FURG						
Dissertação de Mestrado						
ESTUDO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS HALOACÉTICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS						
Andrea Carolina Begambre Berrio						
PPGQTA						
Rio Grande, RS - Brasil 2021						

ESTUDO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS HALOACÉTICOS (AHAs) EM AMOSTRAS DE ÁGUAS

por

ANDREA CAROLINA BEGAMBRE BERRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA Rio Grande, RS - Brasil 2021

Ficha Catalográfica

B533e	Berrio, Andrea Carolina Begambre. Estudo de métodos para determinação de ácidos haloacéticos em amostras de águas / Andrea Carolina Begambre Berrio. – 2021. 129 f.				
	Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental, Rio Grande/RS, 2021. Orientador: Dr. Ednei Gilberto Primel. Coorientadora: Dra. Sergiane Caldas Barbosa.				
	1. Ácidos haloacéticos 2. Injeção direta 3. HILIC 4. LC-MS/MS I. Primel, Ednei Gilberto II. Barbosa, Sergiane Caldas III. Título.				
	CDU 54:628.16				
Catalona	ção na Fonte: Bibliotecária Vanessa Ceiglinski Nunes CRB 10/217/				

Catalogação na Fonte: Bibliotecária Vanessa Ceiglinski Nunes CRB 4

Universidade Federal do Rio Grande - FURG Escola de Química e Alimentos Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

ESTUDO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS HALOACÉTICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS

Elaborado por

Andrea Carolina Begambre Berrio

Como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química Tecnológica e Ambiental

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel (FURG) (Presidente-Orientador)

lande jozzali Aved & Sile

Prof^a. Dr^a. Carla Grazieli Azevedo da Silva (UFMT)



Prof. Dr. Manoel Leonardo Martins (FURG)

Sergiane Caldas Barlosa

Dr^a. Sergiane Caldas Barbosa (FURG)

Rio Grande, 26 de março de 2021.

DEDICATORIA

Aos meus familiares e amigos que perderam a batalha pela Covid 19.

"Esta é minha ordem: Seja forte e corajoso! Não tenha medo nem desanime, pois Deus estará com você por onde você andar" Josué 1:9 (NVI) Agradeço primeiramente a **Deus** por me dar força e sabedoria para seguir em frente, ainda no meio da atual pandemia.

Agradeço ao programa **PAEC-OEA-GCUB**, pela contribuição e fortalecimento na formação de estudantes da América Latina.

A **Universidade Federal do Rio Grande**, por contribuir com o meu aprendizado e formação nesta etapa da minha vida.

Ao **Prof. Dr. Ednei G. Primel**. pela oportunidade que me foi dada de trabalhar no grupo, ainda sem me conhecer, sendo um grande incentivador pessoal e profissional. Também por sua orientação, apoio e confiança desde que cheguei ao Brasil.

Aos professores doutores **Andrés Perez Parada** e **Manoel Leonardo Martins**, pela disposição em participar como banca de qualificação, contribuindo com valiosas sugestões que foram importantes para aprimoramento deste trabalho.

Aos professores e doutores **Carla Grazieli da Silva**, **Manoel Leonardo Martins** e **Sergiane Caldas Barbosa**, pela disposição em participar na defesa de Mestrado, contribuições para melhorar este trabalho e compartilhamento de seus conhecimentos.

Aos meus pais, **Edenia** e **Nacor**, a quem eu dedico este trabalho. Obrigada por todos os valores e princípios que me ensinaram. Amo vocês, e eu sou quem eu sou, por vocês.

Ao meu irmão **Emiro**, por todo apoio sempre. Você é a pessoa para quem sempre me dedico e trato de ensinar o melhor de mim. Eu te amo. A minha querida irmã **Carmensita**, por todo apoio e confiança.

A meus bons amigos que me acompanham sempre e apoiam meus projetos, caminhadas e sonhos, ainda quando sai do país e deixei de vê-los: **Ana, Carlos, Liz, Kelly, Mau, Jose**. Muito obrigada.

Ao meu amigo **Mane**, pela amizade, incentivo, contribuições e discussões que me ajudaram a concluir esta etapa.

À Dra., técnica do LACOM e amiga **Sergiane Caldas Barbosa**, que me recebeu muito bem no laboratório, pela disposição e atitude positiva para me ajudar

no desenvolvimento deste trabalho, e pelo apoio incondicional que sempre me foi brindado abrindo as portas de sua casa e seu coração para me auxiliar. Muito obrigada **Sergie**, pelo carinho e pela oportunidade de conhecer a sua família gentil (**Rafa** e **Marcio**).

Ao **Jean Lucas**, por sua disposição, contribuição e desenvolvimento deste trabalho.

À **Carol**, pela amizade, momentos de estudos, aprendizagem e também de sorrisos ao longo desta experiência maravilhosa. Muito obrigada pela parceria.

Aos meus queridos colegas do LACOM, que sempre me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho, compartilharam seus conhecimentos e hoje eu levo amizades verdadeiras em meu coração. Carol, Lucas, Juliane, Marília e Duane. A todos com os quais convivi e contribuíram de diversas formas, para meu crescimento pessoal e profissional, sou muito grata de conhece-los. Prof. Ednei, Sergie, Prof. Bruno, Dra Larine, Lucas, Juliane, Marilia, Maiara, Natiele, Carol, Duane, Larissa, Luane, Jonatas, Paula, Paloma, Helena, Sandra, Lucas M e Pedro. Agradeço também alguns colegas que já não estão no LACOM, mas fizeram parte na minha chegada ao Brasil. Marisa e Karina, obrigada.

Aos meus colegas e amigos da turma OEA 2018-2019, pelo carinho, parceria e descontração. Meus queridos: Lissette, Pao, Ele, Lenin, William, Maribel, Corina, Raif, Gaby, Marioxis e Alejandra. Aos meus amigos Fernando e Gian, especialmente ao Carlitos, que foi a grande amizade que encontrei nesta caminhada. Muito obrigada por tudo.

Aos meus colegas do PPGQTA, que de uma ou outra forma contribuíram em momentos de descontração e amizade. Especialmente à **Eliza, Marinalva e Alessandra.**

À **Rosane,** secretaria do PPGQTA que me recebeu na minha chegada a FURG, e **Murilo,** secretário atual do PPGQTA, por todos os esclarecimentos, disposição e atenção quando necessário.

A todos os órgãos de fomento **CAPES, CNPq, FAPERG, FINEP**, pelo auxílio financeiro.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química Tecnológica Ambiental, os quais auxiliaram na minha formação acadêmica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas comuns em uma estação de tratamento de água convencional6
Figura 2: Porcentagem das classes de DBPs reportados em estudo de avaliação em
diferentes amostras de água desinfectadas9
Figura 3: Processo de formação dos AHAs10
Figura 4: Etapas da Extração em Fase Solida (SPE)17
Figura 5: Fluxograma representativo das etapas envolvidas nas condições da ID36
Figura 6: Fluxograma representativo das etapas envolvidas no estabelecimento das
condições das amostras aquosas por SPE
Figura 7: Extração do padrão usado na calibração por DSAC42
Figura 8: Mapa ilustrativo da distribuição dos pontos amostrais nas ETAs Corsan do
Rio Grande do Sul47
Figura 9: Área dos picos para os AHAs (1 mg L ⁻¹) na avaliação da temperatura de
fonte com temperatura de dessolvatação de 300 °C (A) e na temperatura do gás de
dessolvatação com temperatura de fonte de 120 °C (B). Letras a e b foram usadas
para indicar diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos
Figura 10: Cromatogramas no modo SRM para o mix AHAs na concentração de 1,0
mg L ⁻¹ nas condições ilustradas na Tabela 1158
Figura 11: Cromatograma no modo SRM para o mix AHAs na concentração de 1,0 mg
L ⁻¹ nas condições estabelecidas na Tabela 1260
Figura 12: Cromatograma no modo SRM para a mistura do mix AHAs na concentração
de 1,0 mg L ⁻¹ nas condições descritas para a coluna Luna HILIC
Figura 13: Gráfico de distribuição de espécies em função do pH para os AHAs65
Figura 14: Número de pontos por pico obtidos para os AHAs variando o dwell time.
Figura 15: Cromatogramas para os diferentes dwell times avaliados (MBAA m/z 136
Da)67
Figura 16: Espectro resultante da infusão do TCAA para uma concentração de 1 mg
L ⁻¹
Figura 17: Picos cromatográficos para TCAA na concentração de 1 mg L ⁻¹ usando a)
fase móvel mais fraca (MeCN: tampão formiato pH 4,1 (98:2, v/v)), e b) fase móvel
mais forte (MeCN: tampão formiato pH 4,1 (85:15, v/v)) na coluna HILIC, c) fase móvel
MeCN: tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v))69
Figura 18: Quantidade de analitos com recuperações entre 50 e 120% na avaliação
de diferentes cartuchos (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra
1,0, eluição com 2 mL de fase móvel (MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)).72
Figura 19: Recuperações obtidas para os AHAs na avaliação dos cartuchos utilizando
SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2
mL de fase móvel (MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)). As letras a e b foram
usadas para indicar diferenças estatisticamente significativas, usando o teste T-
Student

Figura 20: Efeito Matriz (EM) obtido para os AHAs na avaliação dos diferentes tipos de cartucho na SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de fase móvel (MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)).73 Figura 21: Quantidade de analitos com recuperações entre 50 e 120% na avaliação do solvente de eluição (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de cada solvente).75 Figura 22: Recuperações obtidas para os AHAs na avaliação do solvente de eluição da SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de cada solvente testado, cartucho: Strata TM-X). As letras a, b e c foram usadas para indicar diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, usando o teste ANOVA Tukey......76 Figura 23: Efeito Matriz (EM) obtido para os AHAs na avaliação do solvente de eluição na SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com Figura 24: Quantidade de analitos com recuperações entre 50 e 120% na avaliação do material adsorvente (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de MeCN; cartucho: Strata [™]-X)......78 Figura 25: Recuperações obtidas para os AHAs na avaliação do volume do solvente de eluição na SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com MeCN, cartucho: Strata [™]-X). As letras a, b e c foram usadas para indicar diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, usando o teste ANOVA Figura 26: Efeito Matriz (EM) obtido para os AHAs na avaliação do volume do solvente de eluição na SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, Figura 27: Esquema representativo do procedimento de SPE nas condições estabelecidas para extração dos AHAs.....80 Figura 28: Esquema representativo do procedimento de ID nas condições estabelecidas para extração dos AHAs.....81 Figura 29: EM obtido para os analitos utilizando a ID e SPE no preparo de amostras de água e determinação por LC-MS/MS......87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores máximos permitidos (µg L ⁻¹) para AHAs em diferentes países14 Tabela 2: Condições de extração para a determinação de AHAs empregando SPE no
preparo da amostra
Tabela 3: Diferentes métodos usados para a determinação de AHAs em diferentes tipos de amostras de águas, apresentados em ordem cronológica e agrupados por técnicas de preparo de amostra 24
Tabela 4 [.] Colunas analíticas testadas 34
Tabela 5: Cartuchos utilizados para a pré-concentração dos AHAs
Tabela 6: Detalhes de preparação das curvas analíticas no solvente (MeCN) e no extrato
Tabela 7: Detalhes de preparo de soluções de calibração analítica para o métodoDSAC proposto para determinação de AHAs em água por SPE e LC-MS/MS42Tabela 8. Descrição das amostras coletadas46
Tabela 9: Propriedades físico-químicas dos AHAs estudados: nomenclatura, fórmula molecular e estrutural, massa molecular, pKa, Log Kow e solubilidade
Tabela 10: Resultado da otimização das condições de determinações no MS para a
determinação dos AHAs (<i>Dwell time</i> de 0,1 s)54
Tabela 11: Condição de eluição empregada no modo gradiente usando a colunaKinetex C8
Tabela 12: Condição de eluição no modo gradiente usando a coluna Obelisc N59 Tabela 13: Composição das fases móveis testadas na otimização da separação dos AHAs por LC-MS/MS e as influencias nos tempos de retenção
Tabela 14: Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS para este trabalho. 70
Tabela 15: Curvas analíticas em amostras de água tratadas com ajuste de pH (pH ≈ 6,0) e com ajuste de pH (pH = 4,1) para análise por ID70
Tabela 16: Limites de quantificação instrumental (LOQ _i) em amostras de água com ajuste de pH (pH 4,1) e sem ajuste (pH \approx 6,0) para análise por ID, obtidos pela relação S/N no software MassLynx 4.1. Diferenças significativas avaliadas com o Test T- <i>Student</i>
Tabela 17: Curvas analíticas e coeficiente de correlação linear no solvente e nos extratos da ID e SPE e determinação por LC-MS/MS obtidos para avaliação da linearidade
Tabela 18: LODi e LOQi e LODm e LOQm obtidos pela relação S/N no softwareMassLynx 4.1

Tabela 20: Recuperação (%) e RSD (%) para avaliação da exatidão (n = 3) e	precisão
do método por SPE para as amostras de águas de abastecimento em te	ermos de
repetibilidade (n = 3) e precisão intermediária (n = 3)	86
Tabela 21: Comparação entre os métodos neste trabalho com os método	s oficiais
estabelecidos pela USEPA e outros métodos empregados para a determina	ação dos
AHAs em amostras de águas	91
Tabela 22: Propriedades físico-químicas das amostras analisadas	92
Tabela 23: AHAs encontrados em águas de abastecimento em diferentes lo	calidades
de Rio Grande do Sul, Brasil, coletadas em dezembro de 2020 e suas res	spectivas
concentrações médias (µg L ⁻¹) ± desvio padrão (%)	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AHAs - Ácidos haloacéticos

AF – Ácido fórmico

BCAA - Ácido Bromocloroacético, do inglês Bromochloroacetic Acid

CORSAN - Companhia Riograndense de Saneamento

DSAC - Calibração por diluição da adição de padrão, do inglês Dilution standard addition calibration

DBAA - Ácido Dibromoacético, do inglês Dibromoacetic Acid

DBCAA - Ácido Dibromocloroacético, do inglês Dibromochloroacetic Acid

DCAA - Ácido Dicloroacético, do inglês Dichloroacetic Acid

DCBAA - Ácido Diclorobromoacético, do inglês Dichlorobromoacetic Acid

DBPs - Subprodutos da desinfecção, do inglês Disinfection by-products

DLLME - Microextração Líquido-Líquido Dispersiva, do inglês *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*

EM - Efeito Matriz

ETAs - Estações de Tratamento de Águas

GC - Cromatografia Gasosa, do inglês Gas Chromatography

GC-ECD - Cromatografia Gasosa com detecção por Captura de Elétrons, do inglês Gas Chromatography-Electron Capture Detection

GC-MS - Cromatografía Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês Gas Chromatography Mass Spectrometry

HADs - Haloaldeídos

HAMs - Haloacetamidas

HANs - Haloacetonitrilas

HILIC - Cromatografia de Interações Hidrofílica, do inglês Hydrophilic Interaction Chromatography

HKs - Haloacetonas

HNMs - Halonitrometanos

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

HPs - Halopicrinas

ID - Injeção direta

IC-MS/MS - Cromatografia lônica acoplada a Espectrometria de Massas em série, do inglês *Ion Chromatography tandem Mass Spectrometry*

IRIS - Sistema Integrado de Informação de Riscos, do inglês Integrated Risk Information System

LC – Cromatografia Líquida, do inglês Liquid Chromatography.

LC-MS/MS - Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em série,

do inglês Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry

- LLE Extração Líquido-Líquido, do inglês Liquid Liquid Extraction
- LMC Limite Máximo de Contaminação
- LOD Limite de Detecção, do inglês Limit of Detection

log Kow - Coeficiente de partição n-octanol-água

- LOQ Limite de Quantificação, do inglês Limit of Quantification
- LOQi Limite de Quantificação Instrumental
- MBAA Ácido Bromoacético, do inglês Mono-bromoacetic Acid
- MCAA Ácido Cloroacético, do inglês Mono-chloroacetic Acid
- MeCN Acetonitrila
- MR Materiais de referência
- MRC Materiais de referência certificados
- MTBE Eter metil terc-butílico
- MON Matéria orgânica natural
- pka Constante de dissociação de um ácido
- FN Fase Normal
- FR Fase Reversa
- PTFE Politetrafuoretileno
- QAV Química Analítica Verde
- r Coeficiente de correlação
- R (%) Recuperação
- RSD Desvio Padrão Relativo
- NP-LC Cromatografia em Fase Normal, do inglês, Normal Phase Liquid Chromatography

RP-LC - Cromatografia em Fase Reversa, do inglês, *Reversed Phase Liquid Chromatography*

SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês Solid Phase Extraction

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês Solid Phase Microextraction

SRM - Selected Reaction Monitoring

TBAA - Ácido Tribromoacético, do inglês Tribromoacetic Acid

TCAA - Ácido Tricloroacético, do inglês Trichloroacetic Acid

THMs - Trihalometanos

UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância, do inglês United Nations International Children's Emergency Fund

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês *United State Enviromental Protection Agency*

WHO - Organização Mundial da Saúde, do inglês World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1.Geral	3
2.2. Específicos	3
3. REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1.Água: disponibilidade e contaminação	4
3.2. Água potável e o tratamento nas ETAS	5
3.3. Subprodutos de desinfecção (DBPs)	7
3.3.1. Classificação	9
3.4. Ácidos haloacéticos (AHAs)	9
3.4.1. Fatores que afetam a formação dos DBPs e AHAs	10
3.4.2. Toxicidade dos AHAs	12
3.4.3. Legislação para AHAs	13
3.4.4. Extração de AHAs de amostras de águas	14
3.4.4.1. Análises por Injeção Direta (ID)	16
3.4.4.2. Extração em Fase Sólida (SPE)	17
3.4.4.2.1. Aplicações da SPE para a extração de AHAs	18
3.4.5. Técnicas de determinação dos AHAs	22
3.5. Validação de métodos analíticos cromatográficos	28
3.5.1. Curva analítica e linearidade	29
3.5.2. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)	29
3.5.3. Precisão	29
3.5.4. Exatidão	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1.Instrumentação	31

4.2. Solventes, reagentes e padrões analíticos				
4.3.Limpeza da vidraria				
4.4. Escolha dos analitos				
4.5. Preparo das soluções analíticas				
4.6. Amostras de água para validação de métodos				
4.7. Condições do sistema cromatográfico LC-MS/MS				
4.7.1. Infusão no espectrômetro de massas				
4.7.2. Escolha da coluna cromatográfica34				
4.7.3. Preparo e escolha da fase móvel35				
4.8. Preparo das amostras				
4.8.1. Sistema de Injeção Direta35				
4.8.1.1. Avaliação do pH na Injeção Direta (ID)				
4.8.2. Condições da Extração em Fase Sólida (SPE)				
4.8.2.1. Volume e pH da amostra36				
4.8.2.2. Solvente de condicionamento				
4.8.2.3. Escolha do material adsorvente				
4.8.2.4. Escolha do solvente de eluição				
4.8.2.5. Escolha do volume do solvente extrator				
4.8.2.6. Avaliação da recuperação (R (%)) e efeito matriz (EM)				
4.9. Validação do método analítico40				
4.9.1. Curva analítica e linearidade40				
4.9.2. LOD e LOQ43				
4.9.3. Exatidão43				
4.9.4. Precisão				
4.9.5. Efeito matriz (EM)45				
4.10. Controle da qualidade nas determinações45				
4.11. Descrição da área de estudo e amostragem45				
4.12. Análise estatística				
4.13. Tratamento de resíduos				

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS49				
5.1.Escolha dos analitos				
5.2. Avaliação das melhores condições de detecção no espectrômetro de massas MS/MS				
5.3. Avaliação do sistema cromatográfico para a determinação dos AHAs				
5.3.1. Coluna Kinetex C857				
5.3.2. Coluna Obelisc N59				
5.3.3. Coluna Luna HILIC60				
5.4. Influência e escolha da fase móvel62				
5.5. Influência e escolha do <i>dwell time</i> 65				
5.6. Condições na separação cromatográfica para o TCAA67				
5.7. Estabelecimento das condições para Injeção Direta70				
5.8. Estabelecimento das condições da SPE71				
5.8.1. Avaliação do tipo de cartucho71				
5.8.2. Avaliação do tipo de solvente de eluição74				
5.8.3. Avaliação do volume de solvente de eluição77				
5.8.4. Condições finais dos métodos estudados80				
5.9. Validação dos métodos propostos para ID e SPE81				
5.9.1. Curva analítica e linearidade81				
5.9.2. LOD e LOQ				
5.9.3. Exatidão e precisão84				
5.9.4. Efeito matriz (EM)87				
 5.10. Comparação dos métodos desenvolvidos com métodos disponíveis na literatura para determinação dos AHAs em amostras de água				
5.11. Aplicabilidade dos métodos propostos92				
6. CONCLUSÕES95				
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS97				
APÊNDICE				

Título: ESTUDO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS HALOACÉTICOS EM AMOSTRAS DE ÁGUAS

Autor: Andrea Carolina Begambre Berrio Orientador: Prof. Dr. Ednei G. Primel

Coorientadora: Dra. Sergiane Caldas Barbosa

No processo de desinfecção realizado nas estações de tratamento de água (ETAs), o cloro é um dos agentes desinfetantes mais utilizados. No entanto, os agentes desinfetantes usados reagem com a matéria orgânica e geram subprodutos de desinfecção (DBPs, do inglês Desinfection by-products) nocivos para a saúde humana. Um dos grupos de DBPs mais gerados são os ácidos haloacéticos (AHAs), os quais, devido ao potencial tóxico, são legislados em muitos países. Devido à alta polaridade e a acidez destes compostos a determinação dos AHAs é de difícil execução. Neste trabalho foram avaliados dois métodos para a determinação de AHAs em amostras de águas de abastecimento público. As técnicas de Injeção Direta (ID) e Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês Solid Phase Extraction) foram avaliadas e validadas, ambas empregando como técnica de quantificação a Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em série. Os métodos apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,99 e recuperações entre 50 e 120% com RSD ≤ 20%, com exceção do MBAA, parâmetros que podem ser comparados com os estabelecidos pela INMETRO. Os limites de guantificação (LOQi, do inglês Limit of Quantification) obtidos foram de 10 até 250 µg L⁻¹. Os valores de LOQ_m para ID variaram entre 10 e 500 µg L⁻¹, e para a SPE, considerando um fator de concentração de 125 vezes, variaram entre 0,08 e 2,0 µg L⁻¹. Dentro do contexto atual da Química Analítica Verde, de desenvolver métodos mais simples, rápidos, que utilizem menor quantidade de solvente, menor geração de resíduos e menor exposição de risco do analista, a ID demonstrou ser um método rápido precisando apenas da acidificação da amostra a pH 4,1 e alcançando LOQs menores que o estabelecido pela legislação brasileira, com exceção do MCAA. Para detecção de níveis inferiores, a SPE apresenta-se como opção, sendo uma técnica bastante consolidada e que apresenta as vantagens de concentrar o analito no extrato final e redução no tempo total de análise guando comparada com a Extração Líguido Líguido. como técnica de extração padrão. Os resultados mostram que os métodos propostos podem atender aos requisitos para a determinação de seis AHAs em amostras de água, e são uma alternativa aos métodos atuais que necessitam de processos de derivatização, longo tempo e mais etapas de extração. Finalmente, a ID foi empregada com sucesso para determinar AHAs em amostras de água de abastecimento público. As concentrações de ácido dicloroacético (DCAA) variaram entre 15,3 e 33,6 µg L⁻¹.

Palavras chaves: ácidos haloacéticos, injeção direta, HILIC, LC-MS/MS.

Title: STUDY OF METHODS FOR THE DETERMINATION OF HALOACETIC ACIDS IN WATER SAMPLES

Author: Andrea Carolina Begambre Berrio Advisor: Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel Co-Advisor: Sergiane Caldas Barbosa

Chlorine is one of the most used disinfectants in the disinfection process carried out in water treatment plants. However, the chlorine present in the water reacts with organic conglomerates and generate disinfection by-products (DBPs), that are harmful to human health. One of the most generated groups of DBPs are haloacetic acids (HAAs), which have been legislated in many countries. Due to the high polarity and acidity of these compounds, the determination of HAAs is difficult to perform. In this study, two methods for the determination of HAAs in public water supply samples were evaluated. Direct Injection (DI) and Solid Phase Extraction (SPE) techniques were evaluated and validated, both using Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry for the determination. The methods showed correlation coefficients higher than 0.99 and recoveries between 50 and 120% with RSD \leq 20%, with exception of MBAA, parameters that can be compared to the criteria established by INMETRO. Limit of quantification (LOQi) obtained varied from 10 to 250 µg L⁻¹. LOQm values for DI ranged between 10 and 500 µg L⁻¹, and for SPE, considering a concentration factor of 125 times, ranged between 0.08 and 2.0 µg L⁻¹. In the context of Green Analytical Chemistry, looking for simple and fast methods, that use less volume of solvent, generate less waste and cause less risk of exposition for the analyst, DI technique has proved to be a fast method, that requires only the acidification of the sample at pH 4.1, reaching LOQ lower than the values established by Brazilian legislation, except for MCAA. To detect lower levels, SPE is an option, being a consolidated technique with the advantages of concentrate the analyte in the final extract and reduce the total analysis time compared to Liquid Liquid Extraction. The results show that the proposed methods can meet the requirements for the determination of six HAAs in water samples, and they are an alternative to the current methods that require a derivatization process, long time and more steps of extraction to determine HAAs. Finally, DI was successfully employed to determine HAAs in drinking water samples. Concentrations of dichloroacetic acid (DCAA) were between 15.3 and 33.6 µg L⁻¹.

Keywords: haloacetic acids, direct injection, HILIC, LC-MS/MS.

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 97% de toda a água da Terra está nos oceanos e os 3% restantes compõem a água doce. Porém, a maior parte dessa água é inacessível pelo fato de se encontrar em geleiras e/ou polos, sendo 0,5% encontrada em águas superficiais e subterrâneas. Estima-se que são extraídos 3600 km³ para consumo humano a nível mundial, dos quais a metade é evaporada ou infiltrada através dos solos, e do restante, 65% é usado para agricultura, 25% para indústria e 10% é tratada para eliminar e reduzir os poluentes e contaminantes, e depois ser destinada ao consumo doméstico. No entanto, com o aumento da população e os processos de urbanização, industriais, agroindustriais e econômicos sugere-se que até os anos 2025-2030, o consumo de água aumente 24% em comparação com o volume atual (MITCHELL; FORDE; NEPTUNE, 2019). Portanto, o uso adequado e racional da água é cada vez mais um aspecto importante a nível mundial, principalmente quando é usada para consumo humano.

As águas destinadas para abastecimento doméstico são tratadas através de processos nas estações de tratamento de água (ETAs) (JIMÉNEZ; GALIZIA, 2012). Entre os processos das ETAs, o processo de desinfecção inclui a mistura de compostos químicos onde são empregados ozônio, cloramina, dióxido de cloro e em sua grande maioria cloro (ON; PYO; MYUNG, 2018), utilizados para eliminar ou impedir que vírus, bactérias e protozoários causadores de doenças surjam ou se multipliquem no percurso da ETA até as residências. O cloro é o agente desinfetante comumente usado que, em baixas concentrações inativa os microrganismos (cloração). No entanto, o cloro presente na água reage com conglomerados orgânicos e pode gerar subprodutos de desinfecção (DBPs, do inglês *Disinfection by-products*) nocivos para a saúde humana (PALUMBO et al., 2018).

Um dos grupos comumente gerados e detectados em amostras de água são os ácidos haloacéticos (AHAs), os quais são formados a partir da substituição de átomos de hidrogênio de ácido acético por átomos halogenados como cloro, bromo ou iodo. Os AHAs clorados são formados pelo uso do cloro como agente desinfetante, enquanto que os AHAs bromados são formados pela substituição do bromo inorgânico presente nas águas subterrâneas e superficiais (PRIETO-BLANCO et al., 2012). Existem nove diferentes AHAs clorados e bromados: ácido monocloroacético (MCAA), ácido dicloroacético (DCAA), ácido tricloroacético (TCAA), ácido monobromoacético (MBAA), ácido dibromoacético (DBAA), ácido tribromoacético (TBAA), ácido diclorobromoacético (DCBAA), ácido dibromocloroacético (DBCAA) e ácido bromocloroacético (HE et al., 2018).

Alguns dos AHAs são regulados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, do inglês *United State Enviromental Protection Agency*), devido ao fato de serem considerados potencialmente carcinogênicos em organismos e são conhecidos como AHAs₅ (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA e DBAA). A USEPA estabelece um Limite Máximo de Contaminação (LMC) de 60 µg L⁻¹ para a concentração total dos cinco AHAs (USEPA, 2018). No Brasil, o LMC para os AHAs₅ é de 80 µg L⁻¹, e são regulados pela Portaria de consolidação Nº 5 de 28 de setembro de 2017 (BRASIL, 2017).

A USEPA estabeleceu alguns métodos padrões para análise de AHAs em amostras de água potável. A maioria dos métodos estão baseados em Extração Líquido-Líquido (LLE, do inglês Liquid Liquid Extraction) e quantificação por Cromatografia Gasosa (GC, do inglês Gas Chromatography) empregando processos de derivatização (USEPA, 1995). Entretanto, este método é considerado trabalhoso, demorado, de maior consumo de solvente e possui impacto negativo na repetibilidade. No entanto, outras técnicas de extração mais modernas têm sido estudadas para extração dos AHAs (LUO et al., 2013), entre elas podemos citar a Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME, do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) (AL-SHATRI; NUHU; BASHEER, 2014), a Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês Solid Phase Extraction) (HENSON; EMMERT; SIMONE, 2014) e a Injeção Direta (ID) (POSTIGO; EMILIANO; VALERO, 2020).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar métodos para a análise de AHAs com base nos princípios da Química Analítica Verde (QAV) para serem aplicados em amostras de águas tratadas e distribuídas pela Corsan (Companhia Riograndense de Saneamento) na região sul do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar, desenvolver e validar métodos para determinação de AHAs usando LC-MS/MS em águas de abastecimento público na região sul do Brasil.

2.2. Específicos

- Avaliar as condições instrumentais para a quantificação de AHAs em águas de abastecimento público utilizando LC-MS/MS;
- Padronizar a técnica de SPE para a extração dos AHAs; priorizando os princípios da QAV;
- Padronizar o processo de ID da amostra para determinação dos AHAs por LC-MS/MS; priorizando os princípios da QAV;
- ✓ Validar os métodos propostos;
- ✓ Comparar as técnicas de preparo de amostras propostas, Injeção Direta (ID) e Extração em Fase Sólida (SPE).
- ✓ Avaliar a concentração dos AHAs em amostras de águas de abastecimento público nos municípios de Rio Grande, Camaquã e Santa Vitória do Palmar.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Água: disponibilidade e contaminação

As fontes de água são fundamentais para a manutenção da vida e da saúde e essenciais para as atividades humanas. O Brasil é o país com maior disponibilidade dessa porcentagem, cobrindo aproximadamente entre 11 e 12% do seu território. No entanto, o mundo e o Brasil enfrentam problemas relacionados à saúde pública e à crescente demanda pelo uso desse recurso hídrico (MITCHELL; FORDE; NEPTUNE, 2019).

Além dos problemas relacionados com o esgotamento da água, existem aqueles relacionados com a qualidade que chega às nossas residências. A Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF, do inglês *United Nations International Children's Emergency Fund*) estimaram no ano 2017-2019 que 3 em cada 10 pessoas no mundo não têm acesso seguro e disponível de água e 6 em cada 10 não contam com saneamento básico. Além disso, muitas vezes a água que os seres humanos consomem se encontra contaminada. Estes aspectos estão relacionados com à transmissão de doenças como cólera, diarreias, disenteria, hepatite A, febre tifóide e poliomielite, expondo a população a riscos à saúde (UNICEF, 2019; WHO, 2019).

Além dos contaminantes amplamente estudados e conhecidos, a presença de contaminantes emergentes no ambiente aquático também pode afetar a saúde humana, e nas últimas décadas, pesquisas sobre os contaminantes emergentes no ambiente aquático tem ganhado atenção da comunidade científica, com foco na identificação e na caracterização do potencial tóxico desses contaminantes (HARTMANN et al., 2018). Alguns desses contaminantes são aqueles usados em produtos de cuidado pessoal, fármacos, hormônios, alquilfenóis e seus derivados, pesticidas, drogas ilícitas, plásticos, microplásticos, retardantes de chama bromados, compostos perfluorados; siloxanos; benzotriazóis; ácidos naftênicos; percloratos; dioxinas; nanomateriais; líquidos iônicos e DBPs (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017). Considerando a presença de contaminantes nas fontes de água captadas para tratamento, as ETAs têm a função de captar e transportar as fontes de água até um

sistema de tratamento, onde são tratadas para atingir os padrões de potabilidade estabelecidos nas legislações (GITIS; HANKINS, 2018).

3.2. Água potável e o tratamento nas ETAS

A água potável é considerada como a água tratada através de diferentes processos físicos e químicos que a tornam adequada, segura e acessível ao consumo humano. A água potável é necessária para todos os fins domésticos, como preparo de alimentos e higiene pessoal (WHO, 2017). O tratamento da água é utilizado há muitas décadas, usando uma combinação de processos aplicáveis a quase todas as fontes de água. Esta combinação consiste em processos físicos e químicos robustos aplicados, que com o passar do tempo e o avanço da tecnologia foram modificados (GITIS; HANKINS, 2018).

Desde o início, os sistemas de purificação estavam baseados na obtenção de água limpa e clara. No início dos anos 1700 foram empregados sistemas de filtração como meio efetivo. Anos mais tarde, foi aplicado pela primeira vez o hipoclorito de sódio como agente primário de desinfecção e logo surgiu a primeira legislação, onde foi recomendado o uso de cloro para o controle das espécies patogênicas presentes nos sistemas de purificação de água (HALL; DIETRICH, 2000). Hoje em dia, os sistemas de purificação de água possuem uma combinação de processos, incluindo estágios de coagulação, floculação, sedimentação, filtração e desinfecção. A coagulação e desinfecção são os dois estágios do processo baseados principalmente na introdução de produtos químicos na água (GITIS; HANKINS, 2018). A **Figura 1** apresenta a distribuição dentro de uma planta de tratamento de água potável convencional e seus respectivos processos.



Figura 1: Etapas comuns em uma estação de tratamento de água convencional.

Fonte: Autoria própria

Os processos envolvidos na maioria das ETAs são a captação e armazenamento, gradeamento e peneiramento, pré-oxidação, coagulação/floculação, sedimentação, filtração e a desinfecção.

O processo de desinfecção é baseado na introdução de agentes oxidantes na forma gasosa, líquida ou em pó (GITIS; HANKINS, 2018). Um desinfetante é considerado adequado quando apresenta uma alta capacidade de destruir os microrganismos patógenos, não apresenta toxicidade nas quantidades normais de utilização, possui custo acessível e tem um efeito residual, de forma tal que constitua uma barreira sanitária contra a recontaminação na rede de distribuição (CAMPER; MCFETERS, 1979; BRASIL, 2006). Neste processo, o cloro é o agente desinfetante mais empregado por ser eficiente e ter baixo custo em forma de cloro gasoso, cloramina, dióxido de cloro, hipoclorito de sódio ou hipoclorito de cálcio. Outros agentes desinfetantes como cloramina, bromo e seus derivados, e ozônio também são empregados (ON; PYO; MYUNG, 2018).

• Cloração das águas

Quando o cloro é adicionado na água, imediatamente ocorre a seguinte reação (Equação 1):

$$Cl_2 + H_2O \rightleftharpoons HClO + H^+ + Cl^-$$
 (1)

Em solução diluída e pH acima de 4,0; o equilíbrio da reação é deslocado para a direita, ficando pouco cloro em solução, enquanto que em valores de pH mais baixos a reação predominante é no sentido da esquerda da Equação 1. O ácido hipocloroso HCIO, tende-se a dissociar facilmente formando o íon hipoclorito (OCI⁻), como mostrado na Equação 2:

$$HClO \rightleftharpoons H^+ + OCl^-$$
 (2)

A ação desinfetante do cloro é controlada pela formação do HCIO, um ácido fraco e cuja dissociação a pH mais altos é fraca, sendo predominante a formação não dissociada. No entanto, em geral, as águas de abastecimento têm valores de pH entre 5 e 10, tendo como formas presentes de cloro HCIO e OCI⁻.

O mecanismo de desinfecção do cloro é baseado no fato de que o cloro na forma de HCIO e OCI⁻ apresenta-se com valência de (+1) e (-1), respectivamente, apresentando alta estabilidade e ganho de elétrons. Dessa forma, o cloro pode penetrar a parede celular das bactérias que são partículas coloidais com carga negativa predominante e inibir a oxidação da glicose, vital para o crescimento bacteriano (CAMPER; MCFETERS, 1979; BRASIL, 2006).

3.3. Subprodutos de desinfecção (DBPs)

Uma consequência não intencional quando é usado o cloro nos processos de desinfecção é a formação de produtos químicos prejudiciais para a saúde humana (ABU HASAN; MUHAMMAD; ISMAIL, 2020). Estas substâncias formadas, devem ser analisadas, monitoradas e regulamentadas nas águas destinadas ao consumo humano.

Os desinfetantes são efetivos na eliminação dos microrganismos, mas são oxidantes da matéria orgânica natural (MON). Os agentes oxidantes reagem com os ácidos húmicos e fúlvicos e os íons brometo e/ou iodetos presentes na água para formar os DBPs (POWERS; GONSIOR, 2019). Estes são considerados compostos danosos para os seres humanos. Alguns dos riscos à saúde gerados pelos DBPs

incluem câncer de bexiga e efeitos reprodutivos durante a gravidez (ON; PYO; MYUNG, 2018).

A formação dos DBPs foi relatada por Rook em 1974 nos sistemas de distribuição de água potável da cidade de Amsterdam (Holanda) (ROOK, 1976; RICHARDSON, 2011), e mais tarde, no mesmo ano, Bellar relatou a ocorrência na cidade de Nova Orleans (Estados Unidos), onde foi detectado a presença de clorofórmio em águas de abastecimento tratadas com cloro (BELLAR; LICHTENBERG; KRONER, 1974; RICHARDSON, 2011). Assim, o esforço por compreender a formação, ocorrência e efeitos desses compostos tem despertado interesse da comunidade científica ao longo das últimas décadas (GITIS; HANKINS, 2018; WANG et al., 2019).

Existem 600 DBPs reportados na literatura, mas um pequeno número tem sido relacionado com os efeitos e a ocorrência deles (WU et al., 2017). Os DBPs têm sido quantificados em água potável na faixa de concentrações de ng L⁻¹ a µg L⁻¹ e são classificados AHAs, em grandes grupos como trihalometanos (THMs), haloacetonitrilas (HANs), haloacetonas (HKs), haloaldeídos (HADs), halopicrinas (HPs), entre outros (CARDADOR; FERNÁNDEZ-SALGUERO; GALLEGO, 2015). Na Figura 2 é mostrado a porcentagem das classes de DBPs reportados em estudo de avaliação em diferentes amostras de água desinfetadas de 2008 a 2020, baseado na revisão de literatura de artigos científicos da base de dados ScienceDirect, Scopus e Springer Link, onde verifica-se que a maioria dos estudos (42,5%) têm investigado a presença dos AHAs, seguido dos THMs.



Figura 2: Porcentagem das classes de DBPs reportados em estudo de avaliação em diferentes amostras de água desinfectadas.

3.3.1. Classificação

Os THMs, AHAs e HADs são as três classes principais de DBPs encontrados na água, geralmente em concentrações baixas (µg L⁻¹). A maioria dos DBPs formados são espécies altamente halogenadas, principalmente cloradas, no entanto em processos de desinfecção alternativos como cloramina (ZENG; PLEWA; MITCH, 2016) e ácido peracético (MACÊDO et al., 2019) são formados DBPs substituídos por nitrogênio, os quais podem apresentar um risco potencial para saúde mais alto que os próprios DBPs conhecidos e regulados (WANG et al., 2015).

3.4. Ácidos haloacéticos (AHAs)

Os AHAs são um importante grupo de DBPs derivados do ácido acético, substituídos no grupo metila por halogênios como cloro e/ou bromo, ou substituídos por iodo e nitrogênio (FRANCO, 2018), formados durante os processos de desinfecção de água potável. Embora tenha sido estabelecido que os AHAs são formados pela reação de agentes oxidantes com substâncias heterogêneas de ocorrência natural, existem estudos que buscam investigar os mecanismos de formação (BOND et al., 2012; TUBIĆ et al., 2013; VERDUGO et al., 2016). O processo de formação dos AHAs é ilustrado na **Figura 3**.

Figura 3: Processo de formação dos AHAs.

HCl0
+ Precursores alifáticos
$$\rightarrow$$
 AHAs clorados
 OCl^{-}

A USEPA regulamenta cinco desses compostos, identificados como AHAs₅: MCAA, DCAA, TCAA, MBAA e DBAA (USEPA, 2005, 2018). No entanto, as espécies mais abundantes são TCAA e DCAA, correspondendo quase 80% da formação dos AHAs, seguido pelo DCBAA e BCAA, que representam 15% dos compostos totais (CHEN; CHANG; WANG, 2009; USEPA, 2018). Os AHAs apresentam propriedades bem características, sendo compostos polares, com elevados pontos de ebulição, alta solubilidade em água e constante de dissociação (pKa) menor que do ácido acético (4,75). Os AHAs possuem grupos eletronegativos em sua estrutura (halogênios), conferindo-lhes uma característica ácida. Quanto maior é a presença de grupos eletronegativos (Cl⁻, Br⁻, I⁻, F⁻) presentes na estrutura da molécula, maior será a acidez do composto.

3.4.1. Fatores que afetam a formação dos DBPs e AHAs

Existem diversos fatores que afetam a formação dos DBPs: MON, pH da água, doses do agente oxidante, modos de aplicação, temperatura, concentrações de íons iodados e bromados (YANG; SHANG; WESTERHOFF, 2007).

Autores como Stefán e colaboradores (2019) concluíram que as diferentes espécies de DBPs formados é influenciada por diferentes fatores de alto impacto na distribuição destes compostos. Por exemplo, os autores observaram que existe uma correlação positiva entre a formação dos DBPs, a temperatura e o cloro residual livre, sendo esses parâmetros os de maior impacto na formação de DBPs.

Um precursor importante dos DBPs é a MON presente na água doce. Basicamente, a MON é uma mistura heterogênea complexa de macromoléculas, cujos principais componentes são substâncias húmicas, carboidratos e aminoácidos. A MON consiste em milhares de componentes, como partículas macroscópicas, coloides ou macromoléculas dissolvidas que podem alterar características como cor, odor, sabor, desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou implicar a presença de matéria não biodegradável (FUENTES RIVAS et al., 2015). Os ácidos húmicos e fúlvicos são os responsáveis pela maior formação da MON (FAN et al., 2001; YANG et al., 2018). Foi comprovado que a MON possui um alto potencial para a formação dos DBPs (AHAs, THMs, HANs e HNMs) (YANG; ZHANG, 2016; YANG et al., 2018).

Zheng e colaboradores (2015) estudaram os efeitos de processos de coagulação na remoção da MON e o impacto desta na formação de DBPs regulados e não regulados. Existe uma correlação positiva entre a formação dos THMs e AHAs, e a presença de substâncias húmicas na água, assim como a formação de outro tipo de DBPs, como as furanonas halogenadas. Li e colaboradores (2017) em estudo sobre a formação de DBPs por cloração encontraram que as frações hidrofóbicas de matéria orgânica contribuíram para a formação de DBPs halogenados, principalmente os substituídos por cloro, e quantidades significativamente menores de DBPs foram formadas a partir das frações hidrofóbicas e hidrofílicas de MON durante a cloração do que durante a cloração.

Diferentes estudos relatam que a maioria dos DBPs com exceção dos acetaldeídos bromados são formados a altas temperaturas, ou seja, nas épocas de verão, onde as temperaturas são superiores a 25-30 °C. Um estudo da caracterização química e avaliação da toxicidade relativa de misturas de DBPs em redes de abastecimento de água potável encontrou que temperaturas elevadas da água (30 °C) contribuíram para aumentar o potencial de formação de DBPs quando comparado com temperaturas de 15 °C (POSTIGO et al., 2018).

Serrano e colaboradores (2015), observaram que a concentração dos AHAs é influenciada pelas diferentes épocas do ano. Os três ácidos clorados formados majoritariamente nas redes de distribuição de água potável da província de Córdoba no Sul da Espanha foram DCAA, TCAA e BCAA, detectados no outono e na primavera. TCAA foi encontrado em todas as estações e em amostras de água bruta, nas concentrações médias de 0,5 µg L⁻¹ no verão e inverno, 0,4 µg L⁻¹ na primavera, e 0,2 µg L⁻¹ no outono. A concentração de DCAA na água bruta foi menor que a do

TCAA nos meses mais quentes, mas maior no outono. No inverno, DCAA não foi detectado.

Zhai e colaboradores (2017) estudaram a formação de DBPs em fontes de água potável na China. Eles verificaram que em processos de cloração, os AHAs foram os principais DBPs formados na maioria das amostras analisadas, seguidos pelos THMs. A diminuição na concentração de MON, diminuiu gradualmente a formação dos DBPs. Durante a cloração, precursores que possuem grupos hidroxila alcoólicos ou grupos carboxila fenólicos tendem a gerar AHAs di-substituídos, e os tri- substituídos são formados pela presença de grupos hidroxila fenólicos. Assim como os demais DBPs, a formação dos AHAs aumenta com as altas concentrações de cloro residual presente (aproximadamente 3 mg L⁻¹) (SHI; QIANG; ADAMS, 2013; ALEXANDROU; MEEHAN; JONES, 2018). A formação dos AHAs em amostras aquosas é favorecida com a diminuição do pH do meio (BRUZZONITI et al., 2008).

A formação dos DBPs bromados depende das quantidades de bromo presentes nas fontes de água. Essa formação é dada pela oxidação do bromo naturalmente presente nos processos de ozonização. Além disso, pode estar presente como "contaminante" no hipoclorito de sódio usado na cloração, formando o ácido hipobromoso, o que permite a formação de AHAs mono, di e tribromados (BRUZZONITI et al., 2019).

3.4.2. Toxicidade dos AHAs

Existem poucos estudos sobre os efeitos da exposição dos AHAs nos seres humanos, no entanto, têm sido observados efeitos em animais. Alguns AHAs têm estudos comprovados sobre os efeitos toxicológicos que eles podem causar (RICHARDSON et al., 2007). MCAA foi comprovado ser responsável por alterações em animais relacionadas com a mudança no peso corporal, fígado, rins e testículos em ratos. DCAA tem relatos de tumores hepáticos e toxicidade neuromuscular em ratos; e TCAA causa tumores no fígado de ratos (WHO, 2017). Em seres humanos, alguns estudos têm associado os efeitos dos AHAs ao tempo de exposição e concentração.

De acordo com esses dois fatores, podem ser observados efeitos na reprodutibilidade durante a gravidez, má formação embrionária, mutação,

retardamento do crescimento, aborto espontâneo e problemas cardíacos, toxicidade às células, problemas no desenvolvimento fetal, entre outros (FRANCO, 2018).

Os AHAs bromados apresentam maior genotoxicidade e citotoxicidade que os AHAs clorados (PLEWA et al., 2010; PLANAS et al., 2019). Além disso, o Sistema Integrado de Informação de Riscos (IRIS, do inglês *Integrated Risk Information System*) classifica o DCAA como Grupo B2 (provável carcinogênico para humanos com evidências suficientes de estudos animais) e o TCAA pertencente ao Grupo C (possível carcinogênico para humanos com evidências limitadas de estudos em animais e dados inadequados ou inexistentes para humanos) segundo faixas de toxicidade da USEPA (USEPA, 2005, 2018).

3.4.3. Legislação para AHAs

A nível mundial a regulamentação para este tipo de compostos estabelece LMCs individuais e também para o somatório total de cada grupo de DBPs regulados. Por exemplo, países como Estados Unidos e Canadá estabelecem concentrações máximas para o somatório de AHAs₅ de 60 µg L⁻¹ (USEPA, 2018) e 80 µg L⁻¹ (HEALTH CANADA, 2019), respectivamente. Na China, o guia padrão para regular os DBPs do ano de 2006 (GB5749-2006) estabelece os valores de LMC para DCAA e TCAA de 50 e 100 µg L⁻¹, respectivamente (NATIONAL STANDARD OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA, 2006). O guia australiano de água potável é considerado o mais completo guia que inclui regulamentações para 24 DBPs (WHO, 2017).

No Brasil, a Portaria de consolidação Nº 5 de 28 de setembro de 2017 estabelece os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, na qual consta o padrão de potabilidade para diversas substâncias químicas que representam risco à saúde, entre elas os AHAs, onde consta que o LMC para o somatório dos principais AHAs₅ (MCAA, DCAA, TCAA, MBAA e DBAA) é de 80 µg L⁻¹ (BRASIL, 2011, 2017). Na **Tabela 1** são apresentados os valores estabelecidos pelos diferentes países e organizações governamentais para os AHAs.

		USA		Canadá	China	Austrália	Brasil
Analito	EPA		WHO	Health Canada	Ministério da Saúde		iúde
	LMCO*			Ĺ	MC**		
μg L ⁻¹							
MCAA	N.R***		20		NR	< 150	
DCAA	0		50		50	< 100	
MBAA	N.R	60****	N.R	80****	N.R	< 150	80****
DBAA	N.R		N.R		N.R	< 100	
TCAA	20		200		100	< 100	
TBAA	N.R	N.R	N.R	N.R	N.R		N.R
BCAA	N.R	N.R	N.R	N.R	N.R		N.R
DCBAA	N.R	N.R	N.R	N.R	N.R	< 100	N.R
DBCAA	N.R	N.R	N.R	N.R	N.R		N.R

Tabela 1: Valores máximos permitidos (µg L⁻¹) para AHAs em diferentes países.

* LMCO: Limite máximo de contaminação objetivo; **LMC: Limite máximo de contaminação; ***NR: Não reportado: ****: Corresponde à soma total dos cinco primeiros AHAs

3.4.4. Extração de AHAs de amostras de águas

Devido aos efeitos toxicológicos adversos que os AHAs podem causar sobre organismos aquáticos e aos seres humanos, surge a necessidade de avaliar e monitorar a formação e ocorrência deste tipo de DBPs em amostras de água potável (PLANAS et al., 2019). Devido às baixas concentrações que podem ser encontradas, e as dificuldades analíticas para suas determinações, é necessário o estudo de técnicas de preparo das amostras e a padronização de condições para sua determinação.

O avanço da QAV e o preparo de amostras, permite a avaliação da implementação de diferentes métodos para extração e quantificação dos AHAs. O preparo de amostras consiste em várias etapas: preservação, enriquecimento, extração e fracionamento seletivo para isolar os analitos (KINANI; KINANI; BOUCHONNET, 2016). Nesta etapa procura-se estabilizar os analitos, reduzir as interferências, aumentar a detectabilidade do método e transformar os analitos na forma mais adequada.

A técnica mais comumente usada para a extração dos AHAs é a LLE (STEFÁN et al., 2019; ZHANG et al., 2019a), que consiste na separação de uma mistura de compostos aproveitando sua diferença de solubilidade entre dois líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis (OTHMER; WHITE; TRUEGER, 1941). A LLE requer

grandes quantidades de solventes orgânicos tóxicos, considera-se uma técnica demorada e trabalhosa para análise de traços (FARAJZADEH; ABBASPOUR, 2017). A LLE é utilizada há décadas como técnica de recuperação ou concentração de ácidos carboxílicos em soluções aquosas. Na etapa de extração diferentes solventes foram utilizados incluindo acetato de etila, e mais comumente o éter metil terc-butílico (MTBE) (LO, TEH C., MALCOLM HI BAIRD, 1983; SPRAKEL; SCHUUR, 2019).

Sob essas características, a USEPA estabeleceu como técnica oficial para a extração dos AHAs a LLE, onde os analitos são particionados na fase orgânica e extraídos com MTBE, para logo serem derivatizados, transformando-os em seus ésteres metílicos pela adição de metanol ácido, seguido por um leve aquecimento e adição de uma solução saturada de bicarbonato de sódio como neutralizador. Finalmente, a determinação dos AHAs é feita por Cromatografia Gasosa com detecção por Captura de Elétrons (GC-ECD, do inglês *Gas Chromatography-Electron Capture Detection*) (USEPA, 1995).

No entanto, cada vez mais ocorrem esforços da comunidade científica para implementar alternativas de análises com diminuição do uso de reagentes químicos perigosos que têm impactos nocivos para a saúde e o meio ambiente. Nesse sentido, os princípios da QAV atraíram a atenção dos pesquisadores no desenvolvimento de técnicas analíticas baseadas no uso de solventes e reagentes amigáveis com o meio ambiente, diminuição do uso de solventes tóxicos, diminuição nos tempos de separação, gerenciamento adequado de resíduos, miniaturização das técnicas de extração, menor uso de solvente, menor quantidade de amostras, entre outros. Tendo como técnicas de preparo de amostras alternativas a Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*), DLLME, SPE, ID.

A DLLME, por exemplo, é considerada uma técnica de extração ambientalmente amigável, rápida e econômica, em que o preparo de amostras utiliza pouco volume de solventes orgânicos (< 3 mL) (REZAEE et al., 2006; AHMAD et al., 2015). A DLLME foi proposta para a extração de seis AHAs em água engarrafada e água da torneira, usando 1 mL de *n*-octanol como solvente extrator e reagente de derivatização, 1 mL de etanol como solvente dispersor, e 30 μ L de anidrido trifluoroacético como catalisador à temperatura ambiente (25 °C). O método proposto apresentou boa repetibilidade (Desvio Padrão Relativo (RSD) < 20%) e foram obtidos LOQs de 0,05 μ g L⁻¹ para MCAA, MBAA, DCAA, DBAA, BCAA e TCAA. Este método foi considerado pelos autores como relativamente rápido, pois a derivatização é

simultânea e o procedimento de extração foi concluído em 10 min para posterior análise por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) (AL-SHATRI; NUHU; BASHEER, 2014).

Outra técnica de preparo de amostra convencional é a SPE, atualmente uma das mais utilizadas para extração e/ou concentração de analitos em amostras complexas, permitindo que analitos em concentrações muito baixas sejam detectados por métodos cromatográficos (ZHOU et al., 2020). Além disso, inclui altas porcentagens de recuperação, seletividade, reprodutibilidade, fácil processo de operação assim como o uso de menor quantidade de solventes orgânicos (WEINBERG et al., 2006). A SPE começou a ser utilizada na década de 1980, com o objetivo de suprir as desvantagens apresentadas pela LLE (THURMAN, 1998; POOLE, 2003), e hoje é a técnica mais popular de preparo de amostra (ZHOU et al., 2020). Além disso, a técnica encontra aplicação em diferentes áreas, como aplicação na área farmacêutica, bioquímica, química orgânica, alimentos e meio ambiente (MONTES et al., 2019; ZHOU et al., 2020; WAWRYK et al., 2021).

3.4.4.1. Análises por Injeção Direta (ID)

Uma forma de análise que merece destaque, é a ID das amostras. Empregando a ID, o analito não é isolado ou enriquecido, assim se minimiza o risco de perda do analito ou contaminação da amostra durante o preparo de amostra.

A ID foi proposta para a análise de AHAs, empregando determinação por Cromatografia de Íons acoplada ao Detector por Espectrometria de Massas em série (IC-MS/MS, do inglês *lon Chromatography tandem Mass Spectrometry*), obtendo recuperações entre 84,9-117 com RSD de 4,7 a 11% em amostras de água sintética (USEPA, 2009); 77-125% com RSD de 1,7-13% em aguas de abastecimento público (WU et al., 2017), e 95,9-111% com RSD de 1,2-12% (BRUZZONITTI et al., 2019) em amostras de águas de abastecimento.

Negreira e colaboradores (2015) usaram a ID acoplado a LC-MS/MS para estudar a reatividade de tamoxifeno e seus principais metabólitos ativos durante a cloração da água. Os autores conseguiram identificar sete subprodutos clorados. Cabe salientar, que esta é uma importante aplicação da ID, pois ela é eficaz para elucidação de estruturas desconhecidas, se os testes forem realizados em águas om pouca quantidade de compostos tóxicos e altas concentrações de agentes oxidantes e precursores (NEGREIRA et al., 2015).

3.4.4.2. Extração em Fase Sólida (SPE)

A SPE é usada para o isolamento, concentração e limpeza, para isso usa dispositivos tipo cartucho ou discos contendo um material adsorvente (POOLE, 2003), similar aos usados nas colunas empregadas para cromatografia líquida, baseados em diferentes mecanismos como adsorção, partição, troca iônica e exclusão entre as moléculas do sorvente e o analito, as quais permitem sua retenção por meio de interações tipo Van der Waals, ligação hidrogênios, interações dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, e troca iônica (LANÇAS, 2004; JARDIM, 2010).

A técnica de extração em fase sólida (SPE) consiste de quatro etapas: 1) condicionamento do cartucho com o solvente, adequando às forças de interação entre o solvente da amostra e o solvente de eluição; 2) percolação da amostra no material adsorvente onde ocorre a retenção do analito e as vezes alguns interferentes; 3) limpeza do material adsorvente para eliminar interferentes e 4) eluição do analito (JARDIM, 2010), como pode ser observado na **Figura 4**.



Figura 4: Etapas da Extração em Fase Solida (SPE).

Fonte: Caldas et al. 2011
Estas etapas são feitas num sistema comercial SPE tipo *manifold*, formado por uma caixa de vácuo, com espaço para doze cartuchos. O sistema usado é conveniente para a análise de rotina nos laboratórios uma vez que 12 amostras podem ser extraídas ao mesmo tempo. Além disso, as amostras de água são transferidas ao cartucho SPE mediante tubulações de politetrafluoretileno (PTFE), esta transferência ocorre por sucção por função do vácuo aplicado no sistema, controlado por válvulas (CALDAS, 2009).

3.4.4.2.1. Aplicações da SPE para a extração de AHAs

No caso dos AHAs, foram implementados alguns métodos para sua determinação usando SPE e LC-MS/MS ou outras técnicas cromatográficas. Na **Tabela 2** são apresentadas as condições de extração e características da SPE empregados em trabalhos para a extração de AHAs.

Quantificação	Volume de amostra (vazão de percolação)	pH da amostra	Cartucho	Condicionamento da amostra	Eluição	Rec. (%)	Referência
IC	125 mL (2 mL min ⁻¹)	3,0	LiChrolut EN (500 mg, 6 mL)	3 mL MeOH 3 mL de 200 mM H ₂ SO ₄	2 mL de NaOH 10 mM	22-106	(BRUZZONITI et al., 2008)
			LiChrolut EN (500 mg, 6 mL)		8 mL de	60,1 - 102,4	
LC-MS/MS de par iônico	100 mL (5 mL min ⁻¹)	≈ 1,5	OASIS HLB (200 mg, 6 mL)	5 mL de MeOH 5 mL de MeCN 5 mL de 200 mM de H ₂ SO ₄	15 mM de DBA/Me CN (95/5)	27,3 – 99,6	(PRIETO- BLANCO et al., 2012)
		ISOLUTE ENV (200 mg, 6 mL)	рН 7,0	44,6 – 91			
UPLC-UV	20 mL	4,0	*µ-SPE	Acetona por 10 min 20 mL água ultrapura	15 mM NaH₂PO₄ pH 2,0	68,09 – 110,9	(NSUBUGA; BASHEER, 2013)
SIA-PCR-IC	50 mL (2 mL min ⁻¹)	1,3	LiChrolut EN (200 mg)	3 mL MeOH 5 mL água de reagente 5 mL de H ₂ SO ₄ 0,1 M e 50 µg L ⁻¹ de 2- BBA	3 mL de 10 mM NaOH	90 — 114	(HENSON; EMMERT; SIMONE, 2014)

Tabela 2: Condições de extração para a determinação de AHAs empregando SPE no preparo da amostra.

Rec: Recuperação; *: Cartucho modificado a base de Sílica de arroz; 2-BBA: ácido 2-bromobutanóico; IC: Cromatografia de Íons, do inglês *lon Chromatography*; LC-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*; UPLC-UV: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Detector Ultravioleta, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography with Ultravilet Detector*; SAI-PCR-IC: Análise de Injeção Sequencial acoplado Cromatografia de Íon de Reação Pós-Coluna, do inglês *Sequential Injection Analysis (SIA) with Post-Column reaction Ion Chromatography*

Quantificação	Volume de amostra (vazão de percolação)	pH da amostra	Cartucho	Condicionamento da amostra	Eluição	Rec. (%)	Referência	
UPLC-MS/MS	250 (5 mL min ⁻¹)	NI	Oasis HLB (200 mg, 6 mL)	4 mL de MeCN 4 mL de MeOH 4 mL de água ultrapura:AF 0,1%	4 mL de MeOH, a 3mL min ⁻¹	99,96 para 0,6 ng L ⁻¹ ; 98,52 para 1 ng L ⁻¹	(KADMI et al., 2016)	
			Oasis HLB (200 mg, 3 mL)			16 - 132		
			Agilent Bond- Elut ENV (200			16 – 82		
HPLC	5	2,5	Strata SDB-L (200 mg, 3 mL)	5 mL de MeOH 3 mL água ultrapura	1:3.5:3.5 mL de água:MeO	22 – 62	(BASSO, 2016)	
			LiChrolut EN (200 mg, 3 mL)	(pH 2,5 H ₂ SO ₄)	H:acetona	27 – 46		
			Chromalite PCG1200CPlus (200 mg, 3 mL)			9 – 95		
			LC-C18	10 mL de MTBE			<i></i>	
GC×GC-qMS	500 (3 mL min ⁻¹)	NI	acoplado a Oasis HI B (500	10 mL de MeOH	10 mL de		(LI et al., 2017)	
			mg)	ultrapura			2017)	

Tabela 2: (Continuação) Condições de extração para a determinação de AHAs empregando SPE no preparo da amostra.

Rec: Recuperação; AF: Ácido fórmico; NI: Não Informado; UPLC-MS/MS: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Detector por Espectrometria de Massas em Série, do inglês Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry; HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês High Performance Liquid Chromatography; GCxGC-qMS: Cromatografia de Gás bidimensional acoplada ao Detector por Espectrometria de Massa Quadrupolo, do inglês Two-dimensional Gas Chromatography Quadrupole Mass Spectrometry

Quantificação	Volume de amostra (vazão de percolação)	pH da amostra	Cartucho	Condicionamento da amostra	Eluição	Rec. (%)	Referência
			OASIS-HLB (500 mg, 6 mL)			45 - 93	
			Bakerbond SDB (200 mg, 6 mL)	5 ml MeOH		42 -100	
GC-MS/MS	1000 < 2 (5 mL min ⁻¹) < 2		Strata_SDB-L (500 mg, 6 mL) LiChrolut_EN (200 mg, 6 mL) Bakerbond Carbon (500 mg, 6 mL) Bakerbond C18 (500 mg, 6 mL) Bakerbond C18 (500 mg, 6 mL)	5 ml	4 - 91		
		< 2,0		(10% H ₂ SO ₄ v/v); lavagem com 5 mL água ultrapura acidificada	MeOH acidificado	32 -100	(KINANI et al., 2018)
						47 - 100	
						0 - 27	
			Oasis MAX (60 mg, 3 mL)			45-57	
HPLC-MS/MS	1000 (4 mL min ⁻¹)	6,0	Oasis HLB (500 mg, 6 mL) OASIS MCX (500 mg, 6mL)	6 mL de MeOH 6 mL água ultrapura	MeOH 1% AF	45-57	(HU et al., 2018)
						< 20	

Tabela 2: (Continuação) Condições de extração para a determinação de AHAs empregando SPE no preparo da amostra.

Rec: Recuperação; MIAA: Ácido Mono-Iodoacético; DCAA: Ácido Di-Iodoacético; HPLC-MS/MS: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Espectrometria de Massas, do inglês High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry

A **Tabela 2**, mostra que a SPE é comumente usada em conjunto com técnicas cromatográficas, sendo geralmente a Cromatografia Líquida (LC, do inglês *Liquid Chromatography*). Além disso, as amostras são sempre acidificadas, geralmente com ácido sulfúrico, a valores de pH menores que 6,0. Uma pré-concentração dos AHAs bem-sucedida requer acidificação das amostras, uma vez que a diminuição do pH provoca aumento na concentração das espécies neutras de compostos ácidos, aumentando a quantidade extraída (LANÇAS, 2004). Esta acidificação reduz a dissociação dos AHAs e aumenta a adsorção pelos materiais adsorventes dos cartuchos usados na SPE (NSUBUGA; BASHEER, 2013; HENSON; EMMERT; SIMONE, 2014). Pode-se notar que foram usados uma série de cartuchos de diferentes características como materiais adsorventes poliméricos, com superfícies com suportes a base de sílica e até cartuchos contendo carvão ativado. Embora altas recuperações sejam relatadas, alguns dos estudos obtiveram recuperações menores que 50%, mesmo quando foram usados cartuchos Oasis HLB ou LiChrolut, que contém superfícies poliméricas para favorecer a extração de moléculas pequenas.

3.4.5. Técnicas de determinação dos AHAs

Devido à força ácida e caráter hidrofílico dos AHAs, estes não podem ser quantificados diretamente quando é utilizada a GC. Para determinação por GC, realiza-se uma etapa de derivatização, que trata de uma esterificação de seus grupos carboxílicos que são mais voláteis e menos polares (SILVA, 2010). Na maioria dos casos, usa-se GC-ECD (GAN et al., 2013; MANASFI et al., 2016), devido à alta sensibilidade. Por outro lado, o uso de LC, acoplada a diferentes detectores para a determinação de AHAs também tem chamado a atenção dos pesquisadores. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) é uma das principais técnicas utilizadas na análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis (LANÇAS, 2009).

Com relação às formas de LC, uma das formas empregadas para a separação de AHAs é cromatografia por troca iônica. Esta modalidade é empregada na separação de íons em solução e foi amplamente empregada no passado, porém a maioria de compostos iônicos ou ionizáveis que eram analisados pela cromatografia de troca iônica, vem sendo analisados cada vez mais pela Cromatografia Líquida em Fase Reversa (RP-LC do inglês, *Reversed Phase Liquid Chromatography*), cujas fases estacionárias das colunas cromatográficas são mais estáveis e eficientes do que as de troca iônica (LANÇAS, 2009).

No entanto, a RP-LC apresenta uma limitação relacionada com moléculas polares, que é a baixa retenção desses analitos. Para suprir este inconveniente, é possível o uso da Cromatografia Líquida em Fase Normal (NP-LC, do inglês *Normal Phase Liquid Chromatography*), mas a solubilidade de moléculas polares em fases móveis apolares não aquosas é limitada, restringindo a aplicabilidade desta (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016). Neste sentido, surgiu na década de 90, a Cromatografia de Interação Hidrofílica (HILIC, do inglês *Hydrophilic Interaction Chromatography*), baseada no uso de uma fase estacionária mais polar do que a utilizada em fase reversa e fase móvel contendo água, solução tampão ou uma concentração elevada de solvente orgânico miscível com água (LANÇAS, 2010). Basicamente, trata-se do mesmo uso da cromatografia líquida, mas fazendo uso de uma coluna no modo HILIC, que permite maior retenção de moléculas polares.

A ordem de eluição em um sistema HILIC será praticamente o contrário de um que opera em modo reverso e a retenção é proporcional à polaridade do soluto e inversamente proporcional à polaridade da fase móvel (ALPERT, 1990; LANÇAS, 2010). Alpert (1990) propôs que a separação HILIC estaria baseada na formação de uma camada rica em água na superfície polar da fase estacionária em contraposição a uma fase móvel deficiente em água criando um sistema de extração líquido-líquido. No entanto, o mecanismo de retenção ainda é complexo e alguns cientistas sugeriram que a partição de compostos polares entre a camada enriquecida com água e a fase móvel altamente orgânica é o principal mecanismo de retenção (DINH; JONSSON; IRGUM, 2013; GRECO; LETZEL, 2013; XU et al., 2017). Por outro lado, a adsorção do analito na superfície da fase estacionária, bem como a troca iônica entre o analito carregado e a fase estacionária carregada também são possíveis mecanismos de retenção adicionais (XU et al., 2017).

Na **Tabela 3** são apresentados diferentes trabalhos desenvolvidos para a análise de AHAs, a partir do ano 2009. Pode-se ver que existem trabalhos anteriores focados na utilização de diferentes técnicas, tanto para preparo de amostras quanto para quantificação em diferentes tipos de águas.

Tipo de amostras	LOD (µg L ⁻¹)	Concentração detectada (µg L ⁻¹)	Preparo de amostra	Quantificação	Referência
Água tratada	2	0,30 - 81,3	LLE	GC-ECD	(GAN et al., 2013)
Água potável	0,02 - 0,30	6,5 – 7,3	Headspace	HS-GC-MS	(SERRANO et al., 2015)
Água de piscina	2	73,3 e 144,3	LLE	GC-ECD	(FONT-RIBERA et al., 2016)
Piscina de água doce Piscina de água	MCAA: 1,2; MBAA: 0,9; DCAA: 0,7; TCAA: 0,5; BCAA: 0,5; DBAA: 0,4; DCBAA: 0,6; DBCAA:	DCAA 23,0; TCAA 461,1; BCAA 2,4; DBAA 1,7; DCBAA 7,3; DBCAA 2,7 3,5 ≤ BCAA ≤ 4,8; 62,8 ≤ DBAA < 72.0; 2.7 < DBCAA	LLE	GC-ECD	(MANASFI et al., 2016)
do mar	0,5; IBAA: 1,0	$\leq 3,5; 35,6 \leq TBAA \leq 53,2$			
Reservatórios de água		133,2 – 250,9	LLE	GC-ECD	(ZHAI et al., 2017)
Água potável	50	LOD – 170	LLE	GC-ECD	(PALUMBO et al., 2018)
Água potável	MCAA e TCAA: 1; MBAA: 0,5; BCAA, DCAA, DBAA, BDCAA: 5; TCAA: 1; DBCAA: 10	MBAA ≈ 3,8 – 5,2; DCAA ≈ 4.8 – 26; DBAA 7,6 – 28; BCAA: 8,1 – 13,2; TCAA: 1,3 – 14; DCBAA: 2,8 – 5,9; DBCAA: 12 – 15	LLE	GC-NCI-MS	(POSTIGO et al., 2018)

Tabela 3: Diferentes métodos usados para a determinação de AHAs em diferentes tipos de amostras de águas, apresentados em ordem cronológica e agrupados por técnicas de preparo de amostra.

GC-NCI-MS: Cromatografia Gasosa com Ionização Química Negativa acoplado ao Detector de Espectrometria por Massas, do inglês Gas Chromatography with Negative chemical ionization with Mass Spectrometry; HS-GC-MS: Cromatografia Gasosa por Headspace acoplada ao Detector de Espectrometria de Massas, do inglês Headspace Gas Chromatography with Mass Spectrometry

Tabela 3: (Continuação) diferentes métodos usados para a determinação de AHAs em distintos tipos de amostras de águas, apresentados em ordem cronológica e agrupados por técnicas de preparo de amostra.

Tipo de amostras	LOD (µg L ⁻¹)	Concentração detectada (µg L ⁻¹)	Preparo de amostra	Quantificação	Referência
Diferentes pontos na rede de água potável	1,0	< LOD, mas na época do verão alcançaram concentrações de 50	LLE	GC-ECD	(BEAUCHAMP et al., 2018)
Água potável	0,33 AHAs, exceto MCAA: 0,67	5,2 – 129	LLE	GC-MS	(STEFÁN et al., 2019)
Água tratada		3,42 - 82,1	LLE	GC-ECD	(YU et al., 2019)
Água de reagente	0,005-0,2	9,36	LLE	HS-GC	(ZHANG et al., 2019b)
Água engarrafada e de torneira		0,05 – 0,57	DLLME	GC-MS	(AL-SHATRI; NUHU; BASHEER, 2014)
Água de piscina Água da torneira Água de rio	0,04 – 0,31	DCAA: 33.5; DBAA 0.5 e TCAA 42 DBAA: 0,4; TCAA:0,80 AHAs totais: 0.5	SPE	Íon par LC-MS/MS	(PRIETO-BLANCO et al., 2012)
Água de piscina	0,001 – 0,092	7,1 a 48,6	SPE modificada	HPLC-UV	(NSUBUGA; BASHEER, 2013)

HS-GC: Cromatografia Gasosa por Headspace, do inglês Headspace Gas Chromatography; IC-ICP-MS: Cromatografia de íons acoplada com Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente, do inglês *Ion Chromatography (IC) coupled with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*

Tipo de amostras	LOD (µg L ⁻¹)	Concentração detectada (μg L ⁻¹)	Preparo de amostra	Quantificaçã o	Referência
Água potável	0,08 – 2,73 (n=7)		ID	UPLC -HILIC	(CHEN; CHANG; WANG, 2009)
Água potável	0,15 – 1,5	0,1-100	ID	UPLC- MS/MS	(LUO et al., 2013)
Água de mar e Água tratada		54 ≤ ug L ⁻¹ ≤ 223	ID	IC-ICP-MS	(SHI; QIANG; ADAMS, 2013)
Água tratada com cloro por 24 horas	MCAA, DBCAA, TBAA: 1,7 DCBAA, MBAA, DCAA, DBAA, TCAA: 0,7 BCAA: 0,3	MCAA: 1,4; DCAA 5,71; TCAA 4,24 DBAA 3,54	ID	IC 2D	(VERREY et al., 2013)
Água tratada	0,4 - 0,9	< 5	SIA	SIA-PCR-IC	(HENSON; EMMERT; SIMONE, 2014)
Fontes de água Água de piscina	AHAs: 1,0	DCAA: 3,0; TCAA: 21,0 MCAA: 10,8; DCAA: 53,4; TCAA: 95,6	ID	IC-MS	(RIGHI et al., 2014)
Água da torneira Água engarrafada	0,30 - 0,64	DBAA 1,36 e TCAA 0,53 DBAA: 0,87 e1,35; TCAA: 1,14	ID	IC	(BOON; FONG; LI, 2015)
Aguas superficiais		DBAA: 0,73			

Tabela 3: (Continuação) diferentes métodos usados para a determinação de AHAs em distintos tipos de amostras de águas, apresentados em ordem cronológica e agrupados por técnicas de preparo de amostra.

IC 2D: Cromatografia de Íons Bidimensional com Condutividade Suprimida, do inglês *Two-dimensional Ion Chromatography with suppressed conductivity;* UPLC-MS/MS: Cromatografia Liquida de Ultra Eficiência acoplada ao Detector por Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry;* HILIC: Cromatografia de Interações Hidrofílicas, do inglês Hydrophilic Interaction Chromatography; SIA-PCR-IC: Análise de Injeção Sequencial acoplado Cromatografia de Íon de Reação Pós-Coluna, do inglês *Sequential Injection Analysis (SIA) with Post-Column reaction Ion Chromatography* **Tabela 3:** (Continuação) diferentes métodos usados para a determinação de AHAs em distintos tipos de amostras de águas, apresentados em ordem cronológica e agrupados por técnicas de preparo de amostra.

Tipo de amostras	LOD (µg L ⁻¹)	Concentração detectada (μg L ⁻¹)	Preparo de amostra	Quantificação	Referência
Água potável	0,33-1,60	≈ 5	ID	UPLC-MS/MS	(ROSA; ROMÃO; FELISBERTO, 2015)
Água tratada	MCAA: 0,05; MBAA, DCAA, DCBAA, DBCAA, TBAA: 0,01; BCAA, DBAA: 0,02; TCAA: 1,0	LOD ≤ µg L ⁻¹ ≤ 10,60	ID	HPIC-MS/MS	(XUE et al., 2016)
Água tratada	0,026 - 0,188	DCAA: <lod-2,56 BCAA: <lod- 1,79<br="">DBAA: <lod-0,87 TCAA: <lod -1,53<br="">DCBAA: <lod-0,86 TBAA:<lod-2,25< td=""><td>ID</td><td>IC-MS/MS</td><td>(BRUZZONITI et al., 2019)</td></lod-2,25<></lod-0,86 </lod></lod-0,87 </lod-></lod-2,56 	ID	IC-MS/MS	(BRUZZONITI et al., 2019)
Água tratada	0,01-0,06	< LOD	ID	LC-MS/MS Quantum	(PLANAS et al., 2019)
Água potável	0,050-2,0	0,356 to 24,9 μg/L por MCAA, DCAA, DBAA, TCAA e BDCAA,	ID	UPLC-MS e HRMS e Semi-target e target screening	(WANG et al., 2020)

HRMS: Alta resolução acoplado ao Detector por Espectrometria de Massas, do inglês, *High Resolution with Mass Spectrometer;* UPLC-MS/MS: Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Detector por Espectrometria de Massas em Série, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry;* HPIC-MS/MS: Cromatografia de Íons de Alta Eficiência acoplada ao Detector por Espectrometria de massas em série, do inglês *High Performance Ion Chromatography tandem Mass Spectrometry*

A **Tabela 3**, mostra que foram obtidos limites abaixo dos LMCs estabelecidos pelas regulamentações em alguns estudos para água potável. LODs de 0,4 a 50 μ g L¹ foram obtidos usando LLE e GC-ECD e de 0,33 a 0,67 μ g L⁻¹ usando HS-GC-MS. Empregando SPE e LC-MS/MS foram obtidos LODs de 0,001 a 0,31 μ g L⁻¹; e usando ID e LC-MS/MS de 0,01 a 1,60 μ g L⁻¹, e ID e IC de 0,01 a 1,70 μ g L⁻¹.

Sobre a ocorrência destes compostos, Palumbo et al. (2018) encontraram concentrações maiores que os LMCs permitidos (até 170 µg L⁻¹) em pontos de coleta mais distante da ETA (PALUMBO et al., 2018) usando LLE e GC-ECD. No trabalho de Yu et al. (2019), concentrações de 3,42 a 82,1 µg L⁻¹ foram detectadas em água potável usando LLE e GC-ECD (YU et al., 2019). Prieto et al. (2012) encontraram concentrações menores que os LMCs usando SPE e LC-MS/MS (PRIETO-BLANCO et al., 2012); Luo et al. (2013) encontraram concentrações entre 0,1 e 100 µg L⁻¹ em água potável usando ID e UPLC-MS/MS (LUO et al., 2013); enquanto que implementando ID e IC com diferentes detectores foram encontradas concentrações menores aos LMCs permitidos (HENSON; EMMERT; SIMONE, 2014; BOON; FONG; LI, 2015; XUE et al., 2016).

3.5. Validação de métodos analíticos cromatográficos

A validação é considerada a etapa de verificação que os requisitos especificados são adequados para um uso determinado. A validação deve ser tão ampla quanto seja necessário para satisfazer as necessidades do tipo e campo de aplicação. As figuras de mérito são os indicadores quantitativos do escopo e da adequada execução das técnicas analíticas implementadas. São avaliadas de acordo com a finalidade de aplicação do método, sendo descritas abaixo as utilizadas neste trabalho:

- Seletividade
- ✓ Linearidade/Faixa de trabalho/Faixa linear de trabalho/Sensibilidade
- Limite de Detecção (LOD)
- Limite de Quantificação (LOQ)
- ✓ Recuperação
- ✓ Precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade)

3.5.1. Curva analítica e linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é sua a habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (INMETRO, 2020). O extremo inferior do intervalo do trabalho é determinado pelo LOQ e o extremo superior é definido pelas concentrações nas quais são observadas anomalias relacionadas à sensibilidade analítica (MAGNUSSON e ÖRNEMARK, 2014). Entre o LOQ e o extremo superior do intervalo do trabalho do instrumento, a resposta deste segue uma relação conhecida, por exemplo, relação linear.

Durante a validação é necessário pelo menos i) confirmar esta relação e ii) demonstrar que o intervalo do trabalho do instrumento é compatível com a faixa indicada. O intervalo de trabalho e a linearidade do método são avaliadas mediante uma inspeção visual do gráfico, com a ajuda de estatísticas e um gráfico de resíduos de uma regressão linear (MAGNUSSON e ÖRNEMARK, 2014).

3.5.2. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O LOD de um procedimento analítico individual é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio. O LOD para um procedimento analítico pode variar em função do tipo da amostra. É fundamental assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção. Já o LOQ é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (INMETRO, 2020).

3.5.3. Precisão

A precisão é uma medida de quão próximos estão os resultados uns dos outros. Pelo geral, é expressa mediante parâmetros estatísticos que descrevem a propagação dos resultados, tipicamente como desvio padrão, calculada a partir dos resultados obtidos mediante a realização de medições repetidas de um analito em condições específicas (INMETRO, 2020). A repetibilidade é uma medida da variabilidade nos resultados quando a medição é feita pelo mesmo analista, nas mesmas condições, em um mesmo equipamento em um curto prazo de tempo. Pode-se referir a precisão dentro de uma série de medidas ou intra-ensaio. A precisão intermediária, é uma medida da variabilidade quando as medições são realizadas pelo mesmo laboratório, mas em condições que são mais variáveis que as usadas na repetibilidade. O objetivo é obter uma estimativa da precisão que reflete todas as fontes de variação que podem ocorrer no laboratório em condições de rotina (diferentes analistas, períodos de tempo prolongado, diferentes equipamentos, etc).

3.5.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados obtidos individualmente em um determinado experimento em comparação com um valor de referência aceito como verdadeiro (SANTE, 2019). A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas do mesmo (*spike*). As amostras podem ser fortificadas com o analito em pelo menos três diferentes concentrações (baixa, média e alta) da faixa de uso do método (INMETRO, 2020).

Uma determinação prática da exatidão é baseada na comparação da média dos resultados (\underline{x}), do método com um valor de referência adequado ($\underline{x}ref$). Existem três enfoques gerais i) análises de materiais de referência (MR) e/ou materiais de referência certificados (MRC), ii) comparação com resultados obtidos mediante outro método (ensaios interlaboratoriais) e iii) experimentos de recuperação usando amostras fortificadas.

O desenvolvimento experimental consistiu na validação de métodos seguindo recomendações da QAV para a determinação de AHAs clorados e bromados em amostras de águas de abastecimento. Foram usadas as técnicas ID e SPE como preparo de amostras. A quantificação foi feita por LC-MS/MS. O trabalho foi realizado no Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM) da Escola de Química e Alimentos (EQA), na Universidade Federal do Rio Grande (FURG), onde foram realizadas as etapas de determinação e quantificação dos analitos.

4.1. Instrumentação

A instrumentação necessária ao desenvolvimento do trabalho consistiu de:

- ✓ Micropipetadores automáticos com capacidade variável (100 1000 µL) Labmate (Varsóvia, Polônia);
- ✓ Bomba à vácuo Tecnal TE-058 (Piracicaba, Brasil);
- ✓ pHmetro Hanna pH20/21 eletrodo de vidro combinado (São Paulo, Brasil);
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q Direct-Q UV3[®], Millipore (Bedford, EUA);
- ✓ Sistema Manifold AH0-6023 para SPE Phenomenex (Torrance, USA);
- ✓ Cuba de ultrassom Cristófoli (Paraná, Brasil);
- ✓ Cromatógrafo a líquido Alliance Separations Module 2695 Waters (Milford, EUA) equipado com: Amostrador automático, bomba quaternária, forno para coluna e sistema de desgaseificação. Detector MS, Micromass® Quatro Micro™ API Waters (Milford, EUA) com fonte API, com ionização por Electrospray; sistema de aquisição de dados através do software MassLynx e QuanLynx 4.0 Waters (Manchester, Inglaterra);
- ✓ Gerador de nitrogênio Peak Scientifics Instruments Ltda. (Escócia, Inglaterra);
- ✓ Coluna HPLC Luna 3,0 µm HILIC (200 Å, 100 x 3,0 mm) Phenomenex (Torrance, EUA);
- ✓ Coluna C8 2,6 µm Kinetex (100Å, 50 x 3,0 mm) Phenomenex (Torrance, EUA);

- ✓ Coluna Obelisc N 5 µm (100Å, 150 x 4,6 mm) SIELC (Wheeling, EUA);
- ✓ Sorvente C18, 500 mg, 6 mL Supelco, Phenomenex (Torrance, EUA);
- ✓ Sorvente polimérico Strata[™]-X 33 µm, 200 mg, 3 mL, Phenomenex (Torrance, EUA);
- ✓ Sorvente Oasis[®] HLB, 500 mg, 6 mL Water (Milford, EUA);
- ✓ Sorvente Bond Elut Plexa PAX, 200 mg, 6 mL Agilent Technologies (California, EUA);
- ✓ Membrana filtrante de nylon 0,45 µ Sartorius (Alemanha);
- ✓ Vidraria em geral (balões, béquer, vial, etc).

4.2. Solventes, reagentes e padrões analíticos

- ✓ Acetonitrila (MeCN), grau HPLC J.T Baker (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Metanol (MeOH), grau HPLC J.T Baker (Mallinckrodt, EUA);
- ✓ Ácido fórmico (AF) puro, 99% Merck;
- ✓ Formiato de amônio (FA) 1 mM;
- ✓ Ácido sulfúrico puro (H₂SO₄), 96% de pureza, Merck;
- ✓ Água ultrapura (Resistividade 18,2 M Ω cm⁻¹);
- ✓ Detergente Extran® neutro, Merck (Rio de Janeiro, Brasil);
- ✓ Padrão analíticos de Mix de AHAs 1000 mg L⁻¹: MCAA, DCAA, MBAA, DBAA, TCAA, TBAA, BCAA, DBCAA, DBCAA em MTBE (Metil Terc-Butilico), Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil);
- ✓ Gás argônio analítico 5.0 usado como gás de colisão no sistema LC-MS/MS, White Martins (Brasil).

4.3. Limpeza da vidraria

As vidrarias empregadas nesse estudo, foram lavadas primeiramente com água da torneira, seguido do enxágue com água destilada. Posteriormente, foram mergulhadas em detergentes de extran neutro 5% durante 24h e enxaguadas novamente com água da torneira, água destilada e acetona ou álcool etílico grau P.A.

Os frascos tipo *vials* foram lavados com água da torneira seguidos de água destilada e colocados no banho de ultrassom com MeOH 15%. Após, foram lavados com água destilada pelo menos 5 vezes e rinsados com acetona ou álcool etílico grau

P.A. Posteriormente foram secos em estufa a 50 °C, com exceção da vidraria volumétrica e armazenados em ambiente limpo e fechado.

4.4. Escolha dos analitos

Os AHAs estudados foram selecionados de acordo com uma revisão bibliográfica prévia relacionada com as ocorrência e formação nas águas de abastecimento público tratadas com cloro e também os que fazem parte do monitoramento da USEPA: MCAA, MBAA, DCAA, DBAA, BCAA, TCAA, TBAA, DBCAA, DCBAA (USEPA, 2018; KIM et al., 2020).

4.5. Preparo das soluções analíticas

A partir dos padrões analíticos, contendo 1000 mg L⁻¹ de uma mistura de AHAs (Mix), foi preparada em MeCN uma solução estoque de concentração de 40 mg L⁻¹ sendo posteriormente armazenada a temperatura de 4 °C. A partir desta solução foi preparada uma solução individual na concentração de 0,5 e 1 mg L⁻¹ utilizada no estabelecimento das condições cromatográficas.

Também foi preparada uma solução de 10 mg L⁻¹ preparada a partir do padrão analítico de 1000 mg L⁻¹ em MeCN, sendo utilizada no preparo das curvas analíticas, assim como na padronização e validação do método.

4.6. Amostras de água para validação de métodos

As amostras de água utilizadas para a validação dos métodos, foram coletadas da torneira do laboratório. Foram utilizadas essas amostras, devido às características semelhantes às amostras para posterior aplicação do método. Com este tipo de amostras é possível avaliar substâncias que podem interferir na quantificação por LC-MS/MS.

Um branco destas amostras, ou seja, sem adição de padrão dos AHAs, foi analisado para verificação da possível presença de alguns dos analitos e eliminar falsos positivos durante o processo de extração e quantificação. Quando detectado a presença de algum dos AHAs neste branco, foi descontado o sinal do branco dos sinais obtidos nas amostras.

4.7. Condições do sistema cromatográfico LC-MS/MS

Para as determinações cromatográficas foi usado um cromatógrafo a líquido como descrito na seção 4.1. No LC-MS/MS foram definidas as principais condições para a separação e detecção dos AHAs.

4.7.1. Infusão no espectrômetro de massas

Para otimizar as condições do espectrômetro de massas (MS) foram feitas infusões diretas de uma solução estoque 0,5 e 1 mg L⁻¹ do Mix AHAs, e 1 mg L⁻¹ de TCAA dissolvidos em MeCN. Nesta etapa foram avaliadas as transições (m/z) a serem monitoradas, o modo de ionização (*electrospray* positiva e/ou negativa), voltagem do capilar, a voltagem do cone para selecionar o íon precursor e a energia de colisão para fragmentar o íon precursor e gerar íons produtos.

4.7.2. Escolha da coluna cromatográfica

Após a infusão no MS, foram escolhidas colunas de separação cromatográfica baseados nos mecanismos de interações entre a fase estacionária e os analitos. As colunas cromatográficas testadas são apresentadas na **Tabela 4**, e foram avaliadas a temperatura da fonte de íons, temperatura e a vazão do gás de dessolvatação para secagem do solvente.

Coluna analítica	Modo de	Fase móvel	Fase
	separação	A	móvel B
C8 2,6 µm Kinetex (100Å, 50 x 3,0 mm)	FR	H ₂ O 0,1% CH ₃ COOH	MeCN
Obelisc N 5 µm (100Å,	FN, FR,	Tampão formiato (pH 3,0 e	MeCN
150 x 4,6 mm)	HILIC	4,1)	
HPLC Luna 3,0 µm HILIC (200 Å, 100 x 3,0 mm)	Interação HILIC	Água ultrapura 0,1% AF em água ultrapura Tampão formiato (pH 3,0; 4,1; 6,3) Água ultrapura pH 8,0	MeCN

Tabela 4: Colunas analíticas testadas

FR: Fase reversa; FN: Fase normal: HILIC: Interação hidrofílica; CH₃COOH: Ácido acético; AF: Ácido fórmico; FA: Formiato de amônio; MeCN: Acetonitrila

4.7.3. Preparo e escolha da fase móvel

Após definidas as condições no MS, foi feito um estudo para determinar a fase móvel mais adequada para a separação cromatográfica, usando como resposta a área dos picos cromatográficos. A fase móvel ideal depende das características de polaridade dos analitos e das características dos solventes utilizados.

Para a definição da composição da fase móvel, na separação cromatográfica foram testadas misturas contendo diferentes proporções de diferentes solventes, utilizando água ultrapura acidificada com ácido acético 0,1%, água ultrapura acidificada com ácido fórmico 0,1%, MeCN, água ultrapura, tampão formiato (pH 3,0; 4,1; 6,3; e 8 (pela adição de NH₄OH)) e solução tampão sem modificador. Posteriormente foram avaliados diferentes gradientes de eluição, e foi avaliado o *dwell time* na faixa de 0,01 - 0,2 s, a fim de escolher as condições que resultassem em melhor distribuição dos AHAs no decorrer da análise.

Os solventes utilizados foram preparados individualmente, filtrados à vácuo através de membranas de nylon de 0,45 µm e desgaseificados em ultrassom durante 30 minutos à temperatura ambiente, sendo armazenados em frascos próprios para solventes e rotulada com informações específicas a sua composição e pH. A vazão da fase móvel foi avaliada considerando a separação cromatográfica dos AHAs, e variou entre 0,2 e 0,5 mL min⁻¹.

4.8. Preparo das amostras

4.8.1. Sistema de Injeção Direta

O sistema de ID consistiu basicamente na coleta da amostra de água diretamente da torneira do LACOM. Posteriormente foi medido o pH da amostra em pHmetro e ajustado com ácido fórmico de acordo com o pH otimizado, estando pronta para injeção no sistema cromatográfico.

4.8.1.1. Avaliação do pH na Injeção Direta (ID)

Para a avaliação da ID foram determinadas amostras sem ajuste de pH (pH aproximadamente de 6,0) e com ajuste de pH 4,1 (mesmo pH da fase móvel). A

avaliação foi realizada através do preparo de curvas de calibração, feitas com as amostras descritas anteriormente. Para definir qual é o melhor valor de pH para análise das amostras, foram verificados o coeficiente de correlação linear (r) e os valores de Limite de Quantificação Instrumental (LOQi) obtidos em cada valor de pH. Estas etapas são representadas mais detalhadamente no fluxograma da **Figura 5**.





4.8.2. Condições da Extração em Fase Sólida (SPE)

Com o objetivo de obter melhor detectabilidade dos AHAs foi estudada e avaliada a técnica de extração e pré-concentração, SPE. As etapas avaliadas na SPE são representadas no fluxograma da **Figura 6**.

Figura 6: Fluxograma representativo das etapas envolvidas no estabelecimento das condições das amostras aquosas por SPE.

Cartucho								
Oasis HL	3	Strata [™] -X		C18	Plexa (pH 4 e 1)			
		Solvent	e de eluiç	ão				
Fase móvel	MeOH	MeOH 1% AF	MeCN	MeCN 1% AF	MeOH:MeCN 1% AF			
			\bullet					
Volume do solvente de eluição								
	1, 2, 3 e 4 mL							

AF: Ácido fórmico; MeCN: Acetonitrila; MeOH: Metanol

4.8.2.1. Volume e pH da amostra

O volume de amostra foi fixado em 250 mL para proporcionar um fator de concentração alto. Além disso, o pH da amostra também foi fixado em um valor de pH de 1,0 com base em estudos prévios (PRIETO-BLANCO et al., 2012; HENSON; EMMERT; SIMONE, 2014; POSTIGO; EMILIANO; VALERO, 2020) e o caráter ácido dos AHAs. Esse ajuste foi feito com ácido sulfúrico concentrado 96%.

4.8.2.2. Solvente de condicionamento

O solvente de condicionamento empregado foi fixado no mesmo solvente usado para eluição, e o valor de pH da água utilizada para condicionamento foi referente ao pH empregado nas amostras. Estas escolhas foram realizadas levando em consideração estudos prévios e as propriedades dos AHAs (PRIETO-BLANCO et al., 2012; KADMI et al., 2016).

4.8.2.3. Escolha do material adsorvente

Para a escolha do material adsorvente foram considerados aqueles usados ou referenciados nos artigos de revisão do estado da arte da SPE como preparo de amostra de AHAs, aqueles usados para moléculas polares e aqueles disponíveis no LACOM. Além disso, foram consideradas as características dos analitos e a capacidade de interação de cada sorvente.

Foram avaliados diferentes cartuchos contendo diferentes materiais adsorventes, sendo eles: C18 (500 mg, 6 mL), Strata[™]-X (200 mg, 3 mL), Oasis HLB (500 mg, 6 mL), Bond Eluent Agilent Simple Plexa (200 mg, 6 mL) em dois valores diferentes de pH (4,0 e 1,0). Na **Tabela 5** são apresentadas as principais características dos cartuchos testados para a extração dos analitos.

Cartuchos	Base	Mecanismo de retenção	Características principais
C18	Sílica unida a um grupo octadecil (18% C)	FR	Oferece ótimas recuperações Retém a maioria de analitos orgânicos de matrizes aquosas
Strata ™-X	Polimérica funcionalizado em fase reversa	FR	Elimina fosfolipídios e partículas interferentes na amostra Simples método para extração de analitos presentes em amostras aquosas como água potável, água residual ou solos Permite ampla faixa de aplicação
Oasis® HLB	Polimérica de poli (divinilbenzeno-co-N- vinilpirrolidona)	FR	Alta capacidade de retenção de analitos Ideal para analitos ácidos, básicos e neutros Estável pH 0-14
Bond Elut Plexa PAX	Polimérica com uma superfície não retentiva, hidroxilada, livre de amidas, núcleo apolar de PS-DVB	Mecanismo de retenção não polar	Alto rendimento na limpeza de analitos Alta reprodutibilidade para analitos ácidos polares e apolares Permite controlar as cargas de intercâmbio aniônico com alta reprodutibilidade Rendimento mais sólido Alta seletividade do analito Reduz o tempo do método Retenção de moléculas pequenas

Tabela 5: Cartuchos utilizados para a pré-concentração dos AHAs.

FR: Fase Reversa; C: Carbono; PS-DBV: Poli (estireno-divinilbenzeno)

Os cartuchos foram condicionados com 3,0 mL de MeCN e 3,0 mL de água ultrapura acidificada (pH 1,0). Um volume de 250 mL de água da torneira fortificada na concentração de 4,0 μ g L⁻¹ acidificada (pH 1,0) foi percolada através dos sorventes a uma vazão de 5,0 mL min⁻¹. A eluição dos AHAs retidos nos cartuchos foi feita com 2,0 mL (2 x 1000 μ L) de fase móvel (MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)). Cabe ressaltar que o cartucho Plexa foi também avaliado com acidificação de amostra em pH 4,0 pelas recomendações do fabricante.

4.8.2.4. Escolha do solvente de eluição

Para a escolha do solvente extrator (eluente) foram considerados os solventes usados em estudos prévios e a fase móvel (MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)), MeOH, MeCN, MeOH 1% AF, MeCN 1% AF e a mistura de MeCN:MeOH (90:10, v/v) 1% AF.

4.8.2.5. Escolha do volume do solvente extrator

Para a escolha do volume do solvente extrator foram definidos diferentes volumes de 1, 2, 3 e 4 mL.

Neste teste os cartuchos foram condicionados com 3,0 mL do mesmo solvente empregado para eluição e 3,0 mL de água ultrapura acidificada (pH 1,0). Um volume de 250 mL de água da torneira acidificada (pH 1,0) fortificada na concentração de 2,0 μ g L⁻¹ para a eluição com 1 mL, 4,0 μ g L⁻¹ para a eluição com 2 mL, 6,0 μ g L⁻¹ para a eluição com 3 mL, e 8,0 μ g L⁻¹ para a eluição com 4 mL foi percolado através do sorvente Strata TM-X a uma vazão de 5,0 mL min⁻¹. A eluição dos analitos retidos nos cartuchos foi feita com 1 mL (2 x 1000 μ L), 2,0 mL (2 x 1000 μ L), 3 mL (3 x 1000 μ L) e 4 mL (4 x 1000 μ L) de MeCN.

4.8.2.6. Avaliação da recuperação (R (%)) e efeito matriz (EM)

As melhores condições foram escolhidas baseadas na quantidade de analitos recuperando dentro da faixa de 50 a 120%, e avaliação do EM na concentração de 0,5 mg L⁻¹.

A R (%) foi avaliada pela relação entre as áreas das amostras fortificadas e amostras sem fortificação, conforme a Equação 3.

$$R(\%) = \left(\frac{A1-A2}{A3}\right) X100$$
 (3)

Onde,

 A_1 , representa a área dos analitos nas amostras fortificadas;

A₂, representa a área em amostras sem fortificação, e

 A_3 , representa a área dos analitos correspondente à concentração adicionada às amostras.

O EM foi avaliado pela relação entre as áreas dos picos dos analitos no extrato da matriz e no solvente, conforme a Equação 4.

$$EM = \frac{A_{(PE)} - A_{(PS)}}{A_{(PS)}} * 100$$
 (4)

Onde:

 $A_{(PE)}$, corresponde à área dos picos dos analitos no extrato;

 $A_{(PS)}$, corresponde à área dos analitos no solvente.

4.9. Validação do método analítico

Após a definição das melhores condições do sistema cromatográfico e das condições de extração foi feita a validação dos métodos propostos (análise por ID e determinação por LC-MS/MS e extração por SPE e determinação por LC-MS/MS). Neste trabalho foi avaliada a curva analítica, linearidade, LOD, LOQ, exatidão (recuperação), precisão (repetitividade e precisão intermediária) e efeito matriz (EM) (SANTE, 2019; INMETRO, 2020).

4.9.1. Curva analítica e linearidade

Foram feitas curvas analíticas no solvente (MeCN) e no extrato como apresentado na Tabela 6.

Níveis de concentração	Concentração (µg L ⁻¹)	Vol. (µL) solução estoque	Vol. (µL) MeCN/Extrato
1	0,5	100 (0,005 mg L ⁻¹)	900
2	1,0	100 (0,01 mg L ⁻¹)	900
3	5,0	100 (0,05 mg L ⁻¹)	900
4	10,0	100 (0,1 mg L ⁻¹)	900
5	50,0	100 (0,5 mg L ⁻¹)	900
6	100,0	100 (1,0 mg L ⁻¹)	900
7	250,0	25 (10 mg L ⁻¹)	975
8	500,0	50 (10 mg L ⁻¹)	950
9	1000,0	100 (10 mg L ⁻¹)	900
10	2000,0	200 (10 mg L ⁻¹)	800

Tabela 6: Detalhes de preparação das curvas analíticas no solvente (MeCN) e no extrato.

MeCN: Acetonitrila

A curva analítica para os AHAs foi construída com um total de pelo menos 10 níveis de concentração 10, 50, 100, 500, 750, 1000, 1125, 1250, 1500 e 2000 μ g L⁻¹ para as análises por ID sendo que foi considerado extrato a água da torneira, e solvente água ultrapura. A curva analítica para análises por SPE foi 10; 50; 100; 250; 500; 625; 750; 825; 1000; 1125; 1250 e 2000 μ g L⁻¹ com um fator de concentração de 125, sendo considerado o extrato do branco e solvente MeCN.

Cada solução foi injetada em triplicata no equipamento, e o gráfico da área do pico versus a concentração obtida foi feito com ajuda do software Masslynx 4.1 (Waters) do equipamento. A partir das curvas analíticas foi avaliado a linearidade do método, avaliando o coeficiente de correlação linear. Antes de fazer a regressão, foi verificada a ausência de valores discrepantes para cada nível de concentração pelo gráfico de resíduos no software do equipamento. A seguinte equação mostra como é obtido o coeficiente de correlação linear:

$$y = ax + b (5)$$

Onde:

y, corresponde à área do pico cromatográfico a ser calculado;

a, corresponde ao coeficiente angular da curva analítica;

b, corresponde ao coeficiente linear da curva analítica;

x, corresponde à área do pico cromatográfico calculado.

Para ID foi utilizado o método de calibração externa, usando o padrão Mix dos AHAs para construir a curva analítica **(Tabela 6)**, onde são observadas respostas de um método analítico a concentrações conhecidas do analito (HARRIS, 2010). Para SPE o método de calibração utilizado por diluição da adição de padrão (DSAC, do inglês *Dilution standard addition calibration*) (**Figura 7**). Esse método consiste no preparo de uma amostra equivalente à última concentração da curva ou uma concentração um pouco acima, a qual é extraída por SPE. O extrato resultante desta amostra é o padrão usado para as diluições que são realizadas com solvente e branco do extrato de acordo com os níveis desejados na curva analítica (MARTINS et al., 2016). Na **Tabela 7** são apresentados a forma de preparo e os volumes utilizados no preparo desta curva.

Figura 7: Extração do padrão usado na calibração por DSAC.



Tabela 7: Detalhes de preparo de soluções de calibração analítica para o método DSAC proposto para determinação de AHAs em água por SPE e LC–MS/MS.

	Níveis de concentração	Concentração (µg L-¹)	Extrato fortificado (μL)	Branco (μL)	Concentração injetada no LC-MS/MS
	1	0,08	5	995	10
	2	0,20	25	975	50
	3	0,80	50	950	100
	4	2,00	125	875	250
DSAC	5	4,00	250	750	500
	6	5,40	312,5	687,5	625
	7	6,00	375	625	750
	8	6,60	412,5	587,5	825
	9	8,00	500	500	1000
	10	9,00	562,5	437,5	1125
	11	10,00	625	375	1250
	12	16,00	0	0	2000

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas em série, do inglês *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*

4.9.2. LOD e LOQ

Para a detecção do LOD e LOQ instrumental (LOD_i e LOQ_i) foi considerada a relação sinal/ruído (S/N), utilizada em procedimentos analíticos que apresentam ruído de linha de base como é o caso da cromatografia. Essa relação S/N foi detectada com ajuda do software do equipamento MassLynx 4.1 (Waters).

O LODi foi estimado com a relação S/N de 3:1, usando a Equação 6:

$$LOD_i = \frac{3,3 s}{b}$$
(6)

O LOQi foi estimado com a relação S/N de 10:1, usando a Equação 7:

$$LOQ_i = \frac{10 s}{b} \quad (7)$$

Na determinação dos LOD_i e LOQ_i na ID, a relação S/N foi medida em padrões preparados na amostra de água da torneira. Para as análises do método empregando SPE, os padrões preparados pela curva DSAC foram empregados para medir a relação S/N. O LOQ do método (LOQ_m) foi determinado considerando o fator de concentração de 125 vezes (250 mL de amostra/2 mL de extrato), portanto, $LOQ_m = \frac{LOQi}{125}$. Os limites estabelecidos foram comprovados experimentalmente.

4.9.3. Exatidão

A exatidão (recuperação) foi determinada em 5 níveis de recuperação para cada analito, pela adição de concentrações conhecidas do padrão analítico nas amostras no início do processo.

Para a ID, foram preparadas fortificações na amostra de água da torneira no pH ideal com adição de volumes a partir de soluções estoques de 1 e 10 mg L⁻¹ para obter os níveis de fortificação desejados para cada analito: 10, 50, 100, 500, 750 e 1000 μ g L⁻¹. Para a análise por SPE, foram usadas as amostras descritas no item 4.7. Assim, foram preparadas fortificações direto no balão usando os volumes adequados para as soluções desejadas de acordo com fator de concentração. Os níveis de fortificações foram: 0,08; 0,40; 0,80; 2,00; 4,00 e 8,00 μ g L⁻¹.

Para calcular a porcentagem de recuperação foi usada a seguinte equação:

$$R(\%) = \frac{Aa - Ab}{Ac} x \ 100$$
 (8)

Onde:

Aa, corresponde à área dos analitos nas amostras fortificadas;

Ab, corresponde à área nas amostras não fortificadas (branco), e

Ac, Corresponde à concentração adicionada nas amostras.

Valores de recuperação entre 50 e 120% são considerados aceitáveis para concentrações de 1 µg L⁻¹ a ng L⁻¹ (INMETRO, 2020).

4.9.4. Precisão

O estudo de precisão do instrumento, e consequentemente da análise por ID, em termos de repetibilidade (RSD_r) foi realizado nas amostras do item 4.6, efetuando nove injeções de cada concentração das soluções analíticas no sistema cromatográfico. O estudo da precisão intermediária (RSD_{pi}) do instrumento foi realizado nas amostras do item 4.6 efetuando nove injeções de cada concentração das soluções avaliadas em dias diferentes. Os níveis de fortificação definidos foram 10, 50, 500, 750 e 1000 µg L⁻¹.

A precisão do método empregando SPE em termos de RSD_r foi obtida mediante a extração por SPE e análise das amostras fortificadas usando as amostras do item 4.7. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicata e injetado em triplicata no instrumento (3 x 3) pelo mesmo analista e nas mesmas condições experimentais. A precisão intermediária foi avaliada nas mesmas condições anteriores em diferentes dias de ensaios. Os níveis de fortificação definidos foram 0,08; 0,40; 0,80; 2,00; 4,00 e 8,00 μ g L⁻¹.

Para calcular o valor da precisão em termos de RSD é usada a Equação 9:

$$RSD(\%) = \frac{s}{\bar{x}} x \ 100$$
 (9)

Onde:

S, corresponde ao desvio padrão absoluto das nove determinações de cada nível de concentração; e

<u>X</u>, Corresponde à média das concentrações na amostra não fortificada (branco) em triplicata.

Métodos que apresentem valores igual ou menor a 30% para concentrações entre 1 μg L⁻¹ e ng L⁻¹ são considerados precisos pelo INMETRO (INMETRO, 2020).

4.9.5. Efeito matriz (EM)

O EM dos métodos foi calculado pela comparação entre os coeficientes angulares (sensibilidade) das curvas analíticas em solvente e no extrato das matrizes. Para a ID, o solvente da curva foi água ultrapura e o extrato a amostra de água da torneira. Para a SPE, o solvente foi MeCN e o extrato foi o extrato resultante da SPE realizada com água da torneira não fortificada.

Para calcular a porcentagem do EM é usada a Equação 10:

$$EM(\%) = \left(\frac{A1-A2}{A2}\right) x \ 100 \ (10)$$

Onde:

 A_1 , corresponde ao coeficiente angular da curva no solvente;

 A_2 , corresponde ao coeficiente angular da curva no extrato.

4.10. Controle da qualidade nas determinações

Para assegurar a qualidade dos resultados, foram realizados alguns procedimentos na rotina da realização das análises. Foram realizadas, em cada dia de trabalho, branco dos reagentes e branco da água ultrapura para verificar a presença de possíveis falsos positivos durante a análise. Também foram utilizados os dois fragmentos de relação massa – carga (m/z) para garantir a identificação e confirmação dos analitos.

4.11. Descrição da área de estudo e amostragem

Na **Figura 8** é apresentado o mapa mostrando os pontos de coleta das amostras de água de abastecimento público no sul do Estado do Rio Grande do Sul. ETAs da Corsan foram definidas de forma a englobar estações de tratamento de água dos municípios de Camaquã, Rio Grande e Santa Vitória do Palmar.

Cabe ressaltar que as ETAs de Camaquã e Rio Grande realizam captação de fontes de água de superfície. O Canal São Gonçalo é o principal manancial utilizado para abastecimento público do município de Rio Grande, que faz parte de um sistema central de ETA do tipo convencional como mostrado na **Figura 1**, incluindo précloração e cloração (ALBERTONI et al., 2017). O Arroio Duro e o Rio Camaquã são

as principais fontes de captação de água na cidade de Camaquã (AUD, 2012). Enquanto que a água subterrânea é o manancial abastecedor de água de abastecimento público no município de Santa Vitória do Palmar (UFRGS, 2014), e recebe apenas processos de cloração antes da distribuição. As amostras foram intituladas com siglas, cidade e local da coleta, e tratamento das águas como descrito na **Tabela 8**.

Nome amostra	Cidade da coleta	Local da coleta	Tratamento da água	
RG1	Rio Grande	Na saída da ETA, logo após o tratamento da água	Tratamento convencional como indicado na Figura 1.	
RG2	Rio Grande	Torneira do laboratório na FURG	Idem RG1	
RG3	Rio Grande	Torneira de residência localizada no bairro Cassino	Idem RG1	
CMQ	Camaquã	Na saída da ETA, logo após o tratamento da água	Tratamento convencional como indicado na Figura 1.	
SVP	Santa Vitória do Palmar	Na saída da ETA, logo após o tratamento da água	Água coletada através de poço que é tratada apenas com processo de cloração antes da distribuição.	

 Tabela 8. Descrição das amostras coletadas.

CMQ: Camaquã; ETA: Estação do tratamento de água; RG: Rio Grande; SVP: Santa Vitória do Palmar

O Rio Grande do Sul está localizado na região Sul, e conta com aproximadamente uma extensão territorial de 281.730,2 km², ocupando mais do 3% do território brasileiro, conta com 497 municípios e 11,3 milhões de pessoas, correspondendo ao 6% da população brasileira. O estado de Rio Grande do Sul encontra-se totalmente inserido nas regiões hidrográficas do Atlântico Sul e Uruguai, e conta com a Companhia Riograndense de Saneamento (Corsan), encarregada de administrar o sistema de água para a maioria dos municípios do estado (IBGE 2020).

O tratamento de águas de superfície feito pela Corsan na maioria das ETAs consta das etapas de captação, adução, gradeamento, bombeamento, mistura rápida,

floculação, decantação, filtração, processo de desinfecção e distribuição, como processos básicos nas ETAs.

Figura 8: Mapa ilustrativo da distribuição dos pontos amostrais nas ETAs Corsan do Rio Grande do Sul.



Fonte: Mapa construído no programa QGIS 3.18 (Autoria Própria)

As amostras foram coletadas, armazenadas em frascos de vidro âmbar com capacidade de 1 L e transportadas ao laboratório LACOM em caixas térmicas à 4 °C e ao abrigo da luz em dezembro de 2020. As amostras foram tratadas com a ID, de acordo com o estabelecido no item da seção 4.8. Foi adicionado tiossulfato de sódio nas amostras coletadas na concentração de 10 mg L⁻¹ para evitar a formação de futuros DBPs (PRIETO-BLANCO et al., 2012; XUE et al., 2016), e as análises foram feitas no mesmo dia da coleta.

4.12. Análise estatística

Os resultados de recuperação obtidos durante o processo estabelecido com as melhores condições da ID e SPE foram avaliados estatisticamente. Antes das análises, visando orientar a escolha dos testes estatísticos, todos os dados foram avaliados quanto à normalidade e homocedasticidade usando os testes de Shapiro Wilk e Levene, respectivamente. As recuperações obtidas a partir do uso do cartucho foram comparadas através de teste T de *Student,* e o tipo e volume de solvente de eluição foram comparadas usando prova estatística paramétrica (ANOVA, seguida do teste Tukey) quando os dados apresentaram distribuições normais e homocedásticos, ou pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, quando estes testes não foram atendidos. As análises estatísticas foram realizadas usando o software Statistica 13.0 StatSoft. Inc., (Tulsa, EUA), usando para todos os testes grau de significância de 5% (p < 0,05).

4.13. Tratamento de resíduos

Os resíduos gerados neste trabalho foram armazenados em frascos de vidro âmbar devidamente rotulados de acordo com as regras definidas pela comissão de resíduos da FURG, sendo armazenados em espaços pré-definidos. Posteriormente, estes foram recolhidos e destinados adequadamente pela empresa encarregada para essa finalidade.

5. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Escolha dos analitos

Na **Tabela 9** são apresentadas a relação dos AHAs estudados, assim como suas respectivas propriedades físico-químicas. Dos nove AHAs que conformam este grupo foram avaliados seis deles: o MCAA, DCAA, MBAA, DBAA, BCAA e DBCAA.

De acordo com os valores de coeficiente de partição *n*-octanol-água (log K_{ow}), AHAs а ordem de polaridade decrescente dos é MCAA>MBAA>BCAA>DBAA>DCAA>TCAA>DCBAA>DBCAA>TBAA. Segundo 0 valor de log Kow, quanto menor, mais polar é considerada a molécula. Os AHAs mono halogenados (MCAA e MBAA) são os mais polares do grupo de estudo (log Kow 0,22 e 0,42; respectivamente). Enquanto aos di halogenados (BCAA, DBAA e DCAA) são menos polares que os anteriores apresentando log Kow de 0,61; 0,70 e 0,92, respectivamente. E os tri halogenados (TCAA, DCBAA, DBCAA e TBAA) apresentam valores de log Kow mais altos (1,33; 1,53; 1,62 e 1,71, respectivamente). No entanto, estes analitos são considerados moléculas polares e, portanto, altamente solúveis. Compostos com log Kow ≤ 3,0 tendem-se a solubilizar na fase aquosa, sendo altamente hidrofílicos.

Tabela 9: Propriedades físico-químicas dos AHAs estudados: nomenclatura, fórmula molecular e estrutural, massa molecular, pKa, Log K_{ow} e solubilidade.

Analitos	Fórmula molecular	Fórmula estrutural	Massa Molecular (g mol ⁻¹)	рКа	Log Kow	Teb (°C)	Solubilidade 25°C (mg L ⁻¹)
MCAA	CICH2COOH	Cl H H	94,5	2,87	0,22	189	8,58 * 10 ⁵
MBAA	BrCH2COOH	Br OH H H	138,9	2,87	0,41	208	6,36 * 10 ⁵
DCAA	Cl₂CHCOOH		128,9	1,26	0,92	194	1,00 * 10 ⁶

Fonte: PubChem (2021): pka: Constante de dissociação de um ácido; log Kow: Coeficiente de partição *n*-octanol-água; °C: Graus Celsius

Massa Solubilidade Fórmula Fórmula estrutural 25°C Analitos Molecular pKa Log Kow Teb (°C) molecular (g mol⁻¹) (mg L⁻¹) Br. DBAA Br₂CHCOOH 217,8 1,48 0,70 195 $2,11 * 10^{6}$ ЮH Η **B**r **BrCICHCOOH** Br. BCAA 173,39 1,40 0,61 215 $2,50 * 10^5$ ΟH Ή Ċl TCAA Cl₃CCOOH Cl. 163,4 0,51 1,33 197 $1,00 * 10^3$ OH

Tabela 9: (Continuação) Propriedades físico-químicas dos AHAs estudados: nomenclatura, fórmula molecular e estrutural, massa molecular, pKa, Log Kow e solubilidade.

Fonte: PubChem (2021): pka: Constante de dissociação de um ácido; log Kow: Coeficiente de partição n-octanol-água; °C: Graus Celsius

Massa Solubilidade Fórmula Fórmula estrutural 25°C Analitos Molecular pKa Log Kow Teb (°C) molecular (mg L⁻¹) (g mol⁻¹) O Br. Br₃CCOOH TBAA 296,7 0,72 1,71 245 $2,00 * 10^5$ ЮH Br **B**r O BrCl₂CCOOH Cl. DCBAA 207,8 0,13 1,53 234,6 $4,90 * 10^3$ OH Br Ċl O Br. Br₂CICCOOH DBCAA 252,25 0,13 1,62 263,6 $2,40 * 10^3$ OH Ċ Br

Tabela 9: (Continuação) Propriedades físico-químicas dos AHAs estudados: nomenclatura, fórmula molecular e estrutural, massa molecular, pKa, Log Kow e solubilidade.

Fonte: PubChem (2021): pka: Constante de dissociação de um ácido; log Kow: Coeficiente de partição n-octanol-água; °C: Graus Celsius

5.2. Avaliação das melhores condições de detecção no espectrômetro de massas MS/MS

A partir da infusão dos analitos com uma solução de 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ foram determinadas as melhores condições de fragmentação dos íons monitorados.

As condições estabelecidas no detector MS (transições monitoradas, energia de colisão, voltagem do cone) para os AHAs analisados no LC-MS/MS no modo de ionização (ESI) e modo de aquisição SRM (do inglês, *Selected Reaction Monitoring*) são apresentadas na **Tabela 10**. As condições escolhidas foram as que apresentaram maior intensidade durante a infusão direta.
Analito	Íon Percussor (m/z)	Íon Produto (m/z)	Íon Percussor	Tipo de transição	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)
MCAA	92,6*	34,8	³⁵ Cl	$[M-H]^- \rightarrow Cