

1 OBJETIVO

Estabelecer a metodologia utilizada no SERVAQ para a determinação de substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno (MBAS / surfactantes aniônicos) pelo método espectrofotométrico, em amostras de águas diversas, definindo seu controle e a forma de registro dos resultados obtidos.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO E VIGÊNCIA

2.1 A determinação de substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno (MBAS / surfactantes aniônicos) pelo método espectrofotométrico se aplica a amostras de água, esgotos sanitários e despejos industriais. O método é aplicável a amostras com concentrações superiores a 0,025 mg/L de surfactantes aniônicos.

2.2 Este método é útil para determinação dos surfactantes aniônicos, porém a possível presença de outras substâncias que reagem com o azul de metileno deve ser considerada, principalmente no caso de amostras de esgotos sanitários e despejos industriais. Sabões ou detergentes derivados de ácidos graxos ($[\text{RCO}_2]^- \text{Na}^+$), não respondem a este ensaio.

2.3 Passa a vigorar a partir da data de aprovação.

3 DEFINIÇÕES E ABREVIATURAS

TERMO / SIGLA	DEFINIÇÃO
Amostra Fortificada	Alíquota extra de amostra a qual se adicionam concentrações conhecidas dos padrões dos analitos de interesse. Utilizada para avaliar o efeito de interferência da matriz das amostras na exatidão e recuperação do método. Para permitir avaliar o efeito de interferência da matriz nos resultados obtidos, as concentrações adicionadas e os padrões utilizados devem ser os mesmos do Branco Fortificado. A Amostra Fortificada deve passar por todos os processos que a amostra comum passa antes da análise.
Branco do Método	Água purificada grau 1 (água ultrapura obtida por osmose reversa, seguida por filtração em membrana com poros de $0,2\mu\text{m}$) analisada em lugar da amostra. Utilizado para verificar a ausência de contaminação pelos analitos de interesse nos reagentes, na água purificada e no processo de análise e sua contribuição para o erro do resultado.
Branco Fortificado	Água purificada grau 1 (água ultrapura obtida por osmose reversa, seguida por filtração em membrana com poros de $0,2\mu\text{m}$) adicionada de concentrações conhecidas dos mesmos padrões dos analitos de interesse utilizados para execução da curva de calibração. Pode ser considerado como uma <i>amostra de controle do laboratório</i> . Utilizado para verificar a exatidão e a recuperação do método sem efeito de interferência da matriz das amostras.
MRC	Material de Referência Certificado, é um material suficientemente homogêneo e estável que foi estabelecido como sendo adequado para seu uso pretendido. As propriedades especificadas foram caracterizadas por um procedimento metrologicamente válido. Vem acompanhado de um certificado que fornece o valor das propriedades, a

MÉTODO DE ENSAIO
DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS TENSOATIVAS QUE
REAGEM COM O AZUL DE METILENO
(MBAS / SURFACTANTES ANIÔNICOS)

TERMO / SIGLA	DEFINIÇÃO
	incerteza associada e uma declaração de rastreabilidade metrológica.
Padrão de Verificação Inicial	Solução Padrão contendo os analitos de interesse em uma concentração igual ao ponto médio da curva de calibração. Afim de fazer uma verificação inicial diária da exatidão da curva. O Padrão de Verificação deve ser diferente do utilizado para o preparo da curva de calibração.
SERVAQ	Serviço de Análises Químicas.
GERLAB	Gerência de Análises Laboratoriais.
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
GERLAB	Gerência de Análises Laboratoriais.
FRM	Formulário
ME	Método de Ensaio
POP	Procedimento Operacional Padrão
EPI's	Equipamentos de Proteção Individual
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
NBR	Norma Brasileira
MBAS	Substâncias Tensoativas que reagem com o Azul de Metileno (do inglês Methylene Blue Active Substances)
Substâncias Tensoativas que reagem com o Azul de Metileno	Todas as substâncias surfactantes que possuem um grupo aniônico forte e outro hidrófobo, capazes de formar um composto com o cátion azul de metileno e extraíveis em solventes orgânicos.
Surfactante	Composto orgânico que apresenta, na mesma molécula, um ou mais grupos estruturais que têm afinidade pela fase em que a molécula está dissolvida e um ou mais grupos que não têm tal afinidade.
Surfactante Aniônico	Surfactante que possui um ou mais grupos polares que, quando dissolvidos ou dispersos em água, apresentam cargas negativas.

