

PORTARIA Nº 393, DE 15 DE MAIO DE 1998

A Secretária de Vigilância Sanitária, no uso de suas atribuições, Considerando a necessidade de complementar a Portaria Ministerial 112, de 14 de maio de 1982, que determina que as substâncias tensoativas aniônicas, utilizadas na composição de produtos Saneantes Domissanitários de qualquer natureza, devem ser BIODEGRADÁVEIS;

Considerando a Lei 6360/76 e o Decreto 79094/77, resolve:

Art. 1º Estabelecer o "Método para Determinação da Biodegradabilidade de Tensoativos Aniônicos", com validade em todo Território Nacional, conforme Anexo I da presente Portaria.

Art. 2º Esta Portaria entrará em vigor na data de sua publicação, ficando revogada a Portaria SVS nº 120, de 24 de novembro de 1995 e as demais disposições em contrário.

MARTA NOBREGA MARTINEZ

ANEXO I

MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DE TENSOATIVOS ANIÔNICOS

SUMÁRIO:

1. Objetivo
 2. Campo de aplicação
 3. Definições
 4. Siglas
 5. Condições gerais
 6. Condições específicas
 7. Referências
 8. Anexos
- A. Determinação de tensoativos aniônicos em produtos comerciais e extratos.
B. Determinação de substâncias ativas ao azul de metileno para o ensaio de biodegradabilidade.

OBJETIVO

Este Procedimento Operacional Padronizado (POP) estabelece a metodologia a ser adotada para determinação da biodegradabilidade de tensoativos aniônicos utilizados na composição de saneantes ou tensoativos aniônicos puros.

CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se à análise de todos os produtos que contenham tensoativos aniônicos comercializados no Brasil.

DEFINIÇÕES

Para efeito deste POP são adotadas as seguintes definições:

3.1 - Tensoativo biodegradável - é uma substância química com propriedades tensoativas, susceptível de decomposição e degradação por microrganismos e que, em decorrência desses processos, não dê origem a substâncias consideradas nocivas ao meio ambiente ou que possuam grau de toxicidade superior ao da substância tensoativa original.

3.2 - Grau de biodegradabilidade - é expresso em percentagem e refere-se a substâncias ativas ao azul de metileno que desaparecem sob as condições do ensaio.

3.3 - Substâncias ativas ao azul de metileno - referem-se aos compostos aniônicos capazes de reagir com o azul de metileno.

SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

n-DBSS - n-Dodecil benzeno sulfonato de sódio

TPBSS - Tetrapropileno benzeno sulfonato de sódio

SAAM - Substância ativa ao azul de metileno

MAM - Método do azul de metileno

EPI - Equipamento de proteção individual

EPC - Equipamento de proteção coletiva

CONDIÇÕES GERAIS

5.1 - Este método consiste na medida da biodegradação dos tensoativos presentes na amostra, sob condições específicas, tendo como referências o n-DBSS e o TPBSS, testados em paralelo como critério de verificação da validade do ensaio.

5.2 - Substâncias químicas, em especial, álcalis fortes, metais tóxicos, bactericidas e solventes inorgânicos, em solução ou no ambiente, que impeçam a atividade dos microrganismos, podem retardar o processo de degradação ou influenciar no resultado final.

5.3 - Compostos alcalinos e outras substâncias presentes em alguns produtos detergentes podem interferir no valor do pH. Por esta razão, o ensaio deve ser desenvolvido em soluções tampão utilizando o tensoativo obtido por extração alcóolica a partir do produto comercial.

6. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

6.1 - Preparo das amostras

6.1.1 - Agentes tensoativos puros podem ser submetidos ao ensaio em seu estado original. Deve ser determinado o teor de SAAM pelo Método do Azul de Metileno descrito no Anexo A, para o preparo das soluções teste.

6.1.2 - Extração dos agentes tensoativos presentes no produto comercial: produtos formulados devem sofrer uma extração alcóolica de acordo com as seguintes condições:· extração alcóolica: se a amostra contém menos sabão do que SAAM;· extração alcóolica e remoção do sabão: se a amostra contém mais sabão do que SAAM.

Deve ser determinado o conteúdo de SAAM de ambos os extratos para o preparo das soluções teste, bem como, na amostra em análise, segundo o procedimento contido no Anexo A.

A extração é realizada com a finalidade de se eliminar os componentes inorgânicos e/ou insolúveis que poderiam interferir no ensaio de biodegradabilidade. A eliminação quantitativa desses componentes não é necessária, assim como não é

necessária a extração quantitativa dos tensoativos. Entretanto, o extrato deve conter, pelo menos 90% das substâncias que respondem ao azul de metileno, contidas na amostra.

6.1.2.1 - Material e equipamentos

6.1.2.1.1 - Reagentes e soluções:

água deionizada;
isopropanol P.A.;
carbonato de potássio P.A. ;
hidróxido de sódio P.A. ;
solução de ácido clorídrico 2N;
solução de hidróxido de sódio a 10%;
n-hexano P.A.;
metanol P.A.

6.1.2.1.2 - Vidraria:

filtros Buchner;
kitasatos de 250 ml ;
funis de separação de 250 ml;
bécheres;
balões volumétricos de 250 e 1000 ml;
pipetas volumétricas de 1, 5 e 10 ml;
erlenmeyer de 250 ml com tampa esmerilhada.

6.1.2.1.3 - Equipamentos:

banho-maria;
agitador magnético.

6.1.2.2 - Procedimentos para produtos que contêm menos sabão do que SAAM

6.1.2.2.1 - Procedimento para produtos em pó:

pesar aproximadamente 10 g da amostra; pulverizar bem e transferir para erlenmeyer de 250 ml com tampa esmerilhada;
adicionar 20 ml de solução saturada de K_2CO_3 (duas vezes em volume a massa da amostra);
adicionar 30 ml de isopropanol (3 vezes em volume a massa da amostra);
agitar em agitador magnético por 30 minutos;
filtrar em buchner, lavando o resíduo com 10 ml de isopropanol;
transferir as duas fases do filtrado para um funil de separação;
recolher a fase do isopropanol em um bécher;
extrair a fase aquosa com 10 ml de isopropanol agitando por 1 minuto;
juntar os extratos alcoólicos, desprezando a fase aquosa;
filtrar os extratos em cadinho filtrante com placa porosa nº 4;
evaporar o extrato alcoólico em banho-maria, sem secar completamente;
redissolver em água e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 250 ml completando o volume com água destilada;
determinar o teor de tensoativo extraído procedendo a análise através do método descrito no Anexo A;

com base na concentração de tensoativo declarado na amostra, calcular a percentagem de tensoativo extraído e, só prosseguir o ensaio, caso este valor seja maior ou igual a 90%.

6.1.2.2.2 - Procedimentos para produtos líquidos:

caso o produto apresente caráter ácido deve ser neutralizado com KOH 10% até pH entre 6,0 e 8,0 antes da adição do K_2CO_3 ;
contendo o produto cloro ativo, o mesmo deve ser inativado com sulfito de sódio antes da neutralização, verificando a completa inativação do cloro;
pesar 20 g do líquido em erlenmeyer de 250 ml com tampa esmerilhada;
adicionar 8 a 10 g de K_2CO_3 para saturar a água presente no líquido;
adicionar 30 ml de isopropanol;
repetir o procedimento descrito para produtos em pó a partir da alinea d, da seção 6.1.2.2.1.

