

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS®	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR SURFACTANTES ANIÓNICOS EN AGUAS			
	Código: IN-GAA-118	Versión: 04	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 1 de 7

1. Objetivo

Determinar la concentración de surfactantes aniónicos en aguas para establecer el grado de contaminación debido a los detergentes y materiales de limpieza, según la norma SM 5540 A, C.

2. Alcance

Este método se aplica para el análisis de surfactantes aniónicos en aguas residuales no domésticas, aguas residuales domésticas, aguas subterráneas y aguas superficiales; en aguas residuales no domésticas hay numerosos materiales normalmente presentes que pueden interferir seriamente si se intenta la determinación directa. La mayoría de las interferencias de fase acuosa no tensoactivas se pueden eliminar por medio de la sublimación.

3. Referencias Normativas

- American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. STANDARD METHODS: For the Examination of Water and Wastewater, 23RD Edition, American Public Health Association 800 I Street, NW. Washington D.C., 2017. ISBN 978-087553-287-5.
- Instructivo para determinar surfactantes en aguas. Gestión de Tecnología de Negocio. Centro de Innovación y Tecnología. Departamento de Servicio Técnico de Laboratorio de Transporte y Transversales. Laboratorio de Aguas y Suelos. Instituto Colombiano de Petróleo.

4. Definiciones

- Analito:** especie química que se analiza.
- Blanco:** agua reactivo o matriz equivalente que no contiene, por adición deliberada, la presencia de ningún analito o sustancia por determinar, pero que contiene los mismos disolventes, reactivos y se somete al mismo procedimiento analítico que la muestra problema.
- Calibración:** proceso mediante el cual se establece la relación entre la indicación de un instrumento o sistema, y el valor establecido para un patrón de medición.
- Blanco fortificado:** son una herramienta estadística que garantiza la calidad de los resultados, las cuales nos permiten llevar un control sobre las pruebas y a su vez sobre los equipos.
- LAS:** linear alkylbenzene sulfonate (alquilbencensulfonato de sodio lineal) o dodecilbencenosulfonato de sodio, es el tensoactivo aniónico más ampliamente utilizado.
- Material de referencia certificado:** material de referencia, acompañado de un certificado, en el que una o más de sus propiedades está certificada por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se expresa dicha propiedad, y para el que cada valor certificado está asociado a una incertidumbre con un nivel de confianza determinado.
- Muestra:** parte representativa de la materia objeto del análisis.
- NIST:** Instituto Nacional para Estándares y Tecnología.
- Patrón:** medida materializada, instrumento de medición, material de referencia o sistema de medición destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o más valores de una magnitud para servir de referencia.
- SAAM:** Sustancias Activas al Azul de Metileno
- SM:** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.
- Solución de referencia:** solución preparada a partir de un reactivo grado analítico que contiene el analito a determinar. Solo deben ser empleados para realizar calibraciones y blanco fortificado, ya que no se encuentran presentes los componentes de la matriz que acompañan al analito en las muestras.

5. Condiciones Generales.

Los jabones no responden al método MBAS. Los utilizados en o como detergentes son sales alcalinas C_{10-20} de ácidos grasos $[RCO_2]^-Na^+$, y aunque son de naturaleza aniónica, están tan débilmente ionizados que no se forma un par de iones extraíble en las condiciones de la prueba. Los tensoactivos aniónicos no polares comúnmente utilizados en las formulaciones de detergentes son muy sensibles. Estos incluyen principalmente tensoactivos del tipo sulfonato $[RSO_3]^-Na^+$, el tipo éster sulfato $[ROSO_3]^-Na^+$, y sulfatados no iónicos $[RE_nOSO_3]^-$.

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR SURFACTANTES ANIÓNICOS EN AGUAS			
	Código: IN-GAA-118	Versión: 04	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 2 de 7

Na⁺. Se recuperan casi por completo mediante una única extracción con cloroformo.

La presencia de surfactantes en aguas naturales y en aguas residuales, se debe principalmente a la descarga de desechos acuosos provenientes de hogares, lavanderías y de otras industrias que realicen operaciones de limpieza.

Tales moléculas tienden a congregarse en las interferencias entre el medio acuoso y las otras fases del sistema, tales como aire, líquidos oleosos y partículas, impartiendo así propiedades tales como formación de espuma, emulsificación y suspensión de partículas.

Un tensoactivo combina en una sola molécula un grupo fuertemente hidrófobo con uno fuertemente hidrófilo. El grupo hidrófobo es generalmente un radical hidrocarbonado (R) que contiene aproximadamente entre 10 y 20 átomos de carbonos. Los grupos hidrofílicos son de dos tipos:

- > Aquellos que se ionizan en agua, se subdividen en dos categorías, diferenciadas por carga: los cargados negativamente [surfactantes aniónicos, ej., (RSO₃)⁻Na⁺], y los cargados positivamente [Surfactantes Catiónicos, ej., RMe₃N]⁺Cl⁻].
- > Aquellos que no se ionizan en agua, llamados Surfactantes No Iónicos, generalmente contienen un grupo Hidrofílico Polioxietileno, ROCH₂CH₂OCH₂CH₂.....OCH₂CH₂OH, frecuentemente abreviado como RE_n, donde n es el número promedio de grupos -OCH₂CH₂- del grupo hidrofílico.

5.1 Método de sustancias activas al azul de metileno.

Las sustancias activas al azul de metileno (SAAM) originan la transferencia del azul de metileno, a un catión coloreado, desde una solución acuosa dentro de un líquido orgánico inmiscible en equilibrio. Esto ocurre a través de la formación de un par iónico por el anión de SAAM y el catión del azul de metileno. La intensidad del color azul resultante en la fase orgánica es una medida de SAAM. Los surfactantes aniónicos están entre las más importantes sustancias, naturales y sintéticas, que muestran actividad al azul de metileno.

Este método es relativamente simple y preciso. Comprende tres extracciones sucesivas de un medio acuoso ácido que contiene un exceso de azul de metileno en cloroformo, seguido del retrolavado acuoso y posterior medición del color azul en el cloroformo por espectrofotometría a 652 nm.

Respuestas de tensoactivo aniónico: los jabones no responden en el Método SAAM. Los utilizados en o como detergentes son sales alcalinas de ácidos grasos de C₁₀₋₂₀ [RCO₂]⁻Na⁺, y aunque son de naturaleza aniónica, están tan débilmente ionizados que un par de iones extraíble no se forma bajo las condiciones de la prueba. Los tensoactivos aniónicos sin jabón comúnmente utilizados en formulaciones de detergentes son fuertemente sensibles. Estos incluyen principalmente surfactantes del tipo sulfonato [RSO₃]⁻Na⁺, el tipo de éster sulfato [ROSO₃]⁻Na⁺, y sulfatados no iónicos [RE_nOSO₃]⁻Na⁺. Estos se recuperan casi completamente por una sola extracción de CHCl₃.

5.2 Interferencias.

Interferencias positivas resultan de todas las otras sustancias activas al azul de metileno que estén presentes en la muestra; si se realiza una determinación directa de cualquier especie individual de SAAM, como LAS, todas las demás sustancias activas al azul de metileno interfieren. Sustancias como los sulfonatos, sulfatos, carboxilatos, fenoles orgánicos, tiocianatos inorgánicos, cianatos, nitratos y cloruros, también pueden transferir azul de metileno dentro de la fase de cloroformo. Cuanto más pobre es la capacidad de extracción de sus pares de iones, más eficaz es el paso de retrolavado acuoso para eliminar estas interferencias positivas; la interferencia del cloruro se elimina casi por completo y del nitrato en gran medida por el retrolavado.

Interferencias negativas son causadas por la presencia de surfactantes catiónicos y de otros materiales catiónicos, como las aminas, estas compiten con el azul de metileno en la formación de pares iónicos.

El material particulado puede generar interferencias negativas a través de la adsorción de sustancias activas al azul de metileno. Algunas de las SAAM adsorbidas pueden desorberse y emparejarse durante la extracción del

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS®	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR SURFACTANTES ANIÓNICOS EN AGUAS			
	Código: IN-GAA-118	Versión: 04	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 3 de 7

Cloroformo, originando un recobro incompleto y variable.

Los sulfuros presentes en las aguas residuales crudas o tratadas, pueden reaccionar con azul de metileno para formar un producto de reducción incoloro, haciendo que el análisis sea imposible. Eliminar este efecto por oxidación adicionando unas gotas de peróxido de hidrógeno al 30%.