4 REFERÊNCIAS

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 24ª ed., EUA. 2022.

INMETRO – Avaliação de Dados da Medição: Guia para Expressão da Incerteza de Medição – GUM 2008. 1ª ed., Rio de Janeiro, 2012;

ABNT NBR 5891: Regras de arredondamento na numeração decimal. Rio de Janeiro, 2014;

NBR 9898 – Preservação e Técnicas de Amostragem de Efluentes Líquidos e Corpos Receptores. Rio de Janeiro: ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 1987;

DOQ-CGCRE-022, Orientações para aplicação dos requisitos técnicos da ABNT NBR ISO/IEC 17025 na acreditação de laboratórios de calibração para o grupo de serviço de físico-química. Rev. 03 – JUL / 2019;

Código: ME-INEA-GERLAB-608	Data de aprovação: 20/12/2024	Revisão: 02	Paginação: 2 de 11
--------------------------------------	---	-----------------------	------------------------------

DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre validação de métodos analíticos. Rev. 09 – JUN / 2020;

POP-INEA-GERLAB-204 – Garantia da Qualidade dos Resultados;

POP-INEA-GERLAB-205 – Validação de Métodos de Ensaio;

POP-INEA-GERLAB-209 – Estimativa da Incerteza da Medição;

POP-INEA-GERLAB-601 – Medidas Gerais de Segurança e Prevenção de Acidentes;

POP-INEA-GERLAB-602 – Preparo, Identificação e Controle de Soluções e Reagentes;

POP-INEA-GERLAB-604 – Limpeza e Descontaminação de Vidraria e Materiais Diversos de Laboratórios;

POP-INEA-GERLAB-635 – Incerteza de Medição Labwin UNC;

POP-INEA-GERLAB-218 Controle de Qualidade das Frascarias;

POP-INEA-GERLAB-800 – Água reagente.

5 RESPONSABILIDADES GERAIS

FUNÇÃO	RESPONSABILIDADE
SERVAQ	A análise crítica deste documento é de responsabilidade do SERVAQ. A execução dos procedimentos descritos é de responsabilidade dos técnicos e analistas do SERVAQ.

6 PROCEDIMENTOS

6.1 Aspectos de Segurança

6.1.1 Observar rigorosamente o estabelecido no POP-INEA-GERLAB-601.

6.1.2 O solvente é extremamente tóxico e suspeito de causar câncer. Somente manusear em capela química e utilizando luvas de látex natural ou borracha nitrílica.

Nota: Perigo ao manusear clorofórmio!

Código: ME-INEA-GERLAB-608	Data de aprovação: 20/12/2024	Revisão: 02	Paginação: 3 de 11
--------------------------------------	---	-----------------------	------------------------------

- 6.1.3 Na análise de amostras de esgotos, despejos industriais ou águas contaminadas, somente manipular as mesmas utilizando luvas.
- 6.1.4 Caso as amostras apresentem odor forte ou contaminação por produtos voláteis usar máscaras durante o ensaio e/ou manipular as mesmas em capela.
- 6.2 Equipamentos e materiais
- 6.2.1 Espectrofotômetro capaz de operar em comprimento de onda de 652 nm.
- 6.2.2 Cubetas em vidro, quartzo ou poliestireno, com tampa, de caminho ótico de 1,0 ou 2,0 cm (10 ou 20 mm).
- 6.2.3 Funis de separação de 500 mL, com tampa e torneira de PTFE.
- 6.2.4 Balões volumétricos de 100,00 mL.
- 6.2.5 Provetas de 25,0 mL, 50,0 mL e 100,0 mL.
- 6.2.6 Pipetas graduadas de 10 mL.
- 6.2.7 Provetas de 25 mL ou 50 mL.
- 6.2.8 Funis analíticos lisos.
- 6.2.9 Lã de vidro (extraída previamente três vezes com pequenas porções de clorofórmio).
- 6.3 Reagentes, soluções e padrões
- 6.3.1 Padrão de LAS (Alquilbenzenossulfonato linear) 1 mg/mL (ou solução de alquilssulfato linear equivalente a 1 mg LAS/mL).
- 6.3.2 Hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/L.
- 6.3.3 Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1 mol/L.
- 6.3.4 Fenolftaleína alcoólica 0,5% p/v.

