

I-069 – VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ROBUSTO ELL-CG-EM PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS HALOACÉTICOS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Elton Santos Franco⁽¹⁾

Engenheiro Ambiental pela Universidade Federal de Ouro Preto. Mestre em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Ouro Preto. Doutor em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela Universidade Federal de Minas Gerais.

Júlia Araújo Camargo⁽²⁾

Bacharela em Ciência e Tecnologia pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – campus Mucuri. Graduanda em Engenharia Civil pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – campus Mucuri.

Valter Lucio de Pádua⁽³⁾

Engenheiro Civil pela Universidade Federal de Minas Gerais. Mestre e Doutor em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo.

Jairo Lisboa Rodrigues⁽⁴⁾

Farmacêutico pela Universidade Federal de Alfenas. Doutor em Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP).

Paulo Henrique Gomes Silva⁽⁵⁾

Graduando em Ciência e Tecnologia pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

Endereço⁽¹⁾: Rua Cruzeiro, 1 – Jardim São Paulo – Teófilo Otoni – MG – CEP: 39803-371 – Brasil – Tel: (33) 3529-2700 – e-mail: elton.santos@ufvjm.edu.br

RESUMO

O cloro é o principal oxidante utilizado nas estações de tratamento de água (ETAs) brasileiras, devido ao seu baixo custo, fácil manuseio, residual persistente e por apresentar inúmeros benefícios no controle de patógenos. Entretanto, estudos mostram que o uso do mesmo pode contribuir para a formação de subprodutos orgânicos halogenados (SOHs) indesejados, como os ácidos haloacéticos (AHAs), os quais são considerados como a segunda classe de SOHs com maior ocorrência em águas de abastecimento. Na literatura, há relatos que relacionam as espécies de AHAs com doenças como o câncer e problemas na gestação, além de efeitos toxicológicos e presença de tumores no fígado, rins e intestino em cobaias. Nesse contexto, é importante a validação de um método analítico que possibilite a detecção e quantificação desses compostos, visto que formam um grupo de substâncias de interesse para gerenciadores das estações de tratamento de água, vigilância da qualidade da água e comunidade científica.

Desse modo, o presente trabalho consiste na validação analítica de um método de quantificação de AHAs por extração líquido-líquido (ELL) com análises através de um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM), como alternativa ao usual método de análise por detecção de captura eletrônica (DCE). A validação do método ELL-CG-EM foi possível e apresentou excelentes resultados, demonstrando que o detector EM pode ser usado como uma alternativa ao DCE na quantificação de AHAs, devido à alta resolução, sensibilidade e precisão nas mediadas de massas. Ainda, o método apresentou menor interferência na resposta de algumas espécies de AHAs devido ao uso do H₂SO₄ destilado.

PALAVRAS-CHAVE: Ácidos haloacéticos, Validação de Método Analítico, Extração Líquido-Líquido, Cromatografia gasosa, Espectrometria de Massas.

INTRODUÇÃO

No Brasil, as águas destinadas ao consumo humano devem estar de acordo com determinadas características físicas, químicas, biológicas e radiológicas para que possa atender ao padrão de potabilidade estabelecido pela Portaria da Consolidação nº 5 de 28 de setembro de 2017, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Além disso, a água precisa também ser submetida a processos de desinfecção para a inativação de microrganismos patogênicos. O produto usado no processo de desinfecção é escolhido com base em diversos fatores, como a

quantidade necessária de reagente, facilidade de operação, custo e segurança (LEÃO, 2008). O agente oxidante mais amplamente utilizado é o cloro, devido ao seu baixo custo, praticidade de aplicação, residual persistente e efetividade na inativação de microrganismos patogênicos quando comparado aos demais agentes oxidantes (FERREIRA FILHO; SAKAGUTI; 2008).

Apesar dos benefícios do uso do cloro, principalmente com relação ao controle de patógenos, estudos mostram que seu uso pode contribuir para a formação de subprodutos orgânicos halogenados (SOHs) indesejados, como os ácidos haloacéticos (AHAs), quando há presença de matéria orgânica na água (BUTIÃO, 2011; LIMA, 2014; CARDADOR; SALGUERO; GALLEGU, 2015). Os AHAs representam um dos SOHs que ocorrem mais frequentemente em águas de abastecimento. Tais compostos são derivados do ácido acético, onde os hidrogênios do grupo metilo podem ser substituídos por cloro e/ou bromo e iodo, ocasionando a formação de diferentes espécies: ácidos monocloraacético (MCAA), monobromoaacético (MBAA), dicloroaacético (DCAA), dibromoaacético (DBAA), tricloroaacético (TCAA), tribromoaacético (TBAA), bromocloroaacético (BCAA), dibromocloroaacético (DBCAA), bromodicloroaacético (BDCAA), cloroiodoaacético (CIAA), bromoiodoaacético (BIAA) e diiodoaacético (DIAA) (CARDADOR; SALGUERO; GALLEGU, 2015).

Os subprodutos em questão foram regulamentados pela primeira vez pela Portaria 2.914, com valor máximo permitido de 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$, o qual corresponde ao somatório dos ácidos monocloraacético (MCAA), monobromoaacético (MBAA), dicloroaacético (DCAA), tricloroaacético (TCAA), bromocloroaacético (BCAA), dibromoaacético (DBAA), bromodicloroaacético (BDCAA) e 2,2 – dicloropropiônico (DALAPON) (LIMA, 2014). Há estudos que indicam que tais compostos apresentam aspectos toxicológicos e, portanto, riscos à saúde humana quando presentes em águas destinadas ao consumo da população. Algumas espécies de AHAs têm sido associadas com doenças como câncer; efeitos nos rins, baço e fígado; e resultados adversos quando expostos durante a gravidez, como má formação embrionária, mutação, retardamento do crescimento, aborto espontâneo e defeitos cardíacos congênitos (USEPA, 1996; WHO, 2011; USEPA, 2012; LIU; MOU, 2004; PORTER *et al.*, 2005; BAYTAK *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2013; GRELLIER *et al.*, 2015).

Os SOHs, de modo geral, podem ser determinados pela técnica de cromatografia, e é recomendado uma etapa de pré-concentração por estarem em baixas concentrações. Ainda, tais subprodutos podem ser isolados da matriz aquosa por diversas técnicas, como extração líquido-líquido (ELL), *headspace* (HS) e *purge and trap* (P&T), seguidas pela determinação por cromatografia a gás por captura eletrônica (CG-DCE) ou cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) (USEPA, 1995a; USEPA, 1995b; NIKOLAOU *et al.*, 2002; CULEA; COZAR; RISTOIU, 2006; PEREIRA, 2007; PAVON *et al.*, 2008; SANCHEZ; CAPOTE; LUQUE DE CASTRO, 2008; LEITE, 2009; ALLARD *et al.*, 2012). No caso dos AHAs, por não serem voláteis, é necessário uma etapa prévia de derivatização (USEPA, 1995b; XIE *et al.*, 1998; XIE, 2001; XIE *et al.*, 2002; LIU; MOU, 2004; SCHUCK, 2004; SILVA, 2010).