5.3 Muestreo, preservación y almacenamiento.

Tomar muestras representativas siguiendo las instrucciones dadas en el SM 1060. Las muestras pueden ser recolectadas en recipiente de vidrio o plástico, el muestreo puede ser puntual o compuesto. Una vez recolectadas, refrigerar y analizar durante las 48 horas siguientes, antes del análisis llevar las muestras a temperatura ambiente.

Se debe evitar la formación de espuma porque la concentración de surfactante es más alta en la fase espumosa que en la fase acuosa asociada, luego en esta tiende a disminuir. Si se forma espuma, es conveniente mezclar muy bien la muestra sin agitar fuerte después del muestreo.

Adicionalmente, para la recepción, manejo y disposición final de las muestras, debe consultarse el instructivo del laboratorio "Manejo de muestras y disposición final de residuos".

5.4 Materiales, Equipos y Reactivos.

5.4.1 Materiales

- Embudos de Separación de 250 y 500mL con llave de teflón.
- Balones aforados de 100, 200, 250 ó 500 mL.
- Pipetas aforadas de 10 mL.
- Pipetas graduadas de 2, 5 ó 10 mL.

5.4.2 Equipos

- Espectrofotómetro, longitud de onda 652 nm
- Celdas de 1cm

5.4.3 Reactivos

Soluciones para Curva de Calibración

- Solución stock de dodecil sulfato de sodio de 1000 mg/L: Disolver exactamente 1 g de dodecil sulfato de sodio en agua tipo II y/o destilada, y diluir a 1 litro. Almacenar en el refrigerador para evitar su biodegradación. Si es necesario, preparar semanalmente.
- Solución estándar de dodecil sulfato de sodio de 10 mg/L para preparar la curva de calibración: diluir 10mL de la solución stock a 1 litro. Preparar cada vez que se realice el análisis.

Soluciones para el Blanco Fortificado

- Solución estándar de dodecil sulfato de sodio de 1 mg/L: diluir 10mL de la solución de 10 mg/L y diluir a 100 ml con agua tipo II y/o destilada. Preparar cada vez que se realice el análisis.

Soluciones para la extracción de surfactantes

- Solución alcohólica de fenoltaleína al 0.5 % en etanol. Pesar 0.5g de fenoltaleína en 100mL de alcohol etílico.
- Solución de hidróxido de sodio 1 N. Pesar 4g de Hidróxido de sodio y disolver en 100 ml de agua destilada.
- Ácido sulfúrico H₂SO₄ 1 N: en un balón de 50mL adicionar 40mL de agua y 1.4 mL de H₂SO₄ concentrado, dejar enfriar y aforar a 50mL.
- Ácido sulfúrico H₂SO₄ 6 N: en un balón de 100mL adicionar 80mL de agua y 16.8 mL de H₂SO₄ concentrado, dejar enfriar y aforar a 100mL.

- Cloroformo (CHCl_3). **Precaución:** Esta sustancia es tóxica y se sospecha que es un agente cancerígeno, tomar las precauciones adecuadas contra su inhalación y contacto con la piel.
- Azul de Metileno: disolver 20 mg de azul de metileno en 20 mL de agua tipo II y/o destilada. Transferir 15 mL a un balón de 500 mL y adicionar 250 mL de agua destilada, 20.5 mL de ácido sulfúrico 6 N y 25g de fosfato de sodio monobásico monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Agitar hasta que se disuelva y diluir a 500 mL.
- Solución de Lavado: adicionar 20.5 mL de ácido sulfúrico 6 N a 250 mL de agua tipo II y/o destilada, en un balón de 500 mL. Adicionar 25g de fosfato de sodio monobásico monohidrato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), agitar y diluir a 500 mL.
- Lana de Vidrio lavada previamente con cloroformo para evitar interferencias.
- Metanol. **Precaución:** los vapores son inflamables y tóxicos.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30%.

6. Contenido.

A continuación, se presentan las actividades para desarrollar el análisis de surfactante en la matriz de agua; Para el análisis directo de aguas, seleccionar el volumen de muestra con base en la concentración de SAAM esperada como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Volumen de muestra Vs concentración de SAAM

Concentración esperada de SAAM/L (mg/L)	Muestra tomada (mL)
0.025 - 0.080	400
0.08 - 0.40	250
0.4 - 2.0	100

Si la concentración de SAAM está por encima de 2 mg/L, diluya la muestra hasta que contenga 0.4 a 2.0 mg SAAM/L de muestra.