6.3.5 Clorofórmio (CHCl_3) P.A.

Nota: PERIGO! O clorofórmio é tóxico e suspeito de ser carcinogênico!

6.3.6 Reagente de azul de metileno (com ácido sulfúrico e fosfato monossódico).

6.3.7 Solução de lavagem para MBAS (ácido sulfúrico + fosfato monossódico).

6.3.8 Sulfato de sódio anidro P.A. ACS, ISO.

6.3.9 Água purificada grau 3 ou grau 2 (destilada, deionizada etc.).

Nota: Preparar os reagentes e soluções conforme as instruções do POP-INEA-GERLAB-602.

6.4 Metodologia do ensaio

6.4.1 Princípio do Método

6.4.1.1 Certas substâncias tensoativas podem reagir com o azul de metileno formando um complexo colorido. Este é o caso principalmente dos surfactantes aniônicos do tipo sulfonato ($[\text{RSO}_3^-]\text{Na}^+$) e do tipo éster sulfato ($[\text{ROSO}_3^-]\text{Na}^+$). O complexo colorido que se forma pode ser extraído por um solvente orgânico imiscível com a solução aquosa, geralmente o clorofórmio. A intensidade da cor azul na fase orgânica é proporcional à concentração das substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno e pode ser determinada em um espectrofotômetro por leitura em 652 nm.

6.4.2 Interferências

6.4.2.1 Compostos orgânicos que complexam o azul de metileno, tais como sulfonatos, sulfatos, fosfatos, carboxilatos, fenóis, causam interferências positivas.

6.4.2.2 Compostos inorgânicos que formam íons pares com o azul de metileno, como cianatos, nitratos, tiocianatos e cloretos, também causam interferências positivas, mas podem ser eliminados através da etapa de lavagem da fase orgânica.

6.4.2.3 Substâncias catiônicas, como aminas, proteínas e compostos quaternários de amônia, são considerados como interferências negativas, pois reagem com os surfactantes, concorrendo com o azul de metileno. Podem ser eliminados utilizando-se uma resina de troca catiônica.

6.4.2.4 Material particulado presente nas amostras pode acarretar interferência negativa através da adsorção dos surfactantes.

Código: ME-INEA-GERLAB-608	Data de aprovação: 20/12/2024	Revisão: 02	Paginação: 5 de 11
--------------------------------------	---	-----------------------	------------------------------

6.4.2.5 Elevados teores de sulfeto ocasionam a descoloração do azul de metileno e devem ser eliminados previamente por adição de 5 (cinco) gotas de peróxido de hidrogênio 30%.

6.4.3 Considerações gerais

6.4.3.1 A determinação de substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno deve ser efetuada o mais rápido possível após a entrada das amostras no SERVAQ. No caso da determinação não poder ser feita imediatamente as amostras devem ser mantidas em frascos bem fechados, em pH ácido e refrigeradas em temperatura igual ou inferior a 6 °C.

6.4.3.2 As amostras devem ser coletadas de acordo com procedimentos específicos do serviço de coleta e mantidas em frascos de vidro (borossilicato). Não devem ser utilizados frascos plásticos que podem adsorver as substâncias tensoativas nas paredes.

6.4.3.3 Deve ser seguida a instrução de operação referente ao modelo de espectrofotômetro utilizado na determinação.

6.4.3.4 Para amostras de águas naturais ou tratadas, geralmente, não é necessário nenhum pré-tratamento das amostras.

6.4.3.5 Preparar inicialmente uma curva de calibração composta de pelo menos cinco pontos com concentrações que abranjam a faixa desejada ou esperada nas amostras. Usar esta curva para calcular a concentração de MBAS nas amostras.