6.1.2.3 - Procedimentos para produtos que contêm mais sabão do que SAAM:

pesar 10 g da amostra e transferir para erlenmeyer com tampa esmerilhada;
adicionar 10 ml de solução saturada de K_2CO_3 e 5 g de K_2CO_3 sólido;
adicionar 30 ml de isopropanol;
repetir o procedimento descrito para produtos em pó a partir da alínea d até k da seção 6.1.2.2.1;
redissolver o resíduo em 60 ml de metanol;
acidificar com HCl 2 N até pH próximo de 3;
adicionar 20 ml de água para cada 30 ml de metanol;
transferir para funil de separação;
extrair com duas porções de 30 ml de n-hexano, desprezando as mesmas;
transferir a fase metanol/água para um bécher (ou outro recipiente), neutralizar com NaOH a 10%, evaporar o metanol em banho-maria, dissolver o resíduo com água destilada e levar a 250 ml em balão volumétrico;
determinar o teor de tensoativo extraído procedendo a análise através do método descrito no Anexo A;
com base na concentração de tensoativo declarado na amostra, calcular a percentagem de tensoativo extraído e, só prosseguir o ensaio, caso este valor seja maior ou igual a 90%.

6.2 - Ensaio de biodegradabilidade

6.2.1 - Obtenção e tratamento do inóculo

6.2.1.1 - Material:

frascos de vidro âmbar de 1000 ml;
funil de vidro;
proveta de 250 ml;
bastão de vidro;
gaze;
papel de filtro.

6.2.1.2 - Procedimentos:

coletar uma amostra de esgoto de aproximadamente 1000 ml, em frasco de vidro âmbar, da saída do filtro biológico de uma estação de tratamento de esgoto

doméstico. A estação deve estar em funcionamento regular. Evitar coleta em dias chuvosos, assim como após lavagem de tanques e remoção do conteúdo; filtrar a amostra coletada em papel de filtro ou gaze e algodão, sendo os primeiros 200 ml, aproximadamente, descartados e o restante guardado em condições aeróbicas até o momento do ensaio. O inoculo deve ser utilizado no dia da coleta; alternativamente poderá ser utilizado, como inoculo, solo de jardim, procedendo-se da seguinte maneira:

pesar 100 g de solo fértil de jardim (com baixo teor de argila, areia e matéria orgânica) e suspender em água destilada ou da torneira, desde que seja isenta de cloro, para obter 1000 ml. Deixar em repouso por 30 minutos;

filtrar o sobrenadante através de papel de filtro, desprezando os primeiros 200 ml. Manter o restante do filtrado em condições aeróbicas até o momento do ensaio. O inoculo deve ser utilizado no dia do preparo.

as amostras do inoculo devem apresentar, no mínimo, 100.000 unidades formadoras de colônias (u.f.c) / ml. A contagem deve ser feita pelo Método de "pour-plate" para contagem de microrganismos heterófilos em placas.

6.2.1.3 - Quantidade de inoculo:

determinar a quantidade apropriada de inoculo, experimentalmente, quando o método for utilizado pela primeira vez e quando ocorrer mudança na natureza do mesmo, da seguinte maneira:

realizar ensaios preliminares (item 6.2.3) com as duas referências (item 6.2.2.1) de forma a determinar a quantidade de inoculo necessária para causar a biodegradação das mesmas, de acordo com as suas especificações. Geralmente, a quantidade de 0,5 ml / l é adequada.

É recomendado checar a quantidade de inoculo periodicamente e especialmente quando são observadas mudanças no grau de biodegradabilidade das referências.

6.2.2 - Material e equipamentos

6.2.2.1 - Referências de biodegradabilidade

6.2.2.1.1 - Referência n-DBSS - substância com grau de biodegradabilidade mínima de 90%.

6.2.2.1.2 - Referência TPBSS - substância com grau de biodegradabilidade máxima de 35%.

6.2.2.2 - Reagentes e soluções:

água destilada ou deionizada livre de metais tóxicos (especialmente cobre);
solução de cloreto de mercúrio a 1%.

