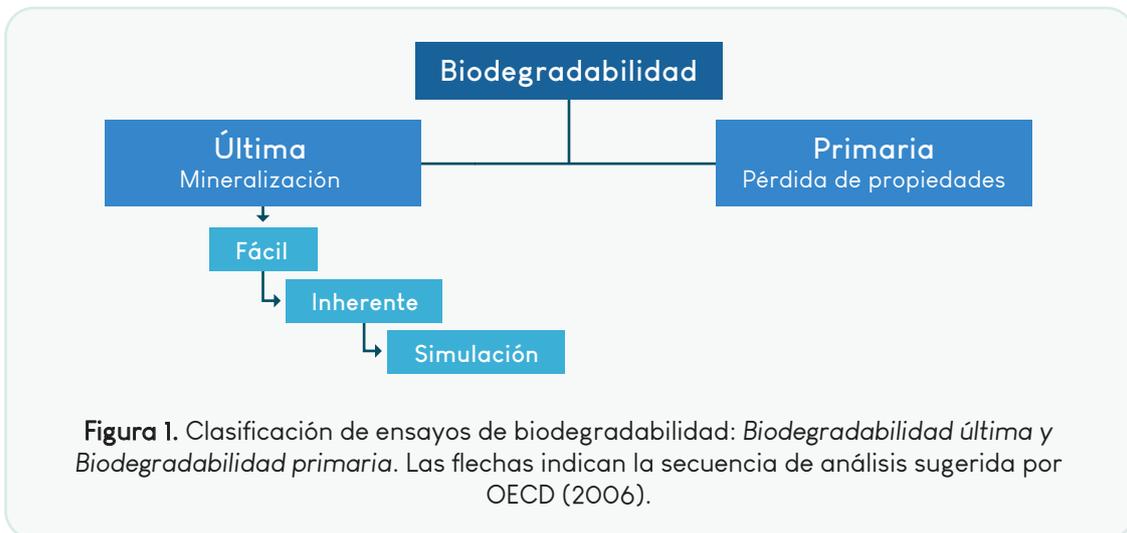
## 4. Introducción

La dinámica comercial de productos y servicios han incluido en los últimos años el factor de sostenibilidad ambiental. El modelo de producción y consumo lineal en las últimas décadas ha comenzado a ser paulatinamente sustituido por el modelo de economía circular, el cual está basado en los principios de la economía ecológica y la ecología industrial (Wautelet, 2018). Este marco teórico se enfoca en la interdependencia de la economía humana y los ecosistemas, permitiendo la integración de metas sociales, ecológicas y económicas (Gutberlet, Carenzo, Kain, & Martiniano de Azevedo, 2017).

La industria de productos de limpieza utiliza una alta diversidad de sustancias químicas: surfactantes, agentes acomplejantes, solventes, fragancias, entre otros (McCabe, Clement, & Ochoa, 2008). Específicamente los surfactantes, además de ser componentes principales de los productos de limpieza, son ampliamente utilizados por sus múltiples aplicaciones en diversas áreas como la agricultura y las industrias del petróleo, textil, cosmética y farmacéutica (Schramm, Stasiuk, & Marangoni, 2003). Es importante recalcar que, en ocasiones, los productos de limpieza pueden contener sustancias químicas que ocasionen o promuevan problemas de salud (alergias, asma, disrupciones endocrinas) o daños ambientales (Jardak, Drogui, & Daghrir, 2016). Por esta razón, los ecosistemas pueden ser afectados por el uso de sustancias químicas persistentes y la descarga de efluentes sin tratamiento (Acir & Guenther, 2018; Rebello, Asok, Mundayoor, & Jisha, 2014; Danish Agency Environmental Protection, 2001). La evaluación del potencial peligro ambiental de las sustancias químicas orgánicas presentes en los productos de limpieza, por medio de ensayos de biodegradabilidad, ha sido fundamental para poder demostrar que los cambios en los modelos de producción generan un menor impacto sobre los ecosistemas (OECD, 2006). Tanto las reglamentaciones de uso como los sistemas de etiquetado de sustancias químicas requieren la evaluación de la biodegradabilidad. De igual manera, estas mediciones son indispensables para investigar el potencial de bioacumulación y la ecotoxicidad de las sustancias químicas orgánicas en organismos pertenecientes a distintos

niveles tróficos, brindando herramientas para esclarecer los posibles efectos en los ecosistemas de forma integral (ONU, 2017).

Existe una gran variedad de ensayos para evaluar la biodegradabilidad que pueden clasificarse dentro de tres grupos principales, y que constituyen, de acuerdo con los lineamientos propuestos en OECD (2006), etapas secuenciales en el análisis de la biodegradabilidad de una sustancia orgánica (ver **Figura 1**). El primer grupo son los *ensayos de biodegradabilidad fácil o rápida*, estos ensayos son los más estrictos, ya que utilizan inóculos (microorganismos) no adaptados a la muestra a evaluar y brindan información del grado de degradación última en la mayoría de los ambientes acuáticos, incluyendo sistemas de tratamiento de efluentes. El siguiente grupo involucra a los *ensayos de biodegradabilidad inherente*, los cuales ofrecen condiciones más favorables para la degradación y pueden realizarse con microorganismos adaptados. Por último, los *ensayos de simulación*, que abarcan diferentes condiciones ambientalmente relevantes a fin de determinar la tasa de degradación, suelen utilizar microorganismos nativos y los resultados obtenidos están restringidos a las condiciones ensayadas.



Los ensayos de *biodegradabilidad fácil*, al constituir el primer paso para evaluación de biodegradabilidad de sustancias químicas orgánicas, son masivamente utilizados, mientras que los ensayos de biodegradabilidad inherente o simulación son considerados evaluaciones de segunda instancia, destinadas a sustancias que no resultan fácilmente biodegradables, o

## GUÍA TÉCNICA

### Biodegradabilidad aeróbica en sustancias orgánicas: Un enfoque top-down para la estimación de la incertidumbre de medida

investigaciones que tengan por objeto puntualizar sobre su destino en un ambiente específico. Dentro de estos ensayos, las guías OECD describen siete métodos, cuyas principales características se resumen en la **Tabla 1** (OECD, 1992; OECD, 2006).

**Tabla 1.** Principales características de los diferentes métodos de ensayos de biodegradabilidad fácil o rápida (OECD, 1992; OECD, 2006).

Método	Condiciones de incubación	Volumen de ensayo	Concentración de la sustancia a evaluar	Fuente de inóculo	Concentración de inóculo	Nivel de corte
OECD 301 A ISO 7827: 1994	28 días, aeróbico, en agitación.	(0,25-2) L	(10-40) mg/L de DOC	Lodos activados, efluentes cloacales, aguas superficiales, suelo o mezcla de ellos.	< 30 mg/L de efluente sedimentado	70% Remoción de DOC
OECD 301 B	28 días, aeróbico, aireación continua.	(2-5) L	(10-20) mg/L de DOC		< 100 mL efluente/L (10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> ) células/L	60% producción de ThCO <sub>2</sub>
OECD 301 C	28 días, aeróbico, en agitación.	Respirómetro	100 mg/L	Mezcla de muestras frescas de efluentes cloacales o industriales, lodos activados, agua superficial o suelo.	< 30 mg/L de efluente sedimentado (10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> ) células/L	60% de ThOD
OECD 301 D ISO 10707: 1994	28 días, aeróbico, estático.	300 mL	(2-10) mg/L o (5-10) mg/L de ThOD	Derivado de efluente secundario del tratamiento de efluentes o lodos activados de escala laboratorio, predominantemente de efluentes domésticos. Alternativamente, agua superficial, suelo, etc.	< 5 mL de efluente/L (10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup> ) células/L	60% de ThOD

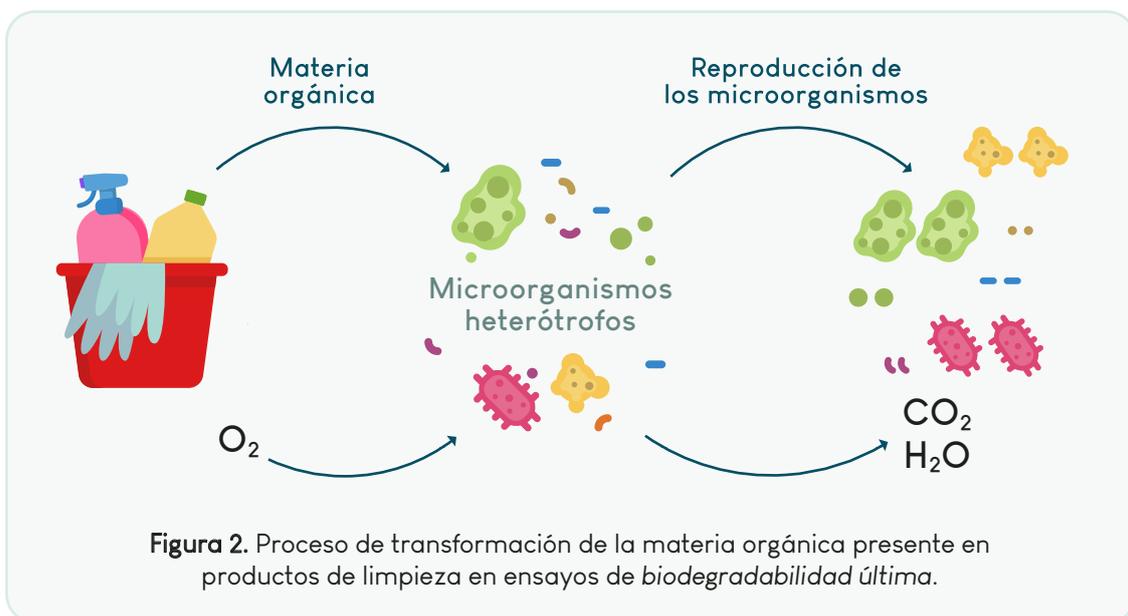
## GUÍA TÉCNICA

### Biodegradabilidad aeróbica en sustancias orgánicas: Un enfoque top-down para la estimación de la incertidumbre de medida