6.4.3.6 Certificar que na curva de calibração obtida haja linearidade dentro da faixa de interesse ($r = 0,995$ ou melhor).

6.4.3.7 Devem-se executar verificações da curva de calibração cada vez que efetuar a análise da(s) amostra(s), utilizando um padrão com concentração igual ao do ponto mais baixo da curva e/ou um padrão com concentração acima do ponto esperado para a(s) amostra(s).

6.4.3.8 Os valores obtidos na verificação da curva de calibração não podem diferir em mais de 25% do valor original da curva para o ponto mais baixo e nem mais de 10% dos valores dos demais pontos da curva. Caso os desvios sejam maiores, não utilizar a curva existente e preparar uma nova curva de calibração.

6.4.3.9 Acompanhar sempre o ensaio das amostras com um branco, utilizando água purificada grau 3 ou grau 2 (destilada, deionizada etc.) em lugar da amostra.

6.4.4 Preparação da curva de calibração

6.4.4.1 Tomar exatamente uma alíquota de 5,00 mL do padrão de LAS 1,0 mg/mL e transferir para balão volumétrico de 500 mL.

Código: ME-INEA-GERLAB-608	Data de aprovação: 20/12/2024	Revisão: 02	Paginação: 6 de 11
--------------------------------------	---	-----------------------	------------------------------

6.4.4.2 Completar o volume do balão com água e homogeneizar bem.

6.4.4.3 Utilizando esta solução (1,00 mL = 10,0 µg LAS/MBAS), preparar padrões nas concentrações especificadas através da utilização dos volumes da solução indicados na tabela a seguir.

Concentração de padrão	Volume de solução a ser utilizado (1,00 mL = 10,0 µg LAS)
0,10 mg/L	0,50 mL
0,50 mg/L	2,50 mL
1,00 mg/L	5,00 mL
1,50 mg/L	7,50 mL
2,00 mg/L	10,00 mL

6.4.4.4 Pipetar, com auxílio de pipeta volumétrica, cada um dos volumes indicados na tabela para funil de separação de 500 mL.

6.4.4.5 Adicionar a cada funil um volume de água purificada grau 3 ou grau 2 (destilada, deionizada etc.), suficiente para completar um volume total de 50 mL (padrão + água).

6.4.4.6 Proceder então conforme descrito para determinação na amostra (item 6.4.5).

6.4.4.7 Ler a absorbância em comprimento de onda de 652 nm em cubetas de 1 ou 2 cm de caminho ótico, usando clorofórmio como referência para zerar o equipamento.

6.4.4.8 Traçar uma curva de calibração de absorbância X concentração de LAS (mg/L), especificando a massa molar do padrão de LAS usado.

6.4.5 Determinação de substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno na amostra

6.4.5.1 Acompanhar sempre o ensaio das amostras com um branco e com duas concentrações de padrão utilizadas na confecção da curva de calibração, conforme estabelecido no item 6.4.4.

6.4.5.2. Tomar exatamente uma alíquota de 50,00 mL para amostras com teor esperado de substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno entre 0,4 e 2,0 mg/L e transferir para um funil de separação de 500 mL.

Nota: Se a concentração esperada na amostra for menor que 0,4 mg/l tomar uma alíquota de amostra maior (250 ou 400 mL). Se a concentração esperada na amostra for maior que de 2 mg/L, fazer as diluições necessárias e tomar uma alíquota de 100,00 mL da amostra diluída.

6.4.5.3 Adicionar algumas gotas de fenolftaleína alcoólica 0,5% p/v e em seguida, hidróxido de sódio 1 mol/L, gota a gota, até aparecimento de coloração rosa.