6.2.2.3 - Meio mineral

Para um litro de água destilada ou deionizada, adicionar 1 ml de cada uma das seguintes soluções: a) solução A:

Fosfato monopotássico P.A

8,50 g

Fosfato dipotássico P.A

21,75 g

Fosfato dissódico dihidratado P.A

Cloreto de amônio P.A	33,40 g
Água destilada ou deionizada	1,70 g
	1000,00 ml

O valor do pH desta solução deve ser 7,2.

b) solução B:

Sulfato de magnésio heptahidratado P.A.	22,50 g
Água destilada ou deionizada	1000,00 ml

c) solução C:

Cloreto de cálcio P.A	27,50 g
Água destilada ou deionizada	1000,00 ml

d) solução D:

Cloreto férrico hexahidratado P.A	0,25 g
Água destilada ou deionizada	1000,00 ml

Distribuir em porções de 500 ml em erlenmeyers de 1000 ml.
Autoclavar a 121° C durante 15 minutos.

6.2.2.4 - Equipamento específico

Aparelho agitador com capacidade para erlenmeyers de 1000 ml.

6.2.2.5 - Preparo das soluções de referência n-DBSS e TPBSS: preparar soluções estoque contendo 1 g/l de SAAM;

determinar precisamente a concentração dessas soluções pelo Método descrito no Anexo A.

6.2.3 - Procedimentos:

testar as amostras e referências em duplicata simultaneamente. Empregar preferencialmente técnicas assépticas;

para cada 500 ml do meio mineral contidos nos erlenmeyers de 1000 ml, adicionar 2,5 ml da solução estoque de n-DBSS a fim de se obter uma concentração final de 5 mg/l. A seguir, adicionar uma quantidade de inóculo determinada de acordo com o item 6.2.1.3. Proceder da mesma maneira para a referência TPBSS e para as amostras. Os sistemas teste devem estar livres de espuma;

retirar então de cada sistema teste, uma alíquota de 20 ml e determinar o teor de SAAM pelo Método descrito no Anexo B;

o valor médio das concentrações deve estar entre 4,5 e 5,5 mg/l de SAAM, com precisão mínima de 0,1 mg/l;

caso as determinações não sejam realizadas dentro de três horas, adicionar uma quantidade da solução de cloreto de mercúrio, de forma a obter uma concentração final de 50 mg/l;

colocar os erlenmeyers no aparelho agitador e mantê-los sob agitação constante de forma a proporcionar a aeração do sistema (em torno de 150 rpm), a uma

temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, ao abrigo da luz. O ambiente deve estar livre de produtos e materiais tóxicos, especialmente solventes clorados, fenóis e benzeno;
retirar alíquotas de 25 ml no 5º dia de incubação para determinar o conteúdo de SAAM;
a partir do 8º dia retirar alíquotas em dias alternados aumentando o volume de cada alíquota à medida que a biodegradação vai se processando, sendo de 100 ml na última amostra.

6.2.4 - Critério para o encerramento do ensaio

Encerrar o ensaio quando a diferença entre dois valores num período de 4 dias for inferior a 0,15 mg/l. De qualquer forma a duração do ensaio não deve exceder 19 dias.

6.2.5 - Cálculo dos resultados :

traçar uma curva de biodegradação utilizando a concentração da substância ativa das amostras e referências em mg / l versus o tempo em dias;
calcular a percentagem de biodegradação das amostras e das referências através da seguinte fórmula:

$$AT = \frac{CO - CT}{CO} \times 100 \%$$

Onde: AT = percentagem de biodegradação no tempo t.

CO = concentração inicial média da solução (em mg SAAM/l).

CT = concentração de solução no tempo t (em mg SAAM/l).

c) o grau de biodegradabilidade de uma amostra (AE) é o valor de AT quando o valor de CT chega ao patamar definido em 6.2.4;

d) a média aritmética dos valores correspondentes à AE das duas réplicas ensaiadas é o grau de biodegradabilidade da amostra;

e) para amostras cujas curvas de biodegradação não apresentem as condições condições do item 6.2.4, o grau de biodegradabilidade é calculado com os valores obtidos no 19º dia.