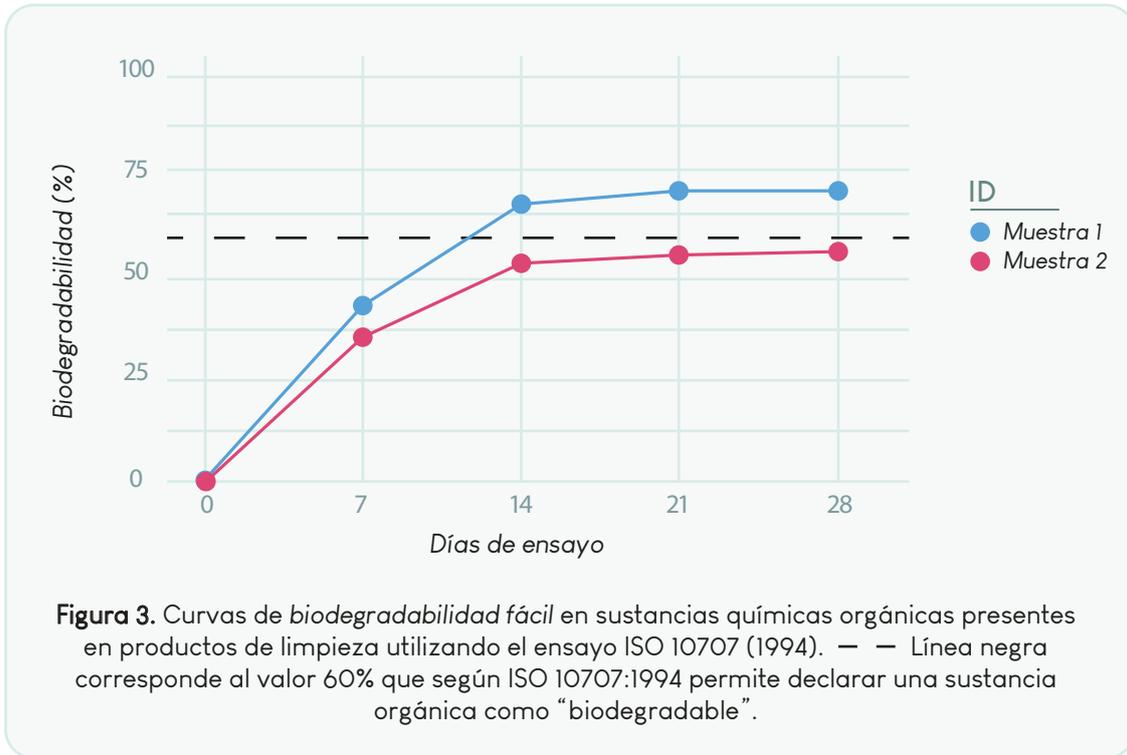
Método	Condiciones de incubación	Volumen de ensayo	Concentración de la sustancia a evaluar	Fuente de inóculo	Concentración de inóculo	Nivel de corte
OECD 301 E ISO 7827: 1994	28 días, aeróbico, en agitación. Medio con elementos traza y factores de crecimiento.	(0,25-2) L	(10-40) mg/L de DOC	Derivado de efluente secundario del tratamiento de efluentes o lodos activados de escala laboratorio, predominantemente de efluentes domésticos.	< 0,5 mL de efluente/L 10 <sup>5</sup> células/L	70% Remoción de DOC
OECD 301 F ISO 9408: 1999	28 días, aeróbico, en agitación.	Respirómetro	100 mg/L de ThOD o (50-100) mg/L de ThOD	Lodos activados, efluentes cloacales, aguas superficiales, suelo o mezcla de ellos.	< 30 mg/L de efluente sedimentado < 100 mL efluente/L (10 <sup>7</sup> -10 <sup>8</sup> ) células/L	60% del ThOD
OECD 310	28 días, aeróbico, en agitación.	125 mL	(20-40) mg/L de C	Lodos activados, efluentes cloacales, aguas superficiales, suelo o mezcla de ellos.	(4-30) mg/L de SS o 10% v/v de efluente secundario	60% producción de ThIC

La selección del método más adecuado para evaluar biodegradabilidad depende de las propiedades intrínsecas de los compuestos, las condiciones de uso y las formas de eliminación al medio ambiente. Estas variables y los alcances de cada metodología están descritos en la norma (ISO/TR 15462:2006). En todos los casos, la sustancia a evaluar constituye la única fuente de carbono exógena y la cuantificación se realiza mediante una medición analítica no específica, gracias a lo cual pueden aplicarse a una gran variedad de compuestos sin la necesidad de implementar procedimientos analíticos específicos (OECD, 2006). Los métodos analíticos empleados cuantifican también la degradación de productos intermedios, por lo cual el resultado obtenido corresponde a la *biodegradabilidad última*, es decir la transformación de la materia orgánica en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, sales

minerales y biomasa (ver **Figura 2**). Una sustancia química puede ser clasificada como fácilmente biodegradable cuando alcanza una reducción del 60% en demanda teórica de oxígeno o producción teórica de  $\text{CO}_2$ , o del 70% en el caso de carbono orgánico disuelto (COD o DOC por sus siglas en inglés). Dichos porcentajes corresponden a una degradación prácticamente completa, considerando que la materia orgánica restante es asimilada por las células o utilizada por las mismas para la síntesis de biomoléculas (OECD, 2006).



La **Figura 3** muestra un gráfico con los resultados de *biodegradabilidad fácil* utilizando el ensayo ISO 10707:1994 para evaluar la biodegradabilidad de sustancias químicas orgánicas presentes en productos de limpieza.



Los laboratorios que evalúan biodegradabilidad de sustancias químicas orgánicas requieren de herramientas para declarar el cumplimiento del nivel umbral establecido por las metodologías, con el objetivo de informar los resultados considerando el nivel de riesgo asociado a la regla de decisión empleada (ISO/IEC 17025:2017). La incertidumbre asociada a las mediciones es un factor fundamental para aplicar la regla de decisión (ISO/IEC Guide 98:2012) y por lo tanto para declarar cumplimiento con el nivel umbral establecido. En el caso de los ensayos de biodegradabilidad, constituye un aspecto poco desarrollado pero su estimación aporta un alto nivel de confianza a la declaración de biodegradabilidad de las sustancias químicas orgánicas ensayadas.

Es importante tener en cuenta, para la interpretación de los resultados de ensayos de biodegradabilidad fácil, que las condiciones estandarizadas en las que se realizan los ensayos a nivel de laboratorio distan de las condiciones reales a las que las sustancias químicas serán expuestas en el ambiente (Ahtiainen, Aalto, & Pessala, 2003; Brillet, Maul, Durand, & Thouand, 2016; Kowalczyk, y otros, 2015). Los compuestos son ensayados en concentraciones elevadas, que difícilmente ocurrirían en el ambiente,

y las condiciones estandarizadas de incubación no reflejan la alta variabilidad de las condiciones ambientales, como por ejemplo la estacionalidad (Kowalczyk, y otros, 2015). Los procesos de degradación biológica que ocurren en los distintos compartimentos naturales son fenómenos sumamente complejos, donde se observan cinéticas de degradación diferentes en comparación con las que se presentan en ensayos estandarizados (Brillet, Maul, Durand, & Thouand, 2016). Tanto las condiciones fisicoquímicas como la naturaleza de las poblaciones microbianas propias del ambiente son difíciles de reproducir en el laboratorio (Kowalczyk, y otros, 2015; Pagga, 1997). En este sentido, los ensayos de biodegradabilidad fácil constituyen una prueba relativamente simple y conservadora, y, por lo tanto, adecuada para la clasificación de sustancias químicas y su evaluación de riesgo (Kowalczyk, y otros, 2015; Ahtiainen, Aalto, & Pessala, 2003; OECD, 2006). A pesar de su estandarización, su amplia utilización en marcos regulatorios y de la gran cantidad de información obtenida desde su introducción en la década de 1980, frecuentemente se advierte respecto a sus altos niveles de variabilidad (entre réplicas, entre ensayos, entre laboratorios y a través del tiempo) (Kowalczyk, y otros, 2015; Comber & Holt, 2010). Estas afirmaciones se basan principalmente en los resultados obtenidos en escasos informes de ensayos interlaboratorio (Nyholm, Jørgensen, & Hansen, 1984; OECD, 1995).