6.4.5.4 Adicionar, então, ácido sulfúrico 1 mol/L, gota a gota, até desaparecimento da cor rosa.

6.4.5.5 Acrescentar ao funil de separação 5 mL de clorofórmio e 12,5 mL de reagente de azul de metileno.

6.4.5.6 Agitar o funil de separação vigorosamente por cerca de 30 segundos, tendo o cuidado de abrir a torneira do funil algumas vezes durante a agitação para aliviar a pressão interna.

6.4.5.7 Deixar o funil de separação em repouso, retirando sua tampa, para que as duas fases se separem. Se necessário, girar suavemente o funil de separação para arrastar eventuais gotículas aderidas à parede do funil de separação e que não se juntaram a fase orgânica.

6.4.5.8 Caso haja formação de emulsão devido à excessiva agitação, adicionar cerca de 5 gotas de isopropanol.

Nota: Quando há formação de emulsão é geralmente necessário um tempo maior de repouso para que haja uma adequada separação das fases dentro do funil de separação.

6.4.5.9 Se for o caso, acrescentar ao branco e aos padrões a mesma quantidade de isopropanol adicionado nas amostras.

6.4.5.10 Transferir a camada de clorofórmio para um segundo funil de separação. Rinçar a haste do primeiro funil de separação com pequenas quantidades de clorofórmio, recolhendo o solvente orgânico no segundo funil de separação.

6.4.5.11 Repetir a extração mais duas vezes, usando 10 mL de clorofórmio. Juntar todos os extratos de clorofórmio no segundo funil de separação.

Nota: Nesta etapa do procedimento, se a coloração azul da fase aquosa se tornar fraca ou desaparecer, descartar todo material e repetir utilizando uma alíquota menor da amostra.

6.4.5.12 Adicionar, em seguida, 25 mL da solução de lavagem ao segundo funil de separação contendo os extratos de clorofórmio e agitar suavemente por 30 segundos, tendo o cuidado de abrir a torneira do funil algumas vezes durante a agitação para aliviar a pressão interna.

Nota: Nesta fase não devem se formar emulsões dentro do funil de separação.

6.4.5.13 Deixar o funil de separação em repouso, retirando sua tampa, para que as duas fases se separem. Se necessário, girar suavemente o funil de separação para arrastar eventuais gotículas aderidas na parede do funil de separação e que não se juntaram à fase orgânica.

6.4.5.14 Transferir o extrato de clorofórmio para um balão volumétrico de 50 ml, filtrando-o através de uma pequena porção de lã de vidro previamente extraída com clorofórmio, contendo pequena quantidade de sulfato de sódio anidro para remoção de qualquer traço de água. O filtrado obtido deve ser límpido.

6.4.5.15 Extrair a solução de lavagem que permaneceu no segundo funil de separação mais duas vezes, com 5 ml de clorofórmio de cada vez. Recolher todos os extratos de clorofórmio no balão volumétrico de 50 ml, sempre filtrando através da lã de vidro.

6.4.5.16 Completar o volume no balão volumétrico usando clorofórmio e homogeneizar bem.

6.4.5.17 Ler a absorbância em comprimento de onda de 652 nm em cubetas de 1 ou 2 cm de caminho ótico, usando o branco preparado junto com as amostras como referência para zerar o equipamento.

6.4.5.18 Executar os cálculos e expressar os resultados conforme estabelecido no item 6.7.

6.5 Validação

6.4.6.1 De acordo com os critérios definidos no POP-INEA-GERLAB-205 – Validação de métodos de ensaios, o referido método não necessita de validação, pois segue método normalizado definido pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 24^a ed., 2022.

6.4.6.2 De acordo com os critérios definidos no POP-INEA-GERLAB-205 – Validação de métodos de ensaios, uma das técnicas adotadas para determinação do desempenho de um método é através de comparações interlaboratoriais. O laboratório participa de programas de ensaios de proficiência para este método regularmente, conforme definido no POP-INEA-GERLAB-208 – Participação em programas interlaboratoriais.

6.6 Controle de qualidade e critérios de aceitação

6.6.1 A seguir encontram-se relacionados os procedimentos e critérios para verificação da qualidade dos ensaios executados e aceitação dos resultados obtidos, conforme o estabelecido pelo POP-INEA-GERLAB-204 – Controle de qualidade analítica.