6.1 Curva de calibración.

A partir de la solución de 10 mg/L, preparar 100 mL de cada solución para la curva calibración, aforar al volumen con agua micro-filtrada. Ver tabla N° 2.

Tabla 2. Soluciones para curva de calibración de Surfactantes

Volumen (mL) de Sol de 10 mg SAAM/L	Concentración mg SAAM/L
0.0	0.0
2.0	0.2
5.0	0.5
10.0	1.0
15.0	1.5
20.0	2.0
25.0	2.5

Realizar el siguiente procedimiento para cada estándar:

- Adicionar cada solución del estándar a un embudo de separación de 250mL.
- Adicionar 3 gotas de fenolftaleína, y alcalinizar por adición gota a gota de hidróxido de sodio 1N hasta coloración rosa.
- Descartar el color rosa adicionando gota a gota ácido sulfúrico 1N hasta decoloración.
- Adicionar 10 mL de cloroformo y 25 mL de la solución de azul de metileno.

- Agitar vigorosamente durante 30 segundos y dejar que las fases se separen. Un exceso de agitación puede formar emulsión. Si ésta se forma, adicionar pequeños volúmenes de alcohol isopropílico (<10 mL).

Nota 1: algunas muestras requieren un período de separación de fases más largo que otras. Antes de drenar la capa de CHCl_3 , agite suavemente, luego deje reposar.

- Verter la capa de cloroformo en un segundo embudo de separación y lavar el vástago del primer embudo con pequeñas cantidades de este solvente.
- Repetir la extracción dos veces más, utilizando en cada una 10mL de cloroformo.
- Combinar todos los extractos de cloroformo en el segundo embudo de separación. Adicionar 50 mL de Solución de lavado y agitar vigorosamente durante 30 segundos. En esta etapa no se forma emulsión.
- Una vez se separen las dos capas, drenar la capa que contiene el cloroformo y filtrar a través de un embudo que contenga lana de vidrio. Mantener el filtrado en un balón aforado de 100 mL. (el filtrado debe ser claro).
- Adicionar 10 mL de cloroformo al embudo que contiene la solución de lavado, realizar la extracción, y drenar nuevamente pasando por lana de vidrio. Lavar la lana de vidrio y el embudo con cloroformo cada vez que filtre recogiendo en el mismo balón de 100mL. Repetir la extracción.
- Aforar el balón de 100 mL con cloroformo y mezclar bien.
- Medir la absorbancia de los patrones en el espectrofotómetro a 652 nm, empleando celda de 1.0 cm y usando como blanco cloroformo.
- Elaborar curva de calibración absorbancia vs mg SAAM/L.
- Aceptar un coeficiente de correlación de la curva de calibración ≥ 0.995 .

6.2 Determinación de SAAM en las muestras y blanco fortificado.

- Adicionar a un embudo de separación, 100 mL de la solución de referencia.
- Adicionar al embudo de separación el volumen de muestra según lo estipulado en la tabla 1.
- Repetir los mismos pasos indicados para las extracciones de SAAM en los estándares, teniendo en cuenta que algunas muestras requieren más tiempo de separación de fases que otras, por lo tanto, antes de drenar el cloroformo se debe agitar suavemente y permitir que se formen nuevamente las fases.
- Aforar el drenado final del extracto de cloroformo en un balón de 100 mL.
- Leer la concentración de SAAM en la curva de calibración del espectrofotómetro a una longitud de onda de 652 nm.

Nota 2: con la finalidad de minimizar el impacto por el volumen de solvente empleado, alternativamente aforar el extracto final en un balón de 50 mL. Multiplicar el resultado por el factor de concentración teniendo en cuenta la información de ejemplo en la tabla 3.

6.3 Cálculos

Calcular la concentración de Surfactantes interpolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración (absorbancia de estándares Vs. mg SAAM/L).

$$\text{SAAM (mg/L)} = A \times B$$

Dónde:

- A = Concentración en mg SAAM/L de la muestra, obtenida por interpolación en la curva de calibración.
 B = Factor de dilución o de concentración en la muestra.