6.2.6 - Validade dos resultados Os resultados são válidos sob as seguintes condições:

a referência n-DBSS deve apresentar um grau de biodegradabilidade superior a 90%, no período de 14 dias, sendo normalmente necessários 7 a 10 dias.

a referência TPBSS não deve biodegradar mais do que 35%.

Nota:

Usar EPI (avental, luvas, óculos de proteção) e EPC (capela) ao manipular os reagentes químicos principalmente metanol, clorofórmio e cloreto de mercúrio.

6.2.7 - Interpretação dos resultados

A amostra é considerada satisfatória quando o grau de biodegradabilidade do tensoativo testado for igual ou superior ao grau de biodegradabilidade definido para o n-DBSS no item 6.2.2.1.1, considerado como referência de biodegradabilidade para este ensaio.

7. REFERÊNCIAS

AMERICAN Public Health Association. Standard methods_for the examination of water and wastewater/prepared and published jointly by American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation . 18 ed Washington, D.C., C 1992. p.5-36 a 5-38; 9-35 a 9-36.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 112, de 14 de junho de 1982. Ref. substâncias tensoativas aniônicas, utilizadas na composição de saneantes de qualquer natureza, devem ser biodegradáveis . Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, jun. 1982. p.10904, Seção 1, pt.1.

ORGANISATION for Economic Co-operation and Development. Pollution By Detergents. Determination of the biodegradability of anionic synthetic surface active agents. Report submitted by the Expert Group on Biodegradability of Synthetic Detergents. Paris, 1971.

ANEXO A

DETERMINAÇÃO DE TENSOATIVOS ANIÔNICOS EM PRODUTOS COMERCIAIS E EXTRATOS

A. 1. - Material e equipamentos:

filtros Buchner;
kitasatos de 250 ml;
bécheres;
balões volumétricos de 250 e 1000 ml;
erlenmeyer de 250 ml com tampa;
pipetas volumétricas de 3,10 e 20 ml;
provetas de 100 ml com tampa;
buretas;
banho-maria;
agitador magnético.

A. 2 - Reagentes:

a) isopropanol P. A.;
b) carbonato de potássio P.A.;
c) hidróxido de potássio P.A.;
d) ácido clorídrico P.A. ;
e) hidróxido de sódio P.A.;
f) n - hexano P.A.;
g) clorofórmio P.A.;
h) metanol P.A.;
i) lauril sulfato de sódio P.A.;
j) cloreto de benzetônio P. A.;
k) azul de metileno;
l) ácido sulfúrico concentrado P.A.;
m) 3,8 - diamino - 5 -metil - 6 - fenilfenantridium bromide (Dimidium Bromide);
n) azul de bissulfina vn - 150.

A. 3 - Procedimento

Poderá ser utilizado o Método do Indicador Misto ou o Método do Azul de Metileno

A. 3.1 - Preparo das soluções:

indicador misto:

solução estoque: pesar exatamente cerca de 0,25 g de azul de bissulfina vn - 150 em um bécher de 50 ml e 0,5 g de brometo de 3,8 - diamino - 5 - metil - 6 - fenilfenantridium (Dimidium Bromide) em outro bécher de 50 ml. Adicionar a cada bécher, 25 ml de solução de metanol a 10 % (aquecida). Transferir as soluções para um balão de 250 ml e completar o volume com solução de metanol a 10%;

solução indicadora: misturar em balão volumétrico de 500 ml, 20 ml de solução estoque, 20 ml de H₂ SO₄ 2,4 M ou 3 ml de H₂SO₄ concentrado e levar ao volume com água destilada.