6.6.2 Verificar a precisão das análises de cada batelada de amostras pela análise de um padrão com concentração igual ao do ponto mais baixo da curva e/ou um padrão com concentração acima do ponto esperado para a(s) amostra(s). Os resultados obtidos para estes padrões não devem diferir em mais de $\pm 15\%$ dos valores nominais das concentrações utilizadas. Os valores obtidos na determinação das substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno destes padrões podem ser lançados em uma Carta de Controle de Média.

Código: ME-INEA-GERLAB-608	Data de aprovação: 20/12/2024	Revisão: 02	Paginação: 9 de 11
--------------------------------------	---	-----------------------	------------------------------

Nota: Considerar como batelada uma quantidade de até 20 amostras analisadas nas mesmas condições, em um mesmo dia e utilizando os mesmos reagentes.

6.6.3 Avaliar a qualidade dos reagentes e da água utilizada através dos resultados obtidos na determinação dos brancos, conforme estabelecido em 9.3.9. Sempre que os resultados dos brancos apresentarem valores muito altos aos valores usualmente encontrados descartar todos os reagentes e prepara-los novamente.

6.6.4 Executar uma análise em duplicata de amostras para cada batelada. Os valores individuais de cada amostra devem estar situados dentro de uma faixa de $\pm 5\%$ do valor médio encontrado na determinação. Se o valor obtido nas amostras ficar fora do limite estabelecido, reanalisar as amostras ou indicar este fato junto com os resultados das amostras daquela batelada. Os valores das duplicatas das amostras também podem ser utilizados para execução de uma Carta de Controle de Duplicata.

6.7 Cálculos e expressão dos resultados

6.7.1 Registrar as absorbâncias lidas, os volumes utilizados de amostra, eventuais fatores de diluição e, utilizando a curva de calibração, determinar as concentrações correspondentes de substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno nas amostras.

6.7.2 Expressar os resultados finais como Surfactantes Aniônicos em *mg/L*, reportando a massa molar do padrão de LAS utilizado na curva de calibração, conforme a tabela a seguir:

Faixa de surfactantes aniônicos encontrada (mg/L)	Expressar o resultado
Menor que 0,01	Como menor que 0,01 mg/L
Igual ou maior que 0,01 e menor que 0,50	Com 2 algarismos após a vírgula
Igual ou maior que 0,50 e menor que 5,0	Com 1 algarismo após a vírgula
Igual ou maior que 5,0	Somente com números inteiros

6.7.3 Caso esteja disponível no laboratório um sistema informatizado para lançamento dos dados (por exemplo, o *LabWin*), os valores dos volumes de amostras e pesos obtidos nas análises devem ser lançados no sistema para que ele execute quaisquer cálculos e expresse os resultados diretamente, conforme os critérios estabelecidos.

6.7.4 Quando solicitado pelo cliente, calcular e expressar a incerteza de medição associada à determinação.

7 REGISTROS

- **FRM-POP-634-02** - REGISTRO DE EXECUÇÃO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO DO SERVAQ;
- **FRM-POP-639-01**- REGISTRO DE UTILIZAÇÃO DE EQUIPAMENTOS SERVAQ ESPECTROFOTÔMETROS;
- **FRM-ME-608-01** - MEMÓRIA DE ANÁLISES E CÁLCULOS SERVAQ – SUBSTÂNCIAS TENSOATIVAS QUE REAGEM COM O AZUL DE METILENO (MBAS)
- **FRM-POP-602-01**- CONTROLE INTERNO DE SOLUÇÕES SERVAQ;
- **FRM-POP-602-03**- REGISTRO DE PREPARO DE SOLUÇÕES E REAGENTES ESTOQUE SERVAQ.

8 ANEXOS

Não aplicável.

9 HISTÓRICO DA ÚLTIMA REVISÃO

Atualização para adequação ao POP-INEA-GERLAB-104, NOI-INEA-01-R1 e *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 24^a ed., EUA, 2022.