O presente trabalho contém o desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos simples, sensíveis e com espaço de resposta mais curto, que são características essenciais para o monitoramento de AHAs, que foi recentemente incluído no padrão de potabilidade brasileiro. A validação do método de ELL e análises em CG-EM foi possível e apresentou resultados satisfatórios, com menor interferência em algumas espécies de AHAs, ótimas respostas nos parâmetros analisados, fazendo com que detector usado para as análises (EM) seja uma alternativa aos tradicionais DCE.

O desenvolvimento desse trabalho contou com apoio da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), da Fundação Nacional da Saúde (FUNASA) e da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG).

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a validação dos compostos, foi necessário observar alguns parâmetros essenciais, como a proporcionalidade entre a resposta da área de cada composto analisado e a concentração (curva de calibração e linearidade), limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, seletividade e exatidão (RIBANI *et al.*, 2004; ZANCHETTA; PENA; GONÇALVES., 2015; INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

A Portaria da Consolidação nº 5 estabelece que o somatório das concentrações de MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, BCAA, DBAA, BDCAA e DALAPON não deve ultrapassar $80 \mu\text{g.L}^{-1}$. Como não foi possível obter um padrão que envolvesse apenas os compostos determinados pela portaria vigente, fez-se a aquisição de um padrão contendo as nove espécies de AHAs em que os compostos de monitoramento obrigatório pudessem estar inseridos. Foram adquiridos padrões com certificados de pureza cromatográfica de AHAs (MCAA, MBAA, DCAA, DBAA, TCAA, TBAA, BCAA, DBCAA e BDCAA) (4-7787, TraceCERT®) e do padrão interno 1,2,3 – tricloropropano (47669-U, TraceCERT®), ambos diluídos em éter metil terc-butilico (MTBE, *methyl tert-butyl ether*) da marca Sigma. Para a ELL, foram adquiridos metanol (646377), MTBE (34875), também da Sigma, ácido sulfúrico destilado (obtido através do destilador sub-ferroso de quartzo Kurner – Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha, para aumento de pureza), Na_2SO_4 e CuSO_4 (agentes secantes da fase orgânica) e NaHCO_3 .

O método usado para determinação cromatográfica foi baseado nas recomendações da USEPA 552.2 (USEPA, 1995b) e 552.3 (USEPA, 2003). Foi necessário realizar uma etapa de derivatização para transformar os ácidos carboxílicos em ésteres, que é um procedimento efetuado por uma metilação ácida. Como as concentrações originais dos padrões obtidos são elevadas, diluições foram necessárias. Diluições em MTBE do padrão de AHAs ($200\text{--}2000 \mu\text{g.L}^{-1}$) foram realizadas nas seguintes concentrações: $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, TCAA e DBAA; $400 \mu\text{g.L}^{-1}$, MBAA, BCAA e BDCAA; $600 \mu\text{g.L}^{-1}$, MCAA e DCAA; $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$, DBCAA; $2000 \mu\text{g.L}^{-1}$, TBAA, assim como o padrão interno 1,2,3 – tricloropropano ($1000 \mu\text{g.L}^{-1}$).

Em balões volumétricos alongados, foram adicionadas alíquotas de 25 e 50 mL de água isenta de compostos orgânicos voláteis em concentrações diferentes, que variaram de $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ (referente às menores concentrações, TCAA e DBAA) a $2000 \mu\text{g.L}^{-1}$ (correspondente à maior concentração, TBAA) e, em seguida, foram realizadas a ELL e derivatização para a escolha da melhor sensibilidade e, também, identificação preliminar dos tempos de retenção livre de interferências dos compostos em relação ao volume da alíquota. Foi gerado o cromatograma modo TIC (*total ion current*, respostas correspondentes a todas as substâncias eluídas), com as respostas da sensibilidade (intensidade) das nove espécies de AHAs contidas no padrão e do 1,2,3 – tricloropropano, além de cada modo SIR (*selected ion recording*, construído a partir do TIC mas usando apenas fragmentos dos compostos de interesse) separadamente. Para minimizar possíveis interferências nas respostas de algumas espécies observadas nestas primeiras corridas cromatográficas, também relatados por Xie (2001), procedeu-se à destilação o H_2SO_4 .

Através de ensaios de sensibilidade, escolheu-se o volume de 50 mL para o processo de extração e derivatização, e posteriormente, elaboração da curva de calibração e procedimento de validação a partir dos melhores resultados apresentados. Desse modo, foram definidos seis ($p=6$, para curva de calibração) e oito ($p=8$, linearidade) pontos em concentrações distintas para cada espécie de AHA em triplicata ($n=3$):

- MCAA: 6, 12, 18, 24, 30, $45 \mu\text{g.L}^{-1}$; 240 e $300 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- MBAA: 4, 8, 12, 16, 20, $30 \mu\text{g.L}^{-1}$; 160 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- DCAA: 6, 12, 18, 24, 30, $45 \mu\text{g.L}^{-1}$; 240 e $300 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- TCAA: 2, 4, 6, 8, 10, $15 \mu\text{g.L}^{-1}$; 80 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- BCAA: 4, 8, 12, 16, 20, $30 \mu\text{g.L}^{-1}$; 160 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- DBAA: 2, 6, 8, 15, 40, $60 \mu\text{g.L}^{-1}$; 80 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- BDCAA: 4, 12, 16, 20, 80, $120 \mu\text{g.L}^{-1}$; 160 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- DBCAA: 10, 30, 40, 50, 200, $300 \mu\text{g.L}^{-1}$; 400 e $500 \mu\text{g.L}^{-1}$;
- TBAA: 20, 40, 60, 80, 100, $600 \mu\text{g.L}^{-1}$; e 800 e $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Assim, para a extração em cada concentração e do branco ($n=10$, sem adição de concentrações de AHAs), as alíquotas foram transferidas para os balões volumétricos alongados de 50 mL e logo após foram adicionados o volume de 500 μL do padrão interno 1,2,3 – tricloropropano (através da diluição do padrão para $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Posteriormente, a amostra foi acidificada com 1 mL de H_2SO_4 destilado e acrescentou-se 2 g de CuSO_4 , 16 g de Na_2SO_4 e 3,5 mL de MTBE (resfriado) para posterior agitação por 3 min para ser resfriado em geladeira a 4°C por 5 min para a separação de fases. Como esse procedimento ocasiona uma reação exotérmica, o resfriamento é muito importante para que não ocorra perdas dos compostos na amostra, conforme apresentado na Figura 1.



Figura 1: Separação de fases durante o procedimento de extração.

Para a etapa seguinte, derivatização, transferiu-se 2 mL da fase orgânica para um frasco âmbar de tampa rosqueável, no qual foi adicionado 1 mL de solução ácida de metanol 10% (utilizando-se H_2SO_4 destilado). Depois de fechado, o âmbar foi mantido sob aquecimento imerso em água a 50 °C por 2 h. Em seguida, foi resfriado e adicionou-se 4 mL de solução saturada de NaHCO_3 em incrementos de 1 mL e depois agitado durante 3 min, seguindo pelo mesmo tempo de repouso em *freezer*. O extrato obtido, conforme Figura 2, foi transferido para um frasco vial de 2 mL e armazenado em freezer a -4 °C (validade analítica de 14 dias), e um volume de 3,5 μL foi injetado no CG-EM. As informações obtidas foram usadas para levantamento dos parâmetros para validação do método.



Figura 2: Extrato obtido através da derivatização da amostra.

Para as análises dos compostos, utilizou-se um sistema CG-EM CLARUS 680 SQ 8PerkinElmer (USA) nas seguintes condições: volume de extrato injetado: 1,0 μL ; modo de injeção: splitless; temperatura do injetor: 280 °C; coluna capilar ZEBRON ZB - 5MS 30M x 0,25MM x 0,25 μM Fase G27 - 5% Polilarileno - 95% Polidimetilsiloxano; programação do forno: 30 °C por 8 min, com taxa de aquecimento de 2 °C.min⁻¹ até 35 °C, seguido de aquecimento de 5 °C.min⁻¹ até 90 °C; acompanhado de aquecimento de 20 °C.min⁻¹ até 200 °C; gás

de arraste usado foi Hélio, com grau de pureza 99,9995 % (Air Products); fluxo do gás de arraste: 1,2 mL.min⁻¹ (constante). Já o EM foi usado nas seguintes condições: tempo de corte do solvente: 2,7 min; velocidade de aquisição: 0,5 s.scan⁻¹; modo de ionização: Impacto eletrônico 70 eV; intervalo de leitura m/z: 50 a 260 u.m.a.; temperatura do trap: 210 °C; temperatura do Manifold: 70 °C; temperatura da linha de transferência: 250 °C.

RESULTADOS OBTIDOS

A otimização das condições de extração foram feitas com base nas metodologias de USEPA 552.2 (USEPA, 1995b), USEPA 552.3 (USEPA, 2003), Xie (2001), Xie *et al.*, (2002), Schuck (2004) e Silva (2010). Na literatura há relatos e interferências observadas nas etapas de extração e derivatização, principalmente para o MCAA e espécies bromadas, justificadas conforme Xie (2001), devido a reações químicas com impurezas em ambas etapas por metilação ácida. Desse modo, para evitá-las, realizou-se a destilação do H₂SO₄ para aumentar sua pureza durante o processo de validação. Após essa etapa foram realizados ensaios para determinar o volume da amostra para verificação da recuperação analítica e padronização do procedimento, através da intensidade do sinal. Assim, observou-se que 50 mL era o volume ideal pois obteve-se melhor resposta detectada pelo CG-EM que o volume de 25 mL.

Para a otimização das condições cromatográficas, foram realizadas seis extrações dos parâmetros iniciais da rampa da corrida cromatográfica do método para identificação da presença dos AHAs, tendo como referências valores monitorados por Xie (2001). Depois de identificar as massas (m/z), fez-se a otimização da rampa nos modos TIC e SIR para separação do MCAA, DCAA, TCAA, MBAA, DBAA, TBAA, DCAA, DBCAA e BDCAA, além do padrão interno 1,2,3 – tricloropropano. As Figuras 3 e 4 mostram o cromatograma nos modos TIC e SIR, respectivamente, inclusive do padrão interno, obtida por injeção a partir de uma extração na concentração variada de AHAs (80-800 µg.L⁻¹).

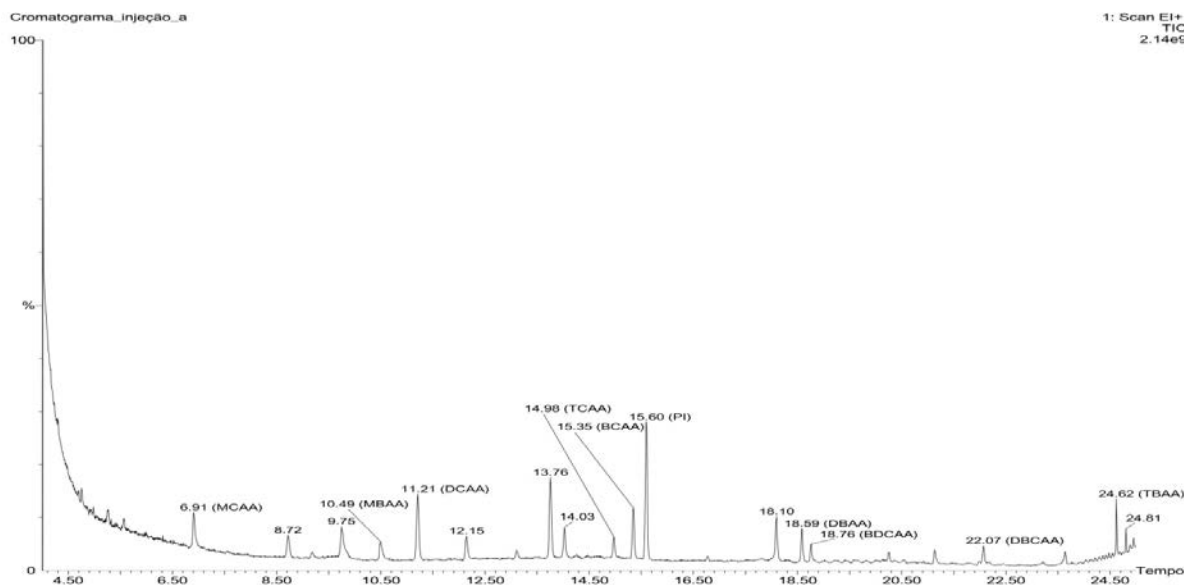


Figura 3: Cromatograma modo TIC da otimização da rampa dos AHAs, inclusive do padrão interno 1,2,3 – tricloropropano a partir da extração de um padrão na concentração 80-800 µg.L⁻¹.

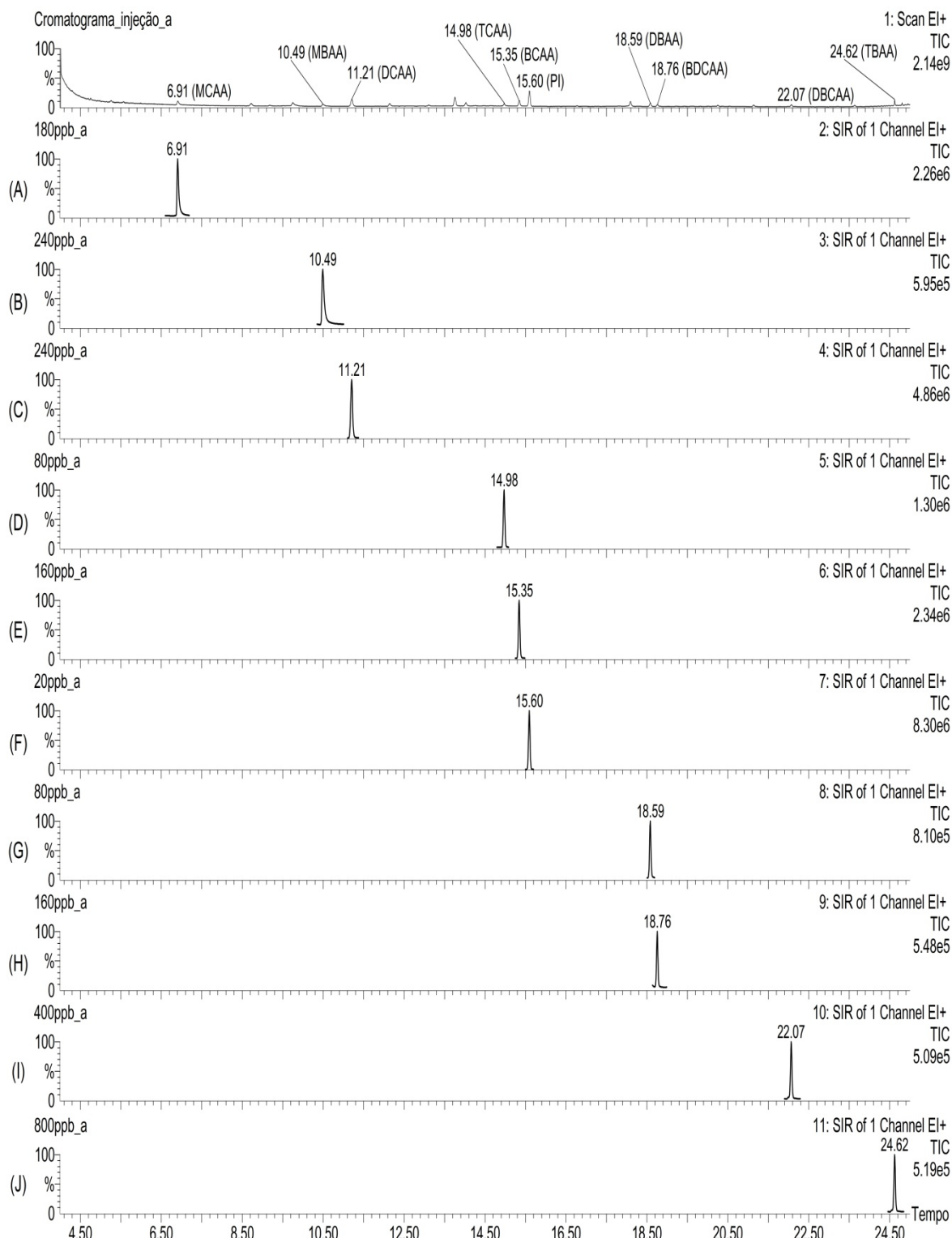


Figura 4: Cromatogramas modo TIC e SIR da otimização da rampa dos AHAs, inclusive o padrão interno 1,2,3 – tricloropropano, obtido por injeção a partir de uma extração na concentração 80-800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (A – SIR 2, MCAA; B – SIR 3, MBAA; C – SIR 4, DCAA; D – SIR 5, TCAA; E – SIR 6, BCAA; F – SIR 7, 1,2,3 – tricloropropano; G – SIR 8, DBAA; H – SIR 9, BDCAA; I – SIR 10, DBCAA; J – SIR 11, TBAA).

A sequência dos AHAs obtida na corrida cromatográfica, apresentada na Tabela 1, é justificada devido os compostos apresentarem características químicas diferentes. O MCAA foi o primeiro detectado por apresentar menor massa molar, por outro lado o TBAA foi o último pois apresenta maior massa molar que as demais espécies. Outras respostas observadas na corrida no modo TIC são provenientes das interações físicas com a composição da coluna, o que não influencia na sensibilidade do método.

Tabela 1: Tempo de retenção e íons monitorados (m/z) dos AHAs.

Ácido Haloacético	m/z	Tempo de retenção (min)
MCAA	59	6,91
DCAA	59	10,49
MBAA	59	11,21
TCAA	59	14,98
BCAA	59	15,35
1,2,3 - tricloropronano	75	15,60
DBAA	59	18,59
BDCAA	59	18,76
DBCAA	59	22,07
TBAA	59	24,62

As Tabelas 2 a 8 apresentam os valores dos parâmetros de validação, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão obtidos para a curva analítica.

Tabela 2: Regressões lineares das espécies MCAA, MBAA e DCAA obtidas pelas curvas de calibração.

Regressão Linear	MCAA	MBAA	DCAA
Curva de calibração	Equação $Y = -0,147 + 0,024 * X$	Equação $Y = -0,026 + 0,010 * X$	Equação $Y = -0,087 + 0,059 * X$
Curva de calibração Linearidade	Equação $Y = -0,142 + 0,024 * X$	Equação $Y = -0,026 + 0,010 * X$	Equação $Y = -0,087 + 0,059 * X$

Tabela 3: Regressões lineares das espécies TCAA, BCAA e DBAA obtidas pelas curvas de calibração.

Regressão Linear	TCAA	BCAA	DBAA
Curva de calibração	Equação $Y = -0,005 + 0,033 * X$	Equação $Y = -0,075 + 0,032 * X$	Equação $Y = -0,077 + 0,027 * X$
Curva de calibração Linearidade	Equação $Y = -0,005 + 0,033 * X$	Equação $Y = -0,132 + 0,036 * X$	Equação $Y = -0,077 + 0,027 * X$

Tabela 4: Regressões lineares das espécies BDCAA, DBCAA e TBAA obtidas pelas curvas de calibração.

Regressão Linear	BDCAA	DBCAA	TBAA
Curva de calibração	Equação $Y = -0,085 + 0,008 * X$	Equação $Y = -0,077 + 0,003 * X$	Equação $Y = -0,061 + 0,001 * X$
Curva de calibração Linearidade	Equação $Y = -0,085 + 0,009 * X$	Equação $Y = -0,077 + 0,003 * X$	Equação $Y = -0,061 + 0,001 * X$

Tabela 5: Coeficientes de correlação (R) obtidos para as curvas de calibração em concentrações diferentes de AHAs.

Espécie de AHA	Concentração AHAs ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	R	Concentração AHAs ($\mu\text{g.L}^{-1}$) (linearidade)	R
MCAA	6-45	0,9960	6-300	0,9986
MBAA	4-30	0,9904	4-200	0,9947
DCAA	6-45	0,9947	6-300	0,9997
TCAA	2-15	0,9944	2-100	0,9994
BCAA	4-30	0,9976	4-200	0,9998
DBAA	2-60	0,9944	2-100	0,9923
BDCAA	12-120	0,9942	12-200	0,9928
DBCAA	10-300	0,9901	10-500	0,9946
TBAA	20-600	0,9908	20-1000	0,9908

Tabela 6: Limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) obtidos para cada espécie de AHA.

Espécie de AHA	LD ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
MCAA	0,52	1,58
MBAA	0,08	0,24
DCAA	0,02	0,06
TCAA	0,04	0,14
BCAA	0,01	0,01
DBAA	0,13	0,43
BDCAA	0,11	0,32
DBCAA	0,57	1,93
TBAA	2,36	2,94

Tabela 7: Precisão intermediária e repetitiva para baixa, média e alta concentração de AHAs.

Espécie de AHA	Precisão	Intermediária	Repetitividade
		DPR (%)	DPR (%)
MCAA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	12	4,84	0,83
	18	3,00	1,02
	24	4,82	3,49
MBAA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	8	8,00	7,07
	12	15,94	1,34
	16	11,46	1,84
DCAA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	12	10,23	1,49
	18	18,39	0,10
	24	19,07	1,07
TCAA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	4	19,06	0,01
	6	9,66	0,87
	10	10,71	1,00
BCAA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	8	2,44	2,27
	12	2,39	0,70
	20	5,41	1,81
DBAA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	6	10,46	3,05
	8	10,44	2,34
	40	10,32	2,68
BDCAA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	12	6,87	1,73
	16	2,46	2,92
	20	6,55	2,93
DBCAA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	30	7,38	1,81
	50	7,02	3,19
	200	4,55	7,31
TBAA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	60	9,01	1,85
	80	11,46	3,80
	600	3,02	0,56

Tabela 8: Exatidão e recuperação para baixa, média e alta concentração de AHAs.

Espécie de AHA	Concentração (µg.L ⁻¹)	Média aferida (µg.L ⁻¹)	DPR (%)	Recuperação (%)
MCAA	12	11,34	0,83	94,47
	18	16,82	3,00	90,57
	24	24,34	1,02	101,40
MBAA	8	7,31	7,07	91,37
	12	11,11	1,34	92,56
	16	14,36	1,84	88,85
DCAA	12	12,11	1,49	100,93
	18	18,20	0,10	101,12
	24	22,46	1,07	93,60
TCAA	2	1,67	0,96	83,70
	8	6,27	0,87	104,55
	15	14,69	0,12	97,92
BCAA	4	4,16	3,69	103,99
	12	12,13	0,70	101,06
	20	20,83	1,81	104,14
DBAA	6	6,79	3,05	113,22
	8	7,39	2,34	92,33
	40	39,22	2,68	98,05
BDCAA	12	12,40	1,73	103,30
	16	13,76	2,92	86,00
	20	16,28	2,93	81,39
DBCAA	30	29,57	1,81	99,48
	50	40,51	3,19	81,02
	200	181,33	7,31	90,67
TBAA	60	58,24	1,85	97,06
	80	63,77	3,80	79,71
	600	574,62	5,24	95,77

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

Após a otimização da rampa nos modos TIC e SIR, construiu-se a curva de calibração analítica a partir das concentrações mencionadas na metodologia ($p=6$ e $n=3$). Através dos resultados obtidos, determinou-se as regressões lineares ($Y = aX \pm b$), onde Y é a área do pico obtida, descrito como sensibilidade ou intensidade, e X é a concentração de cada espécie de AHA no CG-EM. As regressões de cada espécie são apresentadas nas Tabelas 2 a 4.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 5, pode-se observar uma similaridade entre os valores obtidos para as faixas de concentrações determinadas, com respostas lineares e correlações superiores que são preconizadas pelo Ribani *et al.* (2004), INMETRO (2016) e ANVISA (2017). Observou-se também uma excelente linearidade em todas as espécies ($p=8$ e $n=3$), com correlações superiores às sugeridas pelas agências e autor mencionados.

Os LD e LQ foram obtidos através do método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2016; ANVISA, 2017). O LD ($n=10$) foi calculado através da relação de 3,3 vezes do desvio

padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da curva analítica. Já o LQ ($n=10$) foi calculado pela relação de dez vezes do desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da curva analítica de calibração, para cada espécie de AHA. Os resultados obtidos para ambos parâmetros são apresentados na Tabela 6, e como pode ser observado, o método se mostrou capaz para detectar e quantificar baixas concentrações em todos os compostos.

A precisão foi obtida através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR) em níveis como repetitividade e intermediária em três concentrações ($p=3$): 12, 18 e 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para MCAA; 8, 12 e 16 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para MBAA; 12, 18 e 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para DCAA; 4, 6 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para TCAA; 8, 12 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para BCAA; 6, 8 e 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para o DBAA; 12, 16 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para BDCAA; 30, 50 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para DBCAA; 60, 80 e 600 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para TBAA. A repetitividade foi avaliada por injeções em um mesmo dia ($n=3$) e a intermediária, por injeções em dias diferentes ($n=5$). Através dos resultados apresentados na Tabela 7, pode-se observar que todos RSDs foram abaixo de 20%, estando dentro do limite aceitável (20%) (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

Os valores das médias e DPRs de cinco brancos em três repetições cada ($p=5$ e $n=3$) foram comparados com os valores encontrados de LQ. A maior média obtida foi para o TCAA (24,5%) e os DPRs abaixo de 13%, valores menores, respectivamente, 33% e 15% em relação ao valor de LQ obtido pelo método. Ainda, avaliou-se a possível interferência nos tempos de retenção comparando a matriz da substância (padrão) com adição do composto 17 β -Estradiol-D5. Os resultados obtidos não mostraram interferências no tempo de retenção dos AHAs, como pode ser observado na Figura 5, e manteve-se a característica de estar bem separada durante o cromatograma, conforme Figura 6 (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

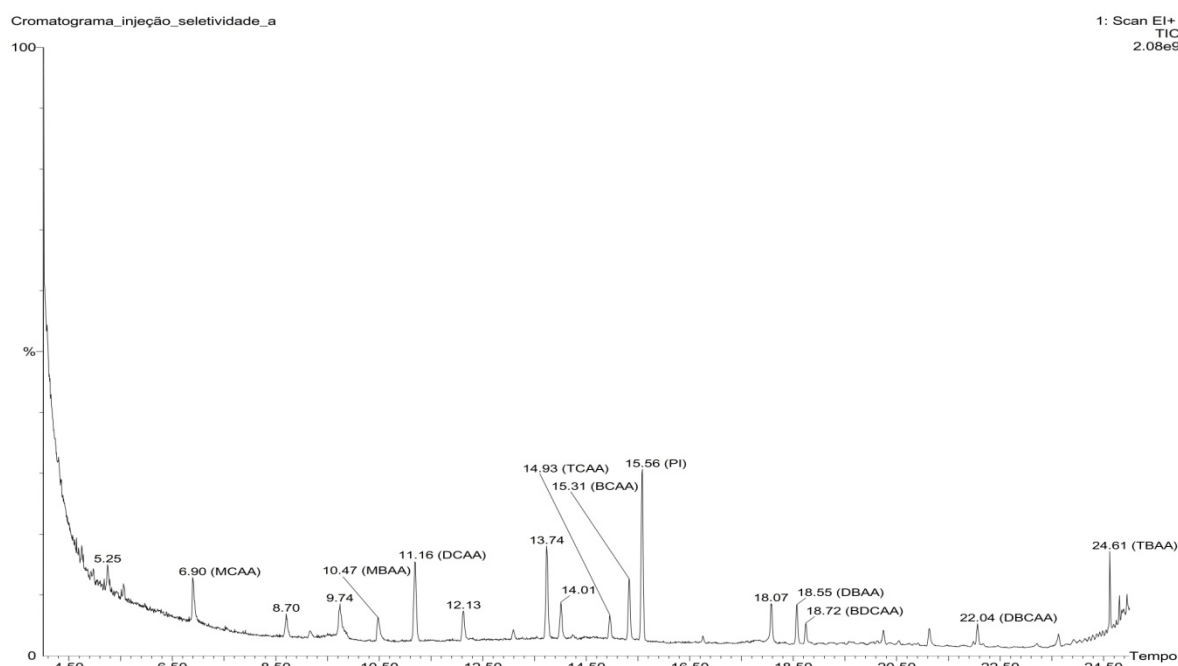


Figura 5: Cromatograma modo TIC resultante do teste de seletividade do método analítico proposto de AHAs, inclusive do padrão interno 1,2,3 – tricloropropano, advindo de injeção da extração de um padrão na concentração 80-800 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

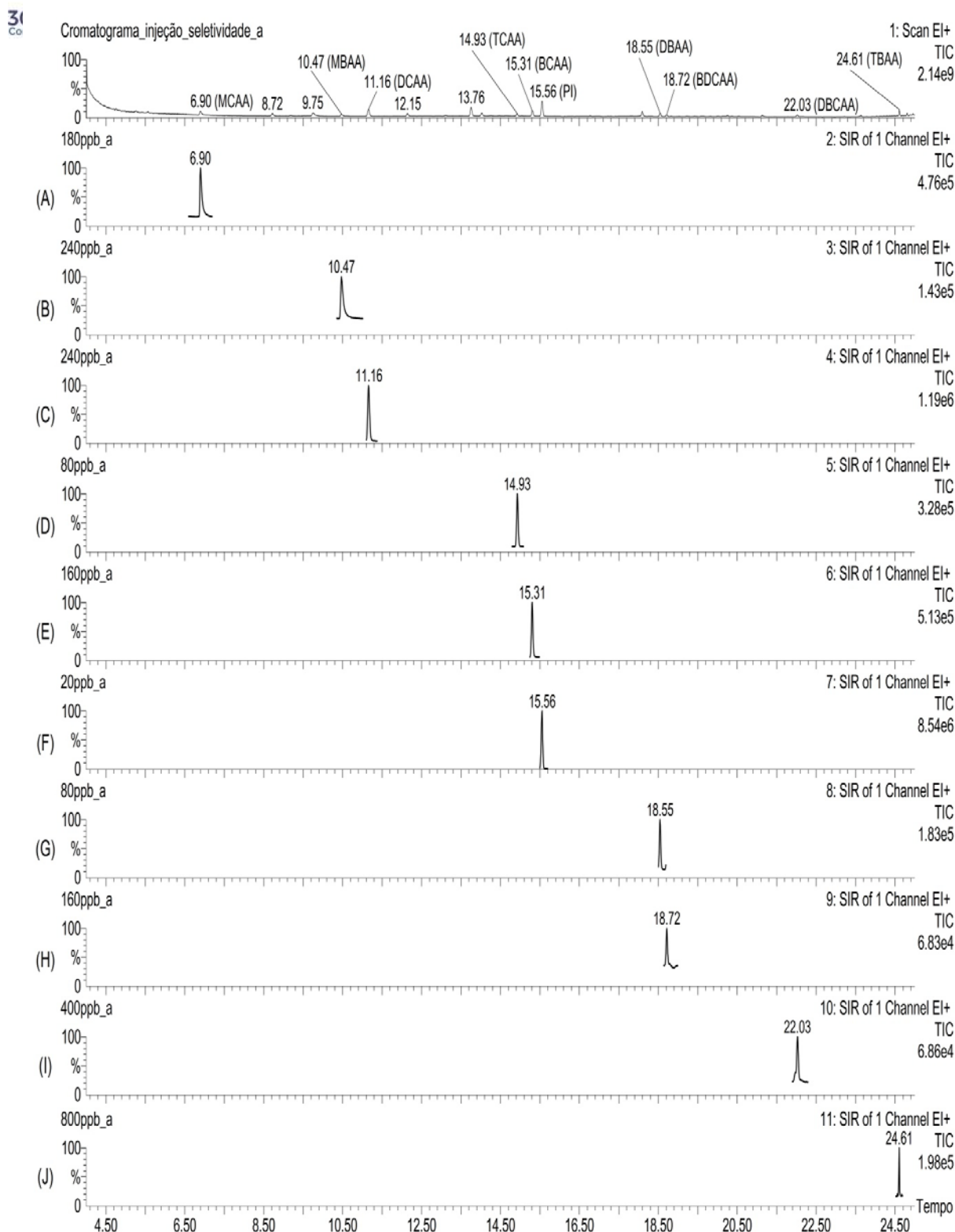


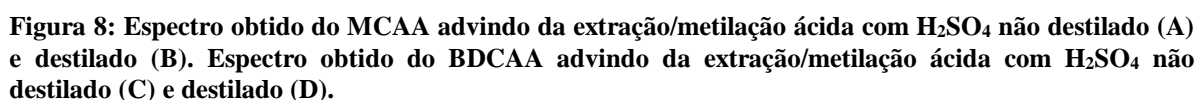
Figura 6: Cromatograma modo TIC e SIR obtido do teste de seletividade do método analítico proposto de AHAs, inclusive do padrão interno 1,2,3 – tricloropropano, obtido por injeção a partir de uma extração na concentração 80-800 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (A – SIR 2, MCAA; B – SIR 3, MBAA; C – SIR4, DCAA; D – SIR 5, TCAA; E – SIR 6, BCAA; F – SIR 6, 1,2,3 – tricloropropano; G – SIR 8, DBAA; H – SIR 9, BDCAA; I – SIR 10, DBCAA; J – SIR 2, TBAA).

Os valores de recuperação foram obtidos em três concentrações ($p=3$ e $n=3$): 12, 18 e 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para MCAA; 8, 12 e 16 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para MBAA; 12, 18 e 24 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para DCAA; 2, 8 e 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para TCAA; 4, 12 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para BCAA; 6, 8 e 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para DBAA; 12, 16 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para BDCAA; 30, 50 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para DBCAA; 60, 80 e 600 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para TBAA; sendo que os resultados variaram de 79,71 a 113,22%. Para análise de resíduos geralmente os intervalos de recuperação estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Através da curva de calibração ($p=6$ e $n=3$) de cada espécie de AHA, foi possível estimar os resultados esperados em função da resposta das injeções nas concentrações sugeridas, com valores próximos aos de interesse. Os DPRs calculados foram satisfatórios, ou seja, menor que 8%. É importante ressaltar que foram utilizados materiais de referência certificados para garantia da qualidade do processo de validação analítica (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2016; ANVISA, 2017).

A técnica de ELL, a derivatização por metilação ácida e a análise por CG-DCE para as nove espécies de AHAs foram, desde de sua publicação pela USEPA no método 552.2 (USEPA, 1995b), amplamente adotadas por diversos laboratórios. O estudo de Xie *et al.* (1998), que teve como base o método supracitado, consiste no desenvolvimento de métodos analíticos para algumas espécies de AHAs em água potável utilizando-se a ELL e derivatização por metilação ácida, seguidas por detecção em CG-DCE. Dentre as espécies de AHAs analisadas no método USEPA, os autores incluíram em seu método apenas MCAA, MBAA, DCAA, DBAA e TCAA. Como resultado, os autores obtiveram um valor de LD entre 0,07 e 0,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para os compostos analisados, exceto para o MCAA pois o mesmo não apresentou um pico atribuível. Os valores de recuperação variaram entre 109 e 118%; tais resultados foram obtidos através de análises de amostras das espécies nas concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Comparando-se os resultados obtidos de LD e as recuperações com os valores relatados, para os parâmetros, no método 6251B (APHA, 2012), os autores mostraram que, exceto para o MCAA, ambos os métodos eram compatíveis.

O estudo de Xie (2001), que utilizou CG-EM com adaptações do método USEPA 552.2 (USEPA, 1995b), também apresenta a metilação ácida como uma etapa importante para a detecção de AHAs. Assim como no DCE, o autor observou baixa eficiência do método para ácidos tri-haloacéticos bromados, entretanto não foram observadas interferências em respostas do MCAA.

Comparando com este estudo, não foram observadas interferências na resposta do MCAA nem baixa eficiência nos ácidos tri-haloacéticos bromados durante a metilação ácida. Os resultados obtidos podem ser devido ao uso do H_2SO_4 destilado, que provavelmente elevou a eficiência da metilação e/ou redução da descarboxilação, minimizando a interferência na matriz. Com base nas informações levantadas neste estudo e com os cromatogramas obtidos com o uso do H_2SO_4 não destilado, apresentado na Figura 7, pode-se observar menores interferências de outros íons (m/z) nos espectros do MCAA e tri-haloacéticos bromados, conforme Figuras 8 e 9, respectivamente.



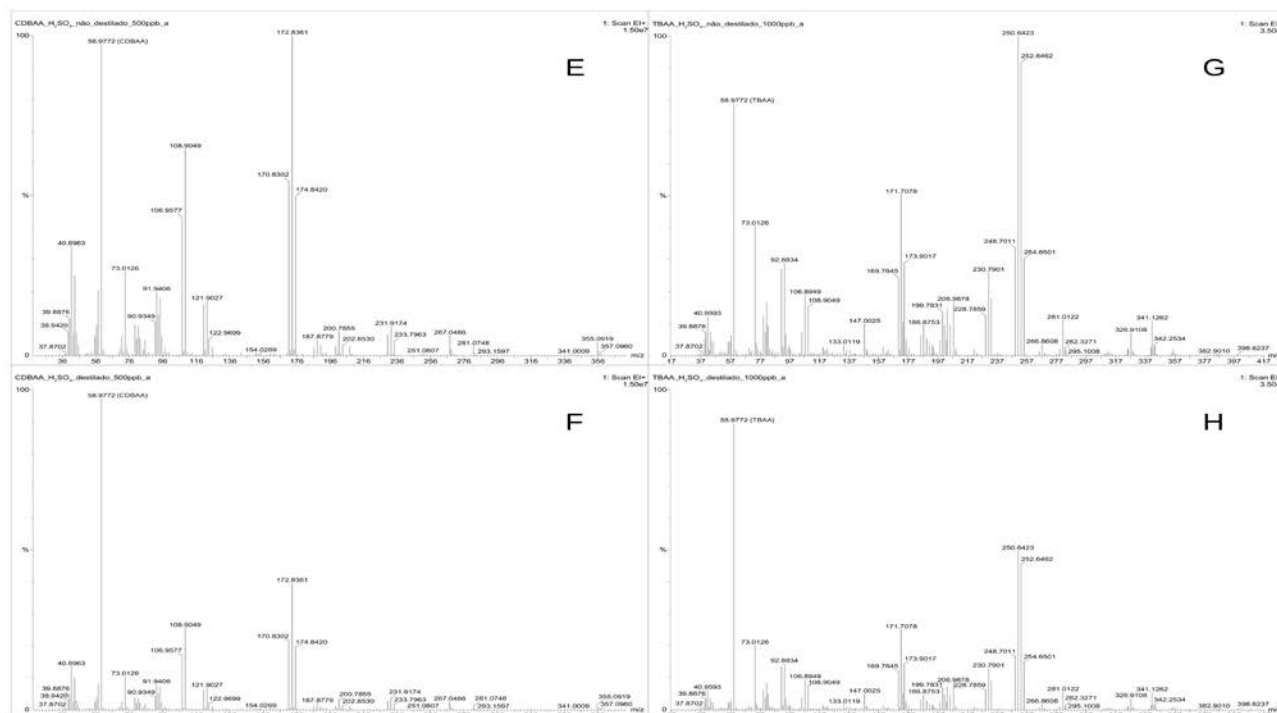


Figura 9: Espectro obtido do DBCAA advindo por extração/metilação ácida com H_2SO_4 não destilado (E) e destilado (F). Espectro obtido do TBAA advindo por extração/metilação ácida com H_2SO_4 não destilado (G) e destilado (H).

Ainda, vale ressaltar a importância do método desenvolvido neste estudo nos parâmetros abordados quando comparada com demais trabalhos da literatura brasileira. Esta também aborda a mensuração de AHAs tanto no DCE quanto no EM, de modo que foi validado um método para as nove espécies mais recorrentes em águas de abastecimento cloradas com tempo de corrida cromatográfica (25,5 min) similar ao DCE. Com relação aos estudos internacionais que abrangem o EM, menores tempos referentes à corridas cromatográficas, quando comparados ao estudo de Xie (2001), aproximadamente 50 min. Além disso, ao aplicar os mesmos parâmetros do autos, foi observado cromatogramas com alto grau de interferência, o que prejudica a sensibilidade do método.

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

A validação dos AHAs através do método ELL-CG-EM foi possível, com menor interferência de outras respostas no MCAA, BDCAA, DBCAA e TBAA, o que pode ser justificado pelo uso do H_2SO_4 destilado, que influenciou positivamente na metilação ácida;

O detector EM se mostrou uma alternativa ao tradicional DCE, recomendado pela USEPA para quantificação de AHAs, devido à alta resolução, sensibilidade e precisão nas medidas de massas;

O método obteve ótimas respostas nos principais parâmetros de validação: curva de calibração, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, recuperação e seletividade. Tais respostas viabilizaram a quantificação de AHAs.

AGRADECIMENTO

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), as bolsas de iniciação científica vinculadas à pesquisa; e à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha (UFVJM), todo apoio estrutural para o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLARD S., CHARROIS J.W., JOLL C.A., HEITZ A. Simultaneous analysis of 10 trihalomethanes at nanogram per liter levels in water using solid-phase microextraction and gas chromatography mass-spectrometry. *Journal of Chromatography A*. v. 18, p. 15-21, 2012.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA); WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (WEF). Standard methods for the examination of water and wastewater. 22. ed. Washington, D.C.: Ed. APHA; AWWA; WEF, 2012, 1496 p.
3. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 166, de 24 de julho de 2017*. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Ministério da Saúde, Brasília, 2017.
4. BAYTAK, D.; SOFUOGLU, A.; INAL, F.; SOFUOGLU, S. C. Seasonal variation in drinking water concentrations of disinfection by products in IZMIR and associated human health risks. *Science of the Total Environment*. v. 407, p. 288-296, 2008.
5. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 3 out. 2017.
6. BUTIÃO, D. F. *Formação de subprodutos orgânicos halogenados da desinfecção em águas de piscinas*. 2011. 78 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental). Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.
7. CARDADOR, M. J. SALGUERO, J. F. GALLEGU, M. Simultaneous quantification of trihalomethanes and haloacetic acids in cheese by on-line static headspace gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1408, p. 22-29, 2015.
8. CULEA, M., COZAR, O., RISTOIU, D. Methods validation for the determination of trihalomethanes in drinking water. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 41, n. 12, p. 1594-1597, 2006.
9. FERREIRA FILHO, S. S.; SAKAGUTI, M. Comportamento cinético do cloro livre em meio aquoso e formação de subprodutos das desinfecção. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro, v. 3, n. 2, p.198-206. 2008.
10. GRELLIER, J. RUSHTON, L. BRIGGS, D.J. NIEUWENHUIJSEN, M.J. Assessing the human health impacts of exposure to disinfection by-products – a critical review of concepts and methods. *Environment International*. v. 78, p. 61–81, 2015.
11. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO) - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos analíticos: Documento de caráter orientativo (DOQ-CGCRE-008). Revisão nº 5. Agosto de 2016. 31p.
12. LEÃO, V. G. **Água Tratada: Formação de Trihalometanos pelo uso de cloro e os riscos potenciais à saúde pública em cidades da mesorregião do leste rondoniense**. 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
13. LEE, J.; KIM, E.; ROH, B.; EOM, S.; ZOH, K Occurrence of disinfection by-products in tap water distribution systems and their associated health risk. *Environ Monit Assess*, v. 185, p. 7675-7691, 2013.
14. LEITE, R. W. *Validação de um método de extração gás-líquido "headspace" acoplado a um CG-EM para determinação de THM em água potável da região de Maringá*. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.
15. LIMA, G. M. *Desenvolvimento de correlação da formação de ácidos haloacéticos em água contendo substância húmica oxidada com cloro*. 2014. 109f. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Tecnologia Ambiental) – Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnologias da Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2014.

16. LIU, Y.; MOU, S. *Determination of trace-levels of haloacetic acids in drinking by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, v. 1039, p. 89 – 95, 2004.
17. NIKOLAOU, A. D. LEKKAS, T. D. GOLFINOPOULOS, S. K. KOSTOPOULOU M. N. Application of different analytical methods for determination of volatile chlorination by-products in drinking water. *Talanta*, v. 56, p. 717-726, 2002.
18. PAVON, J. L. P., MARTIN, S. H., PINTO, C. G. CORDERO, B. M. Determination of trihalomethanes in water samples: a review. *Analytica Chimica Acta*, v. 629, n. 1-2, p. 6-23, 2008.
19. PEREIRA, D. D. C. F. *Detecção de subprodutos da desinfecção com cloro em água dessalinizada*. 2007. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 2007.
20. PORTER, C. K.; PUTNAM, S. D.; HUNTING, K. L.; RIDDLE, M. R. The effect of trihalomethane and haloacetic acid exposure on fetal growth in a maryland county. *American Journal of Epidemiology*, v. 162, n. 4, p. 334 – 344, 2005.
21. RIBANI, M. BOTTOLI, C.B.G. COLLINS, C.H. JARDIN, I.C.S.F. MELO. L.F.C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
22. SANCHEZ, B. A; CAPOTE, F. P; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasonic enhancement of leaching and in situ derivatization of haloacetic acids in vegetable foods prior to gas chromatography–electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1201, v. 1, p. 21–26, 2008.
23. SCHUCK, C. A. *Ocorrência de Trihalometanos e Ácidos Haloacéticos na desinfecção de efluentes tratados biologicamente*. 2004. 98 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
24. SILVA, C. P. da. *Determinação de ácidos haloacéticos em Água utilizando técnicas cromatográficas*. 2010, 78 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.
25. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Drinking Water Regulations and Health Advisories*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, 1996. 30 p.
26. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2012. 20 p.
27. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Method 551.1. Determination of chlorination disinfection byproducts, chlorinated solvents, and halogenated pesticides/herbicides in drinking water by liquid-liquid extracion and gas chromatography with electron-capture detection*. U.S. Environmental Protection Agency, Ohio, USA, 1995(a).61 p.
28. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Method 552.2. Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, Ohio, USA, 1995(b).32 p.
29. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Method 552.3 - Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid microextraction, derivatization, and gas chromatography with electron capture detection*. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2003. 55 p.
30. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Guidelines for drinking-water quality – 4th ed* 2011, 564 p.
31. XIE Y., Reckhow D. A. and Springborg D. C. Analyzing HAAs and ketoacids without diazomethane. *Journal American Water Works Association*. v. 90, n. 4, p. 131–138, 1998.
32. XIE. Y. Analyzing Haloacetic Acids Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Water Research*, v. 35, n. 6, p. 1599–1602, 2001.
33. XIE. Y., RASHID, I., ZHOU, H. J, GAMMIE, L. Acidic methanol methylation for HAA analysis: Limitations and possible solutions. *Journal American Water Works Association*., v. 94, p. 115-122, 2002.
34. ZANCHETTA, P. G., PENA, A.; GONÇALVES, R. F. Desenvolvimento e validação de método para quantificação simultânea de ofloxacina, norfloxacina e ciprofloxacina em urina humana. *Revista Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 20, n. 2, p. 307-314, 2015.