solução padrão de cloreto de benzetônio 0,004 M:

secar aproximadamente 2 g de cloreto de benzetônio em estufa a 100° C por 1 hora, esfriar em dessecador até temperatura ambiente e pesar com precisão cerca de 1,80 g de cloreto de benzetônio, dissolver em água, acrescentar 0,4 ml de NaOH 50% e transferir para um balão volumétrico de 1000 ml, completando o volume com água destilada;

padronizar esta solução com lauril sulfato de sódio padrão de 0,004 M.

solução padrão de lauril sulfato de sódio 0,004 M:

pesar com precisão cerca de 1,15 g de lauril sulfato de sódio seco a 100° C por 1 hora, dissolver em água e completar para 1000 ml. Calcular a concentração utilizando a concentração (% p/p) determinada no item

A.3.2.

d) solução de azul de metileno:

dissolver 0,5 g de azul de metileno em água destilada e completar para 100 ml.

e) solução ácida de azul de metileno:

adicionar 120 ml de ácido sulfúrico 2 N, 50 g de sulfato de sódio anidro, 6 ml de solução de azul de metileno e completar com água destilada para 1000 ml.

f) ácido sulfúrico 2 N:

diluir 54 ml de ácido sulfúrico (densidade 1,84) em 200 ml de água destilada e completar o volume para 1000 ml.

A. 3.2 - Padronização do lauril sulfato de sódio

pesar com precisão $5 \pm 0,2$ g de lauril sulfato de sódio em um balão de fundo redondo de 250 ml com junta esmerilhada e adicionar 25 ml de ácido sulfúrico 1N, através de uma bureta de 50 ml, adaptar o condensador e manter em refluxo. Durante os primeiros 5 a 10 minutos a solução irá espumar. Quando cessar a espuma, ferver levemente durante 2 horas. Parar o aquecimento e esfriar a solução. Lavar o condensador com 30 ml de água destilada, remover o frasco do condensador adicionando algumas gotas de fenolftaleína e titular com hidróxido de sódio 1N até o aparecimento do primeiro tom de rosa. Processar um branco da mesma maneira como descrito para a solução padrão de lauril sulfato de sódio;

cálculo:

$$\% p / p = \frac{28,84 (a - b)}{P}$$

Onde: a = volume em ml de hidróxido de sódio 1N, utilizado na titulação de lauril sulfato de sódio;

b = volume em ml de hidróxido de sódio 1N, utilizado na titulação do branco;
P = peso em gramas de lauril sulfato de sódio.

A. 3.3 - Procedimento utilizando o Método do Indicador Misto:

transferir para um balão volumétrico de 250 ml uma quantidade da amostra que contenha, aproximadamente, 1 miliequivalente grama de tensoativo aniônico, adicionar 100 ml de H₂O destilada, 3 gotas de fenolftaleína e ajustar o pH da solução com hidróxido de sódio ou ácido sulfúrico diluído até a coloração rosa pálido. Completar o volume com H₂O e transferir um volume conveniente desta solução para uma proveta de 100 ml com tampa e adicionar 10 ml de solução indicadora mista e 10 ml de clorofórmio;
titular com solução de cloreto de benzetônio;
ponto final: fase orgânica passa de rosa para o primeiro tom de azul.

A.3.4. - Procedimento utilizando o Método do Azul de Metileno:

transferir uma quantidade de amostra que contenha, aproximadamente 1 miliequivalente grama de tensoativo aniônico e diluir em água destilada para 250 ml; pipetar um volume conveniente desta solução para uma proveta de 100 ml, adicionar 25 ml da solução ácida de azul de metileno e 15 ml de clorofórmio;
titular com solução padrão de cloreto de benzetônio, até a igualdade de tom de azul entre a fase orgânica e a aquosa.

A.3.5 - Cálculo

$$\% = \frac{FD \times PM \times M \times V \times 0,1}{P}$$

Onde: FD = fator de diluição
PM = peso molecular da amostra
M = molaridade do titulante
V = volume gasto em ml
P = peso da amostra

ANEXO B

DETERMINAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS AO AZUL DE METILENO PARA O ENSAIO DE BIODEGRADABILIDADE

B. 1 - Material e equipamentos:

Espectrofotômetro UV/ visível;
funis de separação de 250 ml;
pipetas volumétricas de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100 ml;
provetas de 10, 50 e 100 ml;
buretas de 25 e 50 ml.

B. 2 - Reagentes:

lauril sulfato de sódio P.A.;
fenolftaleína P.A.;
hidróxido de sódio P.A.;
ácido sulfúrico concentrado P.A.;

azul de metileno ;
clorofórmio P.A.;
peróxido de hidrogênio 10 V.;
fosfato de sódio monobásico P.A.;
etanol P.A.;
isopropanol P.A..

B. 3 - Procedimento

B. 3.1 - Preparo das soluções:

solução estoque de lauril sulfato de sódio a 1000 ppm:
dissolver 1 g de lauril sulfato de sódio em 1000 ml de água destilada;
solução padrão de lauril sulfato de sódio a 10 ppm:
diluir 1 ml da solução estoque em 100 ml de água destilada;
solução de fenolftaleína em meio alcoólico:
dissolver 1g de fenolftaleína em 60 ml de etanol e diluir com água destilada até 100 ml;
solução de hidróxido de sódio 1 N:
dissolver 40 g de hidróxido de sódio em água e completar para 1000 ml;
solução de ácido sulfúrico 1 N:
diluir 30 ml de ácido sulfúrico concentrado em água e levar a 1000 ml;
solução de ácido sulfúrico 6 N:
diluir 167 ml de ácido sulfúrico concentrado em água e levar a 1000 ml;
solução de azul de metileno:
dissolver 100 mg de azul de metileno em 100 ml de água. Transferir 30 ml para um balão de 1000 ml, adicionar 500 ml de água, 41 ml de ácido sulfúrico 6 N e 50 g de fosfato de sódio monobásico; agitar até dissolver e completar o volume com água.
solução de lavagem:
adicionar 41 ml de ácido sulfúrico 6 N em balão volumétrico de 1000 ml e 50 g de fosfato de sódio monobásico; agitar até dissolver e completar o volume com água.

B. 3.2 - Preparo da curva de calibração:

tomar 10 funis de separação de 250 ml e adicionar a cada um 0, 1, 3, 5, 7, 9,11,13,15,20 ml da solução padrão e água suficiente para completar o volume de 100 ml. Adicionar gotas de NaOH 1 N tendo fenolftaleína como indicador, até obter coloração rosa pálida e descorar em seguida com H₂ SO₄ 1 N. Adicionar 10 ml de clorofórmio e 25 ml de azul de metileno, agitando vigorosamente por 30 s;
caso haja formação de emulsão adicionar 10 ml ou menos de isopropanol que deverá ser usado em todos os padrões e amostras;
separar a fase orgânica para outro funil de separação e repetir por duas vezes o processo de extração com 10 ml de clorofórmio, juntando as fases orgânicas;
adicionar à fase orgânica 50 ml da solução de lavagem agitando vigorosamente por 30 s (não deve formar emulsão). Filtrar a fase orgânica para um balão volumétrico de 50 ml (com lã de vidro) e completar o volume;
determinar a absorbância a 652 nm usando o clorofórmio como branco;
traçar o gráfico concentração de tensoativo (ppm) x absorbância.

B. 3.3 - Determinação da concentração de tensoativos na amostra

Tomar uma alíquota da amostra para obter uma concentração entre 0,2 ppm e 4,0 ppm e proceder como descrito no item B.3.2, determinando a concentração a partir da curva de calibração obtida.

B. 3.4 - Cálculos

$$x = \frac{y - a}{b} \times F d$$

Onde: x = concentração em ppm

Y = absorvância da amostra

a = intercepto

b = coeficiente angular da reta

Fd = fator de diluição