Con frecuencia se atribuye a la variabilidad del inóculo, tanto en cuanto a densidad celular como a su diversidad, como principal responsable de la dispersión de los datos en los ensayos de biodegradabilidad (Mezzanotte, Bertani, Degli Innocenti, & Tosin, 2005; Thouand, Durand, Maul, Gancet, & Blok, 2011; Vázquez Rodríguez, Beltrán Hernández, Coronel Olivares, & Luc Rols, 2011; Brillet, Maul, Durand, & Thouand, 2016). Los lineamientos de la OECD permiten diversas fuentes de inóculos (lodos activados, efluentes cloacales, aguas superficiales, suelo y mezclas) y un rango amplio de concentración (ver detalles en **Tabla 1**). Las variaciones en la fuente, concentración y pretratamiento del inóculo tienen un impacto en su diversidad y por consiguiente en su capacidad de degradación (Gothead, Head, Snape, & Davenport, 2014; Vázquez Rodríguez, Beltrán Hernández, Coronel Olivares, & Luc Rols, 2011). La posibilidad de aumentar la comparabilidad de los ensayos mediante la estandarización del inóculo fue abordada en los diferentes encuentros convocados por el Centro Europeo

de Ecotoxicología y Toxicología de Sustancias Químicas (ECETOC, 2003; ECETOC, 2007). Sin embargo, dicha estandarización no puede realizarse sin reducir, al mismo tiempo, el número de especies presentes en los ensayos y por lo tanto, no es recomendable (OECD, 2006). La aplicación de técnicas modernas de metagenómica para el estudio de la degradación de tensioactivos en reactores de lodos activados permitió estudiar la influencia del origen del inóculo y las características del efluentes sobre la estructura de la comunidad microbiana y la eficiencia de los reactores (Chen, y otros, 2019). De forma similar, podría aplicarse este tipo de análisis a los ensayos de biodegradabilidad fácil, con el objetivo de determinar la influencia de diversidad inicial de microorganismos en el desarrollo de la estructura de la comunidad y su influencia sobre los resultados de los ensayos.

Es por todo lo anterior, que la correcta caracterización de la precisión y veracidad de los métodos, así como la estimación de la incertidumbre de medida, resultan fundamentales para la evaluación de cualquier recomendación de mejora de los métodos. Sin embargo, en los ensayos de biodegradabilidad, la información disponible de la reproducibilidad es escasa para ser utilizada en la estimación de la incertidumbre de medida. Por consiguiente, el desarrollo de esta guía técnica pretende ser de utilidad para los laboratorios que realizan ensayos de biodegradabilidad fácil en sustancias orgánicas solubles en medios acuosos, al brindar lineamientos técnicos simples para la estimación de la incertidumbre mediante el enfoque “top-down” para el método de análisis de la demanda bioquímica de oxígeno, ensayo de botella cerrada (ISO 10707:1994).

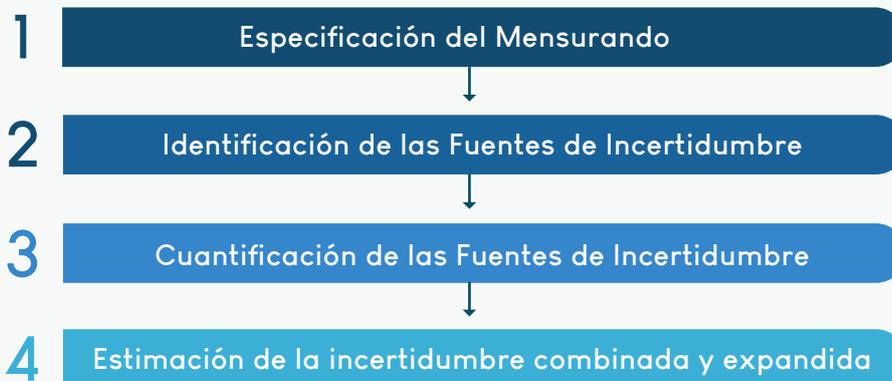


## 5. Estimación de incertidumbre por el enfoque “top-down”

La estimación de la incertidumbre de medida es indispensable para evaluar la confiabilidad de una medición. Existen diversos enfoques de estimación de la incertidumbre de medida y cada uno de ellos brinda ventajas y limitaciones (Priel, 2009). *La Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida* (GUM, 2008) es el principal documento de orientación que establece las reglas generales para evaluar y expresar la estimación de incertidumbre; no obstante, este método está dirigido a estimar incertidumbres en modelos matemáticos donde todas las fuentes de incertidumbre son altamente conocidas y pueden ser combinadas individualmente para obtener una incertidumbre combinada global (enfoque “bottom-up”). En algunas mediciones cuantitativas el abordaje propuesto por la GUM se ha considerado difícil de aplicar (Lee, y otros, 2015) dado que no es posible identificar, asociar y evaluar individualmente todas las contribuciones de incertidumbre de una magnitud definida para posteriormente combinar dichas contribuciones (EUROLAB, 2007). Con el objetivo de ampliar el campo de aplicación de la GUM para estimar la incertidumbre de medida, se han diseñado enfoques alternativos que cumplen con sus principios. Específicamente, uno de los enfoques alternativos es el “top-down”, el cual se basa en estimar directa y globalmente la incertidumbre de medición a partir de los datos que describen el desempeño de un método en los parámetros de precisión y veracidad. Dichos datos son adquiridos por medio de estudios de control de calidad, participaciones en ensayos de aptitud, comparaciones interlaboratorios y estudios de validación del método, entre otros (EUROLAB, 2007). Es importante destacar, que estos enfoques alternativos son aceptados para el cumplimiento de los requisitos de la norma ISO/IEC 17025:2017 (Priel, 2009) y, además, son una forma práctica y simple de estimar la incertidumbre de medición.

## 5.1. Procedimiento para la estimación de incertidumbre con el enfoque “top-down” para el método de biodegradabilidad aeróbica “fácil”

Para lograr una buena estimación de la incertidumbre se debe tener una clara definición del mensurando, así como una comprensión integral del procedimiento del método de ensayo y un análisis crítico de las posibles variables que afectan los resultados de medida. La **Figura 4** muestra las principales etapas en la que se basa la presente guía para estimar la incertidumbre de medida con el enfoque “top-down”.



**Figura 4.** Etapas secuenciales para la estimación de la incertidumbre de medida con el enfoque “top-down”.

A continuación, se detalla el procedimiento de estimación de incertidumbre de medida con el enfoque “top-down” (Ellison & Williams, 2012) para la medición de la biodegradabilidad por el método de análisis de la demanda bioquímica de oxígeno, ensayo de botella cerrada (ISO 10707:1994). Para ello, se utilizaron datos históricos de mediciones con inóculo de lodos activados, desarrollos por del Departamento de Manejo y Gestión de Sustancias Químicas (DMyGSQ) del Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) de Argentina y los resultados del ensayo de aptitud organizado en el marco del proyecto regional “Aseguramiento de la calidad en las mediciones requeridas para la determinación de la biodegradabilidad de sustancias químicas”. Las muestras analizadas corresponden a productos de uso industrial y doméstico, principalmente productos de limpieza, que contienen sustancias orgánicas.

## Etapa 1

### Especificación del mensurando

La especificación del mensurando se refiere a describir, de forma clara y sin ambigüedades, qué se va a medir. Una forma práctica para identificar claramente el mensurando es completar la siguiente oración: [mensurando] en la [matriz] por el [método] (B. Magnusson, 2017). Esta definición establece de forma intrínseca un modelo matemático asociado, que permite la estimación del valor atribuible al mensurando. Esta expresión cuantitativa debe permitir relacionar el valor del mensurando con los parámetros de los que depende (Ellison & Williams, 2012; EUROLAB, 2007).

Para efectos de la biodegradabilidad aeróbica “fácil” en sustancias orgánicas a continuación se describe el modelo matemático aplicado a la matriz de productos de limpieza. El alcance abarca materias primas, así como los productos formulados que no presenten toxicidad en las concentraciones de ensayo y que sean solubles o que formen dispersiones homogéneas y estables en medio acuoso.

**Definición del mensurando:** Porcentaje de biodegradabilidad última fácil de sustancias orgánicas solubles en medio acuoso, por medio del método de análisis de la demanda bioquímica de oxígeno, ensayo de botella cerrada (ISO 10707:1994).

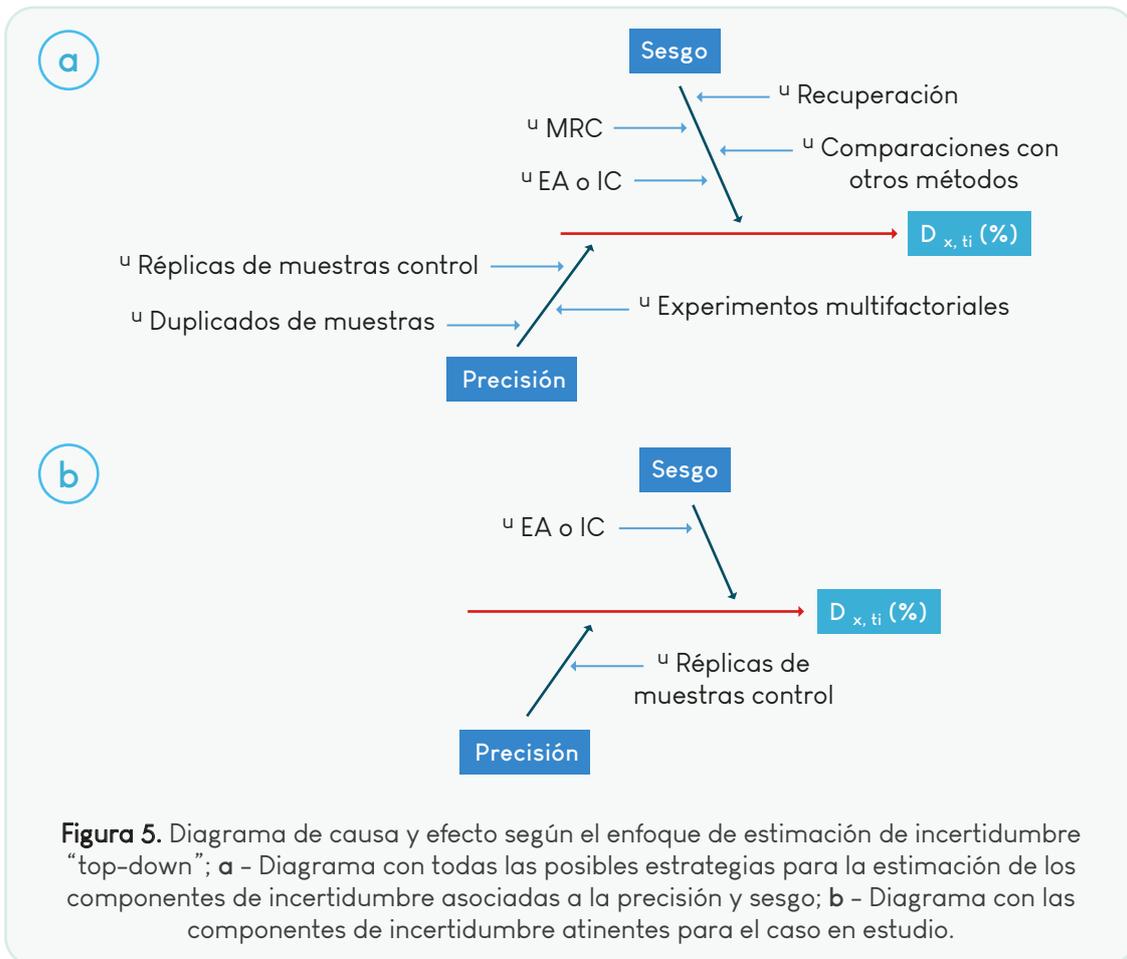
$$\text{Ec. 1} \quad D_{x_{t_i}}(\%) = \frac{(p_{x_{t_0}} - p_{x_{t_i}}) - (p_{b_{t_0}} - p_{b_{t_i}})}{DQO_x \cdot p_c} \cdot 100$$

donde  $D_{x_{t_i}}$  es la biodegradabilidad de la muestra  $x$  bajo ensayo en el tiempo  $i$  en unidades de porcentaje (%),  $p_{x_{t_i}}$  es la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo  $i$  en unidades de mg/L de la muestra  $x$  bajo ensayo,  $p_{x_{t_0}}$  es la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo cero en unidades de mg/L de la sustancia orgánica  $x$  bajo ensayo,  $p_{b_{t_0}}$  es la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo cero en unidades de mg/L del blanco,  $p_{b_{t_i}}$  es la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo  $i$  en unidades de mg/L del blanco,  $DQO_x$  es la demanda química de oxígeno para la muestra  $x$  en unidades de mg/mg,  $p_c$  es la concentración de la muestra  $x$  en unidades de mg/L en la botella de ensayo.

Etapa 2

Identificación de fuentes de incertidumbre

Para lograr una buena identificación de las principales fuentes de incertidumbre se debe realizar un análisis minucioso del procedimiento de medición (Ellison & Williams, 2012). Habitualmente se representan las fuentes de incertidumbre asociadas al mensurando por medio de un diagrama de causa-efecto (EUROLAB, 2007). En lo que concierne al método en estudio, la estimación de la incertidumbre con el enfoque “top-down” se reduce a las fuentes de incertidumbre asociadas a la precisión y sesgo del método, y sus respectivos componentes como se muestra en el diagrama de causa-efecto de la **Figura 5** (EUROLAB, 2007).



**Figura 5.** Diagrama de causa y efecto según el enfoque de estimación de incertidumbre “top-down”; **a** - Diagrama con todas las posibles estrategias para la estimación de los componentes de incertidumbre asociadas a la precisión y sesgo; **b** - Diagrama con las componentes de incertidumbre atinentes para el caso en estudio.

Estas dos fuentes de incertidumbre se consideran contribuciones dominantes en la estimación de la incertidumbre y, además, son parámetros que describen el desempeño general del método por lo que su modelización y efectos sobre el resultado de medida se interpretan mejor por separado (Ellison & Williams, 2012). Es importante destacar que en la **Figura 5-a** se muestran todas las posibles estrategias para cuantificar dichas componentes de incertidumbre, pero posteriormente se utilizan únicamente aquellas que permiten la estimación de los componentes de incertidumbre atinentes con la información disponible para el caso en estudio (**Figura 5-b**).

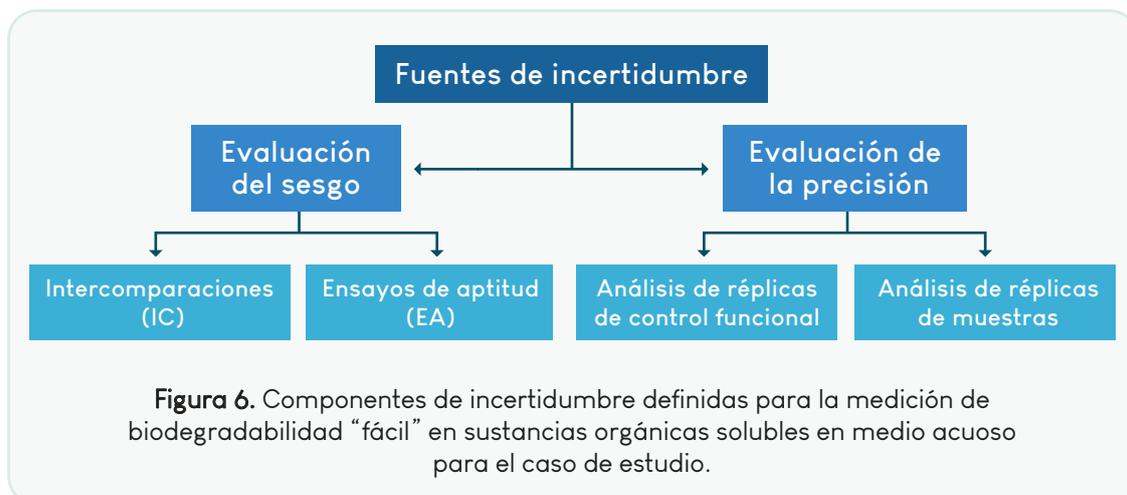
### Etapa 3

#### Cuantificación de los componentes de incertidumbre

Con la información disponible del desempeño del método se deben realizar dos acciones:

- A partir del análisis desarrollado en la etapa 2, se realiza una asociación entre las fuentes identificadas y los datos disponibles, lo cual permitiría identificar los componentes a los que se les podrá cuantificar su contribución de incertidumbre (Ellison & Barwick, 1998).
- Para aquellas fuentes que no se les pueda estimar su contribución de incertidumbre con la información disponible, se debe elaborar un plan que permita obtener los datos necesarios. Eso puede significar el desarrollo de diseños experimentales o una búsqueda de información en literatura, certificados, especificaciones técnicas de equipos, entre otros (Ellison & Williams, 2012).

La **Figura 6** muestra las principales fuentes de incertidumbre que se pueden cuantificar a partir de los datos históricos de la medición de biodegradabilidad en sustancias orgánicas solubles en medio acuoso por el método ISO 10707 con inóculo de lodos activados del DMyGSQ del INTI y los resultados del ensayo de aptitud organizado en el marco del proyecto regional.



A continuación, se detalla cómo estimar la contribución de incertidumbre según la fuente de incertidumbre y la información de desempeño del método disponible:

- **Precisión del método dentro de un laboratorio**

Esta componente de incertidumbre expresa la precisión intermedia y repetibilidad del método dentro del laboratorio utilizando datos históricos de una muestra cuyo comportamiento o propiedad a medir se encuentre definido (por ejemplo, muestras de control). Para estimar esta componente de incertidumbre se pueden utilizar, alternativamente, los datos provenientes de:

- **Muestras control que cubran el ámbito de trabajo del método de ensayo:** corresponden a mediciones realizadas en tiempos definidos para estudiar la variabilidad del sistema de medición. Para el método en estudio, cubrir el ámbito de trabajo implicaría disponer de muestras control tanto biodegradables como no biodegradables.
- **Mediciones de muestras control y muestras de rutina:** corresponden a mediciones (repeticiones) realizadas a una muestra control biodegradable y datos provenientes de análisis de las muestras de rutina (al menos por duplicado) con diferentes niveles de biodegradabilidad.

Los datos históricos del DMyGSQ del INTI disponibles para el estudio de estimación de la componente de incertidumbre de precisión del método se describen en la **Tabla 2**. Para efectos del ejemplo que se desarrolla en la presente guía la componente de incertidumbre para la fuente de precisión se definió, en primera instancia, a partir del análisis de los datos históricos de controles funcionales (muestra control) y muestras de análisis de rutina, debido a que dichos datos fueron tomados bajo condiciones de repetibilidad y precisión intermedia como lo recomienda Ellison & Williams (2012). Es importante destacar, que según el método de ensayo ISO 10707:1994 un control funcional es una sustancia orgánica conocida y con una estructura química simple, la cual debe superar un 60% de biodegradabilidad después de los 14 días del ensayo.

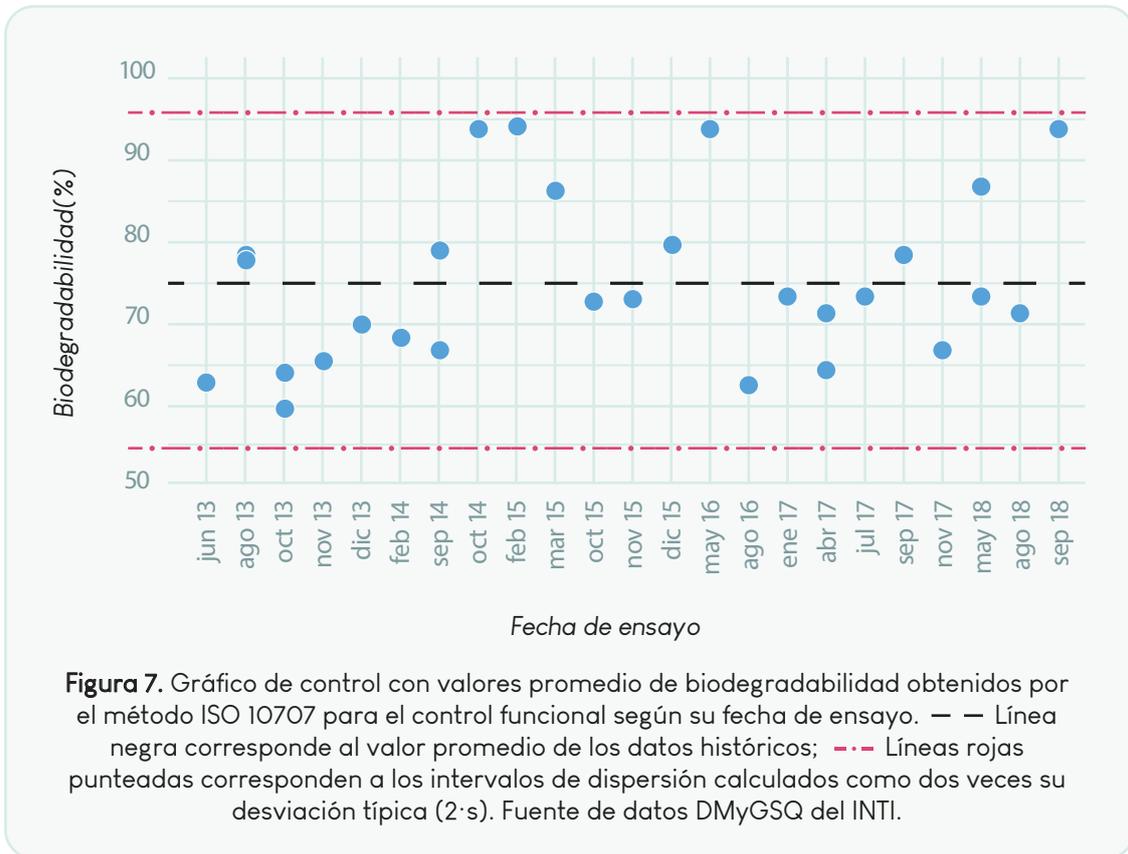
**Tabla 2.** Descripción de los datos históricos del DMyGSQ del INTI disponibles para el estudio de estimación la componente de incertidumbre por precisión del método de medición de biodegradabilidad “fácil” en sustancias orgánicas solubles en medio acuoso.

Fuente de datos	Sustancia orgánica de referencia	Número de datos	Réplicas por dato	Tiempo de ensayo	Fecha de datos
Datos de controles funcionales	Acetato de sodio (NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	28	Triplicados y duplicados	28 días	2013 al 2018
Datos de muestras de análisis	No aplica	43	Triplicados y duplicados	28 días	2013 al 2019

Los datos históricos del DGyMSQ del INTI de control funcional corresponden al análisis del acetato de sodio, cuya variabilidad observada refleja la repetibilidad y precisión intermedia del método en un período de tiempo que contempla la variabilidad de las condiciones de rutina del laboratorio: analistas, equipos utilizados, fuente de agua, inóculo (origen, temperatura, alimentación, composición biológica, estado trófico y metabólico), entre otros.

Es importante destacar que los datos utilizados se sometieron a un análisis para demostrar que son válidos para su uso en la estimación de la incertidumbre de medida como lo recomienda Ellison & Williams (2012). Por consiguiente, para comprender la distribución y posibles tendencias de los

datos procedentes de la medición del control funcional se procedió a graficar los valores promedio de biodegradabilidad según su fecha de ensayo, como se muestra en la **Figura 7**.



**Figura 7.** Gráfico de control con valores promedio de biodegradabilidad obtenidos por el método ISO 10707 para el control funcional según su fecha de ensayo. — Línea negra corresponde al valor promedio de los datos históricos; - - - Líneas rojas punteadas corresponden a los intervalos de dispersión calculados como dos veces su desviación típica (2·s). Fuente de datos DMYGSG del INTI.

Para estimar la componente de repetibilidad y de precisión intermedia del método por medio de los datos de biodegradabilidad del control funcional (**Tabla A1 del Anexo 1**) del INTI con inóculo de lodos activados se realizó un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de un factor, como lo describen Ellison & Williams (2012), ISO 5725-2:2006 y Magnusson & Örnemark, (2014). A partir de los resultados del ANOVA de un factor (ver **Tabla A2 del Anexo 1**) se procedió a estimar la componente de incertidumbre asociada a la fuente de precisión del método utilizando la Ec. 2, la cual sigue los lineamientos de GUM (2008) para la combinación lineal de contribuciones de incertidumbre; donde  $s_r^2$  es la varianza por repetibilidad y  $s_L^2$  es la varianza de precisión intermedia asociada al factor. La **Tabla 3** presenta un resumen de todos los valores estimados para calcular la componente de incertidumbre de precisión del método.

**Tabla 3.** Resumen cálculo de la incertidumbre de precisión del método de ensayo de biodegradabilidad ISO 10707 para sustancias orgánicas presentes en productos de limpieza.

Fuente de datos	Valores según variable (%)		Incertidumbre de precisión (%)
	$S_R^2$	$S_L^2$	
Control funcional	4,85	9,05	10,27

Ec. 2

$$u_{\text{prec}} = \sqrt{S_R^2 + S_L^2}$$

Por último, con los datos de réplicas de muestras (ver **Anexo 2**) se estimó una componente de repetibilidad con el fin de identificar si la fuente de incertidumbre de precisión del método ISO 10707 es distinta cuando se analizan muestras que no son fácilmente biodegradables (biodegradabilidad inferior al 60%) o muestras con una composición química más compleja que el acetato de sodio como por ejemplo, mezclas de sustancias químicas orgánicas, productos químicos de uso doméstico o industrial con formulaciones complejas. El análisis comparativo del grado de influencia en la componente de incertidumbre de precisión se detalla en el **Anexo 2** del presente documento. En este se concluye que la variabilidad observada en las muestras de rutina resultó menor que en los controles funcionales, por lo que se considera que la variabilidad por repetibilidad cuantificada en las muestras de rutina ya se encuentra cubierta dentro de la componente de incertidumbre por precisión  $u_{\text{prec}}$  estimada en la **Tabla 3**.

- **Sesgo del método estimado a partir de comparaciones interlaboratorio (IC)**

Los datos provenientes de un ensayo de aptitud (EA) o IC se pueden utilizar como una fuente para estimar la componente de incertidumbre por sesgo del método (ver **Figura 5**). Los datos obtenidos de ejercicios de EA o IC son recomendables para estimar la contribución de incertidumbre cuando (EUROLAB, 2007; ISO/IEC 17043:2010; ISO 13528:2015; Magnusson & Örnemark, 2014):

- El método de ensayo utilizado es el mismo o son métodos metrologicamente comparables.
- Los valores asignados poseen una incertidumbre de medida adecuada.
- Se cuenta con al menos 6 participaciones (satisfactorias) en ejercicios EA o IC en un periodo tiempo razonable.
- El uso de valores de consenso se recomienda cuando proviene de una cantidad lo suficientemente grande ( $18 \leq$  laboratorios participantes), como lo recomienda la ISO 13528:2015.
- El proveedor del EA o IC con competencia demostrada de requisitos de la ISO/IEC 17043:2010.

En ocasiones las ofertas de ensayos de aptitud o comparaciones interlaboratorio para algunos ensayos fisicoquímicos-biológicos no es tan amplia, limitando la posibilidad de estimar esta componente de incertidumbre. Para efectos de la presente guía, con el fin de brindar un ejemplo práctico y realista con el alcance del método ISO 10707, la estimación de la componente de incertidumbre por sesgo del método biodegradabilidad “fácil” se estimó a partir de los resultados del ensayo de aptitud DMQ-001-2019 (LACOMET, 2019), por ser el único ejercicio de comparación interlaboratorio organizado en la región en los últimos años que incluye la aplicación del método de ensayo ISO 10707:1994 dentro de su alcance. Además, el EA presenta valores asignados con una incertidumbre de medida inferior a la variabilidad máxima (20%) definida por el método de ensayo ISO 10707:1994. Cabe señalar que este ensayo de aptitud se realizó con dos ítems de ensayo, uno simulando una formulación de producto de limpieza (BioPL) y el otro preparado a partir de un tensoactivo

comercial grado técnico (BioTA). Además, se contó con los resultados de varios laboratorios participantes del proyecto regional “Aseguramiento de la calidad en las mediciones requeridas para la determinación de la biodegradabilidad de sustancias químicas” (PTB, 2014), incluyendo al DMyGSQ del INTI. Es relevante aclarar que los valores asignados ( $x_{ref\ EA}$ ) de los ítems de ensayo fueron designados a partir de las mediciones de un laboratorio experto (DMyGSQ del INTI) y que, con el fin de lograr comparabilidad entre los resultados de los participantes ( $x_{lab\ i}$ ) y los valores asignados a los ítems de ensayo, el organizador del EA solicitó que únicamente se utilizara el inóculo de pastilla comercial brindado a cada participante (mismo lote y casa comercial) como se detalla en el informe de LACOMET (2019).

La estimación de la componente de incertidumbre a partir de la información del EA DMQ-001-2019 se calculó utilizando la Ec. 3 y Ec. 4 (B. Magnusson, 2017; LACOMET, 2019).

$$\text{Ec. 3} \quad \text{RMS} = \frac{\sum \text{sesgo}_i^2}{p} = \frac{\sum (x_{lab\ i} - x_{ref\ EA})^2}{p}$$

$$\text{Ec. 4} \quad u_{\text{sesgo}} = \sqrt{\text{RMS}}$$

La **Tabla 4** muestra los resultados detallados de los cálculos necesarios para estimar la componente de incertidumbre por sesgo del método de ensayo ISO 10707:1994, utilizando los resultados satisfactorios de los participantes del ensayo de aptitud DMQ-001-2019, la Ec. 3 y Ec. 4. La **Tabla A3** del anexo 1 muestra más información acerca de los datos utilizados para estimar la componente de incertidumbre de sesgo del método, todos ellos resultantes de evaluaciones de desempeño satisfactorias en el marco del ensayo de aptitud.

**Tabla 4.** Resumen del cálculo de la incertidumbre de sesgo global del método de ensayo de biodegradabilidad ISO 10707 utilizando los resultados satisfactorios de los participantes del ensayo de aptitud DMQ-001-2019 para sustancias orgánicas en productos de limpieza (BioPL) y de un tensoactivo comercial grado técnico (BioTA).

Ítem de ensayo	Sesgo (%)	RMS (%)	Usesgo (%)
BioPL	-6,4	45,6	6,75
BioPL	9,2		
BioPL	5,7		
BioPL	8,9		
BioTA	-3,4		
BioTA	5,0		

#### Etapa 4

#### Estimación de incertidumbre combinada y expandida

En esta etapa se combinan las incertidumbres estándares de cada una de las fuentes de incertidumbre. Para ello se recomienda seguir las disposiciones del método GUM (2008), si aplica, para estimar la incertidumbre combinada; dado que es razonable suponer que las componentes de incertidumbres identificadas en la **Figura 5** son independientes, la combinación de incertidumbre se estima como se muestra en la Ec. 5.

Ec. 5

$$u_c = \sqrt{(u_{\text{sesgo}})^2 + (u_{\text{prec}})^2}$$

Para estimar la incertidumbre expandida se recomienda, si aplica, seguir las disposiciones del método GUM. Por practicidad, en la mayoría de los casos se recomienda seguir el cumplimiento del teorema del límite central y estimar la incertidumbre expandida de acuerdo con la Ec. 6 con un  $k = 2$ , para un 95% de confianza aproximadamente (GUM, 2008).

Ec. 6

$$U = k \cdot u_c$$

La **Tabla 5** muestra la incertidumbre combinada e incertidumbre expandida para el método de ensayo de biodegradabilidad ISO 10707 para sustancias orgánicas solubles en medio acuoso, utilizando las componentes de incertidumbre de sesgo y precisión estimadas en la etapa 3 del presente procedimiento para la estimación de incertidumbre con el enfoque “top-down”. La incertidumbre expandida se expresa con dos cifras significativas, siguiendo la recomendación de GUM (2008).

**Tabla 5.** Incertidumbre combinada e incertidumbre expandida con el enfoque “top-down” del método de ensayo de biodegradabilidad ISO 10707 para sustancias orgánicas presentes en productos de limpieza.

Componentes de incertidumbre		$u_c$ (%)	$U$ (%)
$u_{prec}$	10,27%	12,29	25
$u_{sesgo}$	6,75%		



## 6. Conclusiones

La presente guía presenta una alternativa práctica y confiable para la estimación de la incertidumbre de medida con el enfoque “top-down” para el método de ensayo ISO 10707 y guías OECD aplicables en la determinación de biodegradabilidad aeróbica “fácil” para sustancias orgánicas solubles en medio acuoso presentes en productos de limpieza u otros productos.

La posibilidad de estimar la incertidumbre del ensayo, siguiendo la estrategia e información propuesta por esta guía, permite que diversos laboratorios de análisis conozcan el nivel de confianza de sus resultados e incorporen dicha información en la regla de decisión para la declaración de biodegradabilidad de las muestras evaluadas.

La estimación de la incertidumbre de medida con el enfoque “top-down” es un método que permite conocer y evaluar el desempeño del método en los parámetros de sesgo y precisión; además, permite aprovechar los datos históricos de mediciones realizadas a muestras de ensayo reales, controles para el aseguramiento de la validez de los resultados y participaciones en EA o IC que disponen los laboratorios.

La incertidumbre expandida estimada en esta guía, utilizando los datos del DMyGSQ del INTI y los resultados del ensayo de aptitud DMQ-001-2019, es mayor pero muy próxima a la diferencia máxima permitida entre réplicas que indica el método de ensayo ISO 10707:1994; no obstante, hay que recalcar que la incertidumbre expandida estimada con el enfoque “top-down” incluye las componentes de incertidumbre por sesgo y precisión del método, en cambio la diferencia máxima permitida está asociada únicamente a la precisión del método bajo condiciones de repetibilidad.

La componente de incertidumbre por sesgo fue estimada a partir de un ensayo de aptitud utilizando un inóculo comercial pero, es importante tener en cuenta que las metodologías de referencia indican que deben emplearse inóculos de origen ambiental y por consiguiente, es necesario conocer e

incorporar su impacto en dicha componente de incertidumbre mediante un aumento en la participación en comparaciones interlaboratorios o ensayos de aptitud con metodologías utilizando inóculos de origen ambiental que permitan robustecer la estimación de la componente de incertidumbre por sesgo.

Por otra parte, para alcanzar una mayor comprensión y entendimiento del método de ensayo de biodegradabilidad ISO 10707:1994 es necesario realizar investigaciones científicas que se enfoquen en determinar el grado de variabilidad asociada a la diversidad microbiana de los inóculos que se utilizan rutinariamente en el ensayo y su efecto sobre la medición. Dicha información permitiría el desarrollo de nuevas estrategias que permitan mejorar el desempeño del método en los parámetros de precisión y sesgo.

Finalmente, la estrategia para la estimación de la incertidumbre de medida presentada en esta guía podrá ser utilizada para actualizar las clasificaciones de sustancias químicas de uso masivo, tanto industriales como domésticas, brindando información ambiental confiable que promueva el uso responsable de las mismas.



## 7. Agradecimientos

Queremos extender un agradecimiento al apoyo de la cooperación alemana, porque este proyecto fue financiado por el Ministerio Federal de Cooperación Económica y Desarrollo (BMZ) de la República Federal de Alemania e implementado por el Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) como parte de las actividades del Fondo Regional “Infraestructura de la Calidad para Biodiversidad y Protección del Clima” en América Latina y el Caribe.

Agradecemos el aporte técnico y especializado de Lic. Marisa Delbon (INTI), Lic. Silvina Aued (INTI), Bach. Ricardo Irigay (LATU), Ing. Gabriel Molina Castro (LCM) y Dr. Bryan Calderón Jiménez (LCM) en la revisión y mejora de la presente guía técnica; asimismo un agradecimiento Felipe Mendoza (CIRA/UNAN), Colbert Somoza (CIRA/UNAN), Patricia Baklayan (LATU), Diana Robles (CEQIATEC) y Pablo Salas (LAA-UNA) por su apoyo al proyecto de la presente guía. También, agradecemos a Beatriz Paniagua Valverde por su liderazgo y apoyo como Consultora encargada de la implementación del subproyecto regional denominado *Aseguramiento de la calidad en las mediciones requeridas para la determinación de la biodegradabilidad de sustancias químicas*. Y, por último, un especial agradecimiento a Angelika Koenig y Franziska Kamm por su apoyo y colaboración con la presente guía durante su gestión como coordinadoras de proyecto.



## 8. Referencias bibliográficas

- Ellison, S., & Williams, A. (2012). *Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. (Third edition)*. Obtenido de [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
- Acir, I.-H., & Guenther, K. (2018). Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. *Science of the Total Environment*, 635, 1530-1546.
- Agency, E. C. (s.f.). *European Chemicals Agency – ECHA*. Obtenido de [echa.europa.eu](http://echa.europa.eu)
- Ahtiainen, J., Aalto, M., & Pessala, P. (2003). Biodegradation of Chemicals in a Standardized Test and in Environmental Conditions. *Chemosphere*, 51(6), 529-537.
- B. Magnusson, T. N. (2017). *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*. Nordtest.
- Bina, B., Mohammadi, F., Amin, M., & Pourzamani, H. (2017). Determination of 4-NonylPhenol and 4-tert-octylphenol compounds in various types of wastewater and their removal rates in different treatment processes in nine wastewater treatment plants of Iran. *Chine Journal of Chemical Engineering*, 26(1), 183-190.
- Brillet, F., Maul, A., Durand, M.-J., & Thouand, G. (2016). From laboratory to environmental conditions: a new approach for chemical's biodegradability assessment. *Environ Sci Pollut Res*, 23, 18684 – 18693.
- Chen, Y., Wang, C., Dong, S., Jiang, L., Shi, Y., Li, X.,... Tan, Z. (2019). Microbial community assembly in detergent wastewater treatment bioreactors: Influent rather than inoculum source plays a more important role. *Bioresource Technology*, 287.
- Comber, M., & Holt, M. (2010). *Developing a set of reference chemicals for use in biodegradability tests for assessing the persistency of chemicals*. MCC Report: MCC/007, Long-range Research Initiative, ECO12: VALIDATION CHEMICALS FOR ASSESSING BIODEGRADATION TESTS.
- Danish Environmental Protection Agency. (2001). Obtenido de <https://www2.mst.dk/udgiv/publications/2001/87-7944-596-9/pdf/87-7944-597-7.pdf>
- Devia, L., Krom, B., & Nonna, S. (2019). *Manula de Recursos Naturales y Derecho Ambiental*. Estudio.

- ECETOC. (2003). ECETOC. Obtenido de <http://www.ecetoc.org/publication/tr-090-persistence-of-chemicals-in-the-environment/>
- ECETOC. (2007). ECETOC. Obtenido de <http://www.ecetoc.org/publication/workshop-report-10-workshop-on-biodegradation-and-persistence/>
- Ellison, S., & Barwick, V. (1998). Estimating measurement uncertainty: reconciliation using a cause and effect approach. *Measurement Uncertainty in Chemical Analysis*, 3, 101-105.
- EUROLAB. (2007). *Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation*. Technical Report 1/2007, Technical Committee on Quality Assurance in Testing (TCQA).
- European Federation of National Associations Measurement, Testing and Analytical Laboratories (EUROLAB). (2007). *Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation*. Technical Report 1/2007, Technical Committee on Quality Assurance in Testing (TCQA).
- Goohead, A., Head, I., Snape, J., & Davenport, R. (2014). Standard inocula preparations reduce the bacterial diversity and reliability of regulatory biodegradation tests. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 9511-9521.
- GUM. (2008). *Evaluación de datos de medición: Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida*. CEM.
- Gutberlet, J., Carengo, S., Kain, J.-H., & Martiniano de Azevedo, A. M. (2017). Waste Picker Organizations and Their Contribution to the Circular Economy: Two Case Studies from a Global South Perspective. *Resources*, 52(6).
- ISO 10707. (1994). ISO 10707:1994 *Water quality – Evaluation in an aqueous medium of the “ultimate” aerobic biodegradability of organic compounds – Method by analysis of biochemical oxygen demand (closed bottle test)*. ISO.
- ISO 13528. (2015). ISO 13528:2015, *Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparisons*. Obtenido de <https://www.iso.org/>
- ISO 5725-2. (2006). ISO 5725-2:1994 *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*.
- ISO/IEC 17025. (2017). ISO/IEC 17025:2017(en): *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*.
- ISO/IEC 17043:2010 (en) *Conformity assessment – General requirements for proficiency testing*.
- ISO/IEC Guide 98. (2012). ISO/IEC GUIDE 98-4:2012 *Uncertainty of measurement – Part 4: Role of measurement uncertainty in conformity assessment*.

- ISO/TR 15462. (2006). *ISO/TR 15462:2006 Water quality – Selection of tests for biodegradability*.
- Jardak, K., Drogui, P., & Daghrir, R. (2016). Surfactants in aquatic and terrestrial environment: occurrence, behavior, and treatment processes. *Environmental Science and Pollution Research volume*, 23, 3195–3216.
- JCGM 200. (2012). *International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM)*. Obtenido de [https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_200\\_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_200_2012.pdf/f0e1ad45-d337-bbeb-53a6-15fe649d0ff1)
- Kowalczyk, A., Martin, T., Price, O., Snape, J., Van Egmond, R. A., Finnegan, C.,... Bending, G. (2015). Refinement of biodegradation tests methodologies and the proposed utility of new microbial ecology techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, 9–22.
- LACOMET. (2019). *Ensayos de Aptitud: Análisis Físicoquímicos (Histórico)*, INFORME FINAL DE RESULTADOS Ensayo de aptitud DMQ-001-2019 Biodegradabilidad en productos de limpieza y tensoactivos. Obtenido de <https://drive.google.com/file/d/1K5rDHMA6QPeylqmqm6nKXgr4rBcWXtyj6/view>
- LACOMET. (2019). *Ensayos de Aptitud: Análisis Físicoquímicos (Histórico)*. *Protocolo de Ensayo de Aptitud*. Ensayo de Aptitud DMQ-001-2019 Biodegradabilidad en productos de limpieza y tensoactivos. Obtenido de <https://drive.google.com/file/d/1H51ejhS95vqGe2aEW8Rn2tKj5Zu-Uh6O/view>
- Laurier L., Schramm; Elaine N., Stasiuk; D. Gerrard, Marangoni. (2003). Surfactants and their applications. *Annual Reports Section “C”: Physical Chemistry*, 99, 3–48. Recuperado el 21 de 05 de 2020, de <https://doi.org/10.1039/B208499F>
- Lee , J., Choi, J., Youn, J., Cha, Y., Song , W., & Park, A. (Jun de 2015). Comparison between bottom-up and top-down approaches in the estimation of measurement uncertainty. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 53(7), 1025–1032.
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (Edits.). (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. (2nd ed.). Obtenido de <http://www.eurachem.org>
- McCabe, S., Clement, S., & Ochoa, A. (2008). *Sustainable Procurement Guidelines for Cleaning Products and Services: Background Report*. UNEP-DTIE.

- Meyer, V. R. (27 de July de 2007). Review: Measurement uncertainty. (ELSEVIER, Ed.) *Journal of Chromatography A*, 1158, 15-24.
- Mezzanotte, V., Bertani, R., Degli Innocenti, F., & Tosin, M. (2005). Influence of inocula on the results of biodegradation tests. *Polymer Degradation and Stability*, 87(1), 51-56.
- Montgomery, D. C. (2004). *Control Estadístico de la Calidad* (Tercera edición ed.). México: Limusa Wiley.
- Noorimotlagh, Z., Mirzaee, S., Ahmadi, M., & Jaafarzadeh, N. (2018). The possible DNA damage induced by environmental organic compounds: The case of Nonylphenol. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158, 171-181.
- Nyholm, N., Jørgensen, P., & Hansen, N. (1984). Biodegradation of 4-nitrophenol in standardized aquatic degradation tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 8(5), 451-470.
- OECD. (1992). Test No. 301: *Ready Biodegradability*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. París: OECD Publishing.
- OECD. (1995). *DETAILED REVIEW PAPER ON BIODEGRADABILITY TESTING*. OECD. París: OECD Publishing.
- OECD. (2006). *Revised Introduction to the OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 3*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Obtenido de <https://doi.org/10.1787/9789264030213-en>
- OECD. (2006). *Revised Introduction to the OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 3*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3. Obtenido de <https://doi.org/10.1787/9789264030213-en>
- OECD. (2006). *Test No. 310: Ready Biodegradability - CO2 in sealed vessels (Headspace Test)*. París: OECD Publishing.
- ONU. (1992). *Convention on Biological Diversity*. Obtenido de <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
- ONU. (2017). *United Nations Economic Commission for Europe (UNECE)*. Recuperado el 21 de 05 de 2020, de [https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev07/Spanish/ST-SG-AC10-30-Rev7sp.pdf](https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev07/Spanish/ST-SG-AC10-30-Rev7sp.pdf)

- ONU. (2018). *Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL)*. Recuperado el 21 de 05 de 2020, de [https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/43595/1/S1800429\\_es.pdf](https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/43595/1/S1800429_es.pdf)
- Pagga, U. (1997). *Testing biodegradability with standardized methods*. *Chemosphere*, 35(12), 2953–2972.
- Parlamento Europeo y del Consejo. (2020). *European Union*. Obtenido de EUR-Lex Access to European Union Law: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1907-20200428&qid=1591974524448&from=en>
- Priel, M. (2009). *From GUM to alternative methods for measurement uncertainty*. 14(<https://doi.org/10.1007/s00769-009-0518-7>). Obtenido de <https://doi.org/10.1007/s00769-009-0518-7>
- PTB. (2014). *International Cooperation: Latin America and the Caribbean*. Obtenido de <https://www.ptb.de/cms/en/ptb/fachabteilungen/abt9/fb-93/ag-933.html>
- Rebello, S., Asok, A., Mundayoor, S., & Jisha, M. (2014). Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environmental Chemistry Letters*, 12, 275–287.
- Schramm, L. L., Stasiuk, E. N., & Marangoni, D. G. (2003). Surfactants and their applications. *Annual Reports Section “C”: Physical Chemistry*, 99, 3–48. Recuperado el 21 de 05 de 2020, de <https://doi.org/10.1039/B208499F>
- Thouand, G., Durand, M.-J., Maul, A., Gancet, C., & Blok, H. (2011). New Concepts in the Evaluation of Biodegradation/Persistence of Chemical Substances Using a Microbial Inoculum. *Frontiers in Microbiology*, 2.
- UCSF Institute for Health & Aging, UC Berkeley Center for Environmental Research and Children's. (2013). *Green Cleaning, Sanitizing, and Disinfecting: A Toolkit for Early Care and Education*. California: University of California, San Francisco School of Nursing: San Francisco.
- Vázquez Rodríguez, G., Beltrán Hernández, R., Coronel Olivares, C., & Luc Rols, J. (2011). Standardization of activated sludge for biodegradation tests. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401.
- VJ. Barwick, S. E. (2000). VAM Project 3.2. 1 *Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data*. Report No: LGC/VAM/1998/088.
- Wautelet, T. (2018). *The Concept of Circular Economy its Origins and its Evolution*, Unpublished. Obtenido de <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17021.87523>



## 9. Anexo 1

Tabla A1. Datos de biodegradabilidad a 28 días de ensayo con el método ISO 10707 en controles funcionales, obtenidos a partir de los datos suministrados por el DMyGSQ del INTI.

Dato	Valores de biodegradabilidad (%) según la réplica de medición			Promedio de biodegradabilidad
	1	2	3	
1	62,71	61,00	62,57	62,09
2	78,29	71,29	70,57	73,38
3	77,86	77,86	--	77,86
4	59,43	60,57	62,29	60,76
5	64,00	71,86	63,71	66,52
6	65,43	65,57	66,57	65,86
7	70,29	75,86	57,14	67,76
8	68,70	69,58	--	69,14
9	79,20	67,11	73,30	73,20
10	66,67	67,58	78,08	70,78
11	93,80	99,43	96,86	96,70
12	94,04	96,30	88,46	92,93
13	86,16	81,20	89,06	85,47
14	72,97	85,27	87,98	82,07
15	73,21	81,83	63,01	72,68
16	79,52	72,15	84,94	78,87
17	94,24	95,96	--	95,10
18	62,35	69,66	69,52	67,18
19	73,71	72,29	70,14	72,05
20	70,95	70,67	72,22	71,28
21	64,26	68,21	55,34	62,60
22	73,55	75,48	79,49	76,17
23	78,72	83,95	78,43	80,37
24	67,50	67,08	71,90	68,83

## GUÍA TÉCNICA

### Biodegradabilidad aeróbica en sustancias orgánicas: Un enfoque top-down para la estimación de la incertidumbre de medida

Dato	Valores de biodegradabilidad (%) según la réplica de medición			Promedio de biodegradabilidad
	1	2	3	
25	73,94	75,80	--	74,87
26	86,83	84,67	80,35	83,95
27	71,08	72,23	--	71,66
28	93,99	90,37	--	92,18

Celdas sin valores (--) representan réplicas de medición que incumplieron los controles de aseguramiento de la validez de los resultados aplicado por el DMyGSQ del INTI.

**Tabla A2.** Resumen de resultados del ANOVA de un factor de los datos de control funcional utilizados para estimar la componente de incertidumbre de precisión del método ISO 10707.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados
Entre grupos	7271,396937	27	269,3109977
Dentro de los grupos	1175,684367	50	23,51368733
Total	8447,081304	77	

**Tabla A3.** Datos del EA DMQ-001-2019 utilizados para estimar la componente de incertidumbre de sesgo del método ISO 10707.

Código de participante	Ítem de ensayo	Valor reportado (%)	Valor asignado (%)	Sesgo (%)
001	BioPL	62,50	68,9	-6,4
003	BioPL	78,10		9,2
004	BioPL	74,60		5,7
005	BioPL	77,78		8,9
002	BioTA	44,60	48	-3,4
003	BioTA	53,00		5,0

BioPL: Producto de limpieza, BioTA: Tensoactivo comercial grado técnico.



## 10. Anexo 2

En la **Tabla A4** se muestran los resultados de biodegradabilidad de muestras de rutina que se utilizaron para estudiar si la composición química y grado de biodegradabilidad de las muestras afecta la componente de incertidumbre por repetibilidad de la fuente de precisión. Para ello, a cada conjunto de datos se le estimó una desviación típica utilizando la Ec. A1, debido a que se puede considerar que son datos obtenidos en condiciones de repetibilidad.

Ec.A1

$$s_{M,i} = \sqrt{\frac{\sum (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{n_i - 1}}$$

Por medio de la Ec. A2 se procedió a estimar una varianza promedio por repetibilidad para datos agrupados con tamaños de muestras distintos como lo recomienda Montgomery (2004), la cual describe la variabilidad del método asociada a determinaciones de biodegradabilidad de muestras con composiciones químicas complejas y con porcentajes de biodegradabilidad entre (1,5 a 89,4)%.

Ec.A2

$$\bar{s}_M = \sqrt{\left[ \frac{\sum_{i=1}^m (n_i - 1) \cdot s_{M,i}^2}{\sum_{i=1}^m n_i - m} \right]}$$

En la **Tabla A5** se pueden observar los valores de varianza por repetibilidad y los valores de incertidumbre de precisión del método estimado a partir de cada conjunto de datos. Para el caso bajo estudio en esta guía, se podría interpretar que el método bajo condiciones de repetibilidad posee mayor variabilidad cuando se analiza el acetato de sodio como control funcional ( $s_r > \bar{s}_M$ ). Lo anterior demuestra que el efecto matriz de las muestras por la composición química y grado de biodegradabilidad no influye en la estimación de la varianza por repetibilidad del método. Considerando

## GUÍA TÉCNICA

### Biodegradabilidad aeróbica en sustancias orgánicas: Un enfoque top-down para la estimación de la incertidumbre de medida

un enfoque muy práctico, se podría concluir que la componente de incertidumbre de precisión del método estimada a partir de los datos de control funcional cubre la variabilidad del método cuando es utilizado para la determinación de biodegradabilidad de muestras que no son fácilmente biodegradables (biodegradabilidad inferior al 60%) o muestras con una composición química más compleja que el acetato de sodio, tales como mezclas de sustancias químicas orgánicas, productos químicos de uso doméstico o industrial con formulaciones complejas.

**Tabla A4.** Datos de biodegradabilidad a 28 días con el método ISO 10707 de ensayo en muestras, obtenidos a partir de los datos suministrados por el DMyGSQ del INTI.

Dato	Valores de biodegradabilidad (%) según la réplica de medición			$S_M$	$n_i - 1$	$(n_i - 1) \cdot S_M^2$
	1	2	3			
1	65,36	62,21	60,78	2,34	2	10,98
2	83,53	69,25	--	10,10	1	101,96
3	89,41	84,27	--	3,63	1	13,21
4	80,97	70,17	72,69	5,65	2	63,85
5	70,15	64,31	--	4,13	1	17,05
6	85,50	77,38	80,35	4,11	2	33,76
7	72,68	72,60	76,06	1,97	2	7,80
8	79,05	78,45	79,05	0,35	2	0,24
9	54,16	47,81	55,52	4,12	2	33,87
10	49,92	55,19	56,68	3,55	2	25,23
11	61,43	61,95	60,28	0,85	2	1,46
12	49,81	49,30	52,90	1,95	2	7,59
13	74,21	81,31	78,68	3,59	2	25,77
14	56,86	46,86	52,29	5,01	2	50,12
15	69,40	65,57	--	2,71	1	7,33
16	71,60	72,70	64,99	4,17	2	34,78
17	67,86	68,29	64,71	1,95	2	7,64
18	75,72	71,66	69,25	3,27	2	21,38
19	63,48	54,37	58,02	4,58	2	42,04
20	62,53	71,84	73,61	5,95	2	70,86
21	63,28	60,78	--	1,77	1	3,13

## GUÍA TÉCNICA

### Biodegradabilidad aeróbica en sustancias orgánicas: Un enfoque top-down para la estimación de la incertidumbre de medida

Dato	Valores de biodegradabilidad (%) según la réplica de medición			$S_M$	$n_i - 1$	$(n_i - 1) \cdot S_M^2$
	1	2	3			
22	70,54	69,81	75,62	3,16	2	20,03
23	51,79	57,08	59,94	4,13	2	34,20
24	18,43	22,43	22,14	2,23	2	9,95
25	64,72	57,67	60,92	3,53	2	24,90
26	55,33	53,34	--	1,41	1	1,98
27	44,16	44,59	45,30	0,58	2	0,66
28	25,96	27,53	25,53	1,05	2	2,22
29	33,00	33,57	33,29	0,29	2	0,16
30	61,57	67,43	64,71	2,93	2	17,20
31	57,00	58,57	55,57	1,50	2	4,50
32	64,71	71,43	--	4,75	1	22,58
33	49,79	52,65	--	2,02	1	4,09
34	57,29	54,43	62,00	3,82	2	29,22
35	56,86	55,43	50,86	3,13	2	19,64
36	39,20	44,64	--	3,85	1	14,80
37	54,21	56,35	55,06	1,08	2	2,32
38	82,30	77,73	80,97	2,35	2	11,05
39	70,57	74,86	79,57	4,50	2	40,53
40	22,43	23,86	--	1,01	1	1,02
41	1,57	6,14	3,57	2,29	2	10,50
42	26,68	17,40	26,96	5,44	2	59,20
43	62,46	68,77	66,48	3,19	2	20,41
$\sum_{i=1}^m (n_i - 1) \cdot S_{M,i}^2$						931,22
$m$						43
$\sum_{i=1}^m n_i$						119
$\sum_{i=1}^m n_i - m$						76
$\bar{S}_M$						3,50

Celdas sin valores (--) representan réplicas de medición que incumplieron los controles de aseguramiento de la validez de los resultados aplicado por el DMyGSQ del INTI.

## GUÍA TÉCNICA

Biodegradabilidad aeróbica en sustancias orgánicas:  
Un enfoque top-down para la estimación de la incertidumbre de medida

**Tabla A5.** Resumen de varianzas e incertidumbre de la componente de precisión del método ISO 10707 según la fuente de datos analizados.

Fuente de datos	Varianzas (%)		Incertidumbre de precisión (%)
Control funcional	$S_R$	4,85	10,27
	$S_L$	9,05	
Réplicas de muestras	$\bar{S}_M$	3,50	9,71
	$S_L$	9,05	