Tabla 3. Ejemplos de factores de dilución y concentración

Factor de dilución				Factor de concentración		
Volumen de alícuota de muestra (mL)	Volumen de muestra inicial (mL)	Volumen de aforo del extracto final (mL)	Factor	Volumen de muestra inicial (mL)	Volumen de aforo del extracto final (mL)	Factor
10	100	100	10	100	50	0.50
25	100	100	4	200	50	0.25

50	100	100	2	250	50	0.20
--	100	100	1	250	100	0.40

6.4 Control de Calidad

Para garantizar la calidad de los resultados emitidos, los controles de calidad establecidos para el método de ensayo son los siguientes:

Blanco de reactivos (blanco del método): analizar en cada set de 20 muestras (o menos) un blanco de agua destilada, el cual debe tener todos los reactivos que normalmente están en contacto con la muestra durante todo el procedimiento analítico.

Blanco fortificado: analizar una solución de referencia de concentración conocida, en cada set de 20 muestras (o menos), cuyo valor corresponda al punto medio de la curva de calibración (o menos), preparada de la misma fuente de referencia usada para la curva de calibración, o una diferente, y procesarla con todos los pasos de preparación y análisis de las muestras, con la finalidad es evaluar el rendimiento del método y la recuperación del analito en la matriz blanco.

Matriz fortificada y duplicado de matriz fortificada: fortificar una muestra de agua superficial, subterránea o residual (doméstica o industrial) con una cantidad conocida del analito (la misma concentración con la que se prepara la blanco fortificado), con la finalidad de evaluar la recuperación del analito en una muestra real y separar el efecto matriz del desempeño del laboratorio. El duplicado se prepara de una segunda porción de muestra. Como mínimo, Incluir una muestra fortificada y su duplicado con cada lote de muestras a analizar. Evaluar los resultados como porcentaje de recuperación; el duplicado evalúa la precisión y exactitud.

Verificación de la MCC: con cada lote de muestras analizar una muestra preparada con la concentración del Mínimo Nivel de Reporte (MRL). El criterio de aceptación del MRL es del $\pm 25\%$ de error.

Verificación Continua de la Calibración (CCV): analizar un patrón de la curva con cada lote de muestras. Las concentraciones del patrón se rotan con cada lote para cubrir los diferentes rangos de la curva de calibración.

Registrar los datos obtenidos en la bitácora del análisis. Evaluar estos controles según lo estipulado en el instructivo "Aseguramiento de la validez de los resultados".

6.4.1 Incertidumbre

La estimación de la incertidumbre para el análisis de surfactantes aniónicos fue desarrollada de acuerdo al instructivo general "Estimación de incertidumbre".

6.4.2 Reporte de resultados

Una vez realizados los cálculos y la revisión, para asegurar la calidad y confiabilidad de los mismos, el valor obtenido debe ser reportado, teniendo en cuenta el instructivo general "Manejo de cifras significativas".

Si durante la ejecución del análisis se presenta una situación anómala y/o se tiene información relevante que facilite la interpretación del resultado, se debe realizar la nota aclaratoria en el sistema y en la bitácora de análisis.

7. Flujoograma

No aplica.

8. Documentos de Referencia:

- > Bitácora del análisis
- > Bitácora de manejo de equipos
- > Carta de control

 UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS®	PROCESO DE GESTIÓN DE APOYO A LA ACADEMIA			
	INSTRUCTIVO PARA DETERMINAR SURFACTANTES ANIÓNICOS EN AGUAS			
	Código: IN-GAA-118	Versión: 04	Fecha de aprobación: 03/08/2022	Página: 7 de 7

9. Listado de anexos:

No aplica

10. Historial de Cambios

Versión	Fecha	Cambios	Elaboró / Modificó	Revisó	Aprobó
01	22/02/2019	Documento Nuevo	Marlene Estrada. <i>Prof. Químico.</i>		Marco A. Torres <i>Director ICAOC</i>
02	13/03/2019	Correcciones estructurales y de redacción.	Joan Patiño. <i>Técnico Lab.</i>	Alexander Montes <i>Responsable unidad</i>	Mario Gutiérrez <i>Prof. de Calidad</i>
03	11/06/2019	Se ajusta la terminología a aguas residuales no domésticas (ARnD), se corrige el criterio de aceptación del MRL al $\pm 25\%$.	Alexander Montes <i>Responsable unidad</i>	Marlene Estrada <i>Líder Técnico</i>	Juan Trujillo <i>Director de CCA</i>
04	03/08/2022	Ajuste del alcance y la nomenclatura del blanco fortificado	Jairo Novoa <i>Analista Lab.</i>	Karen Mendoza <i>Prof. Calidad CCA</i>	Juan Trujillo <i>Director de CCA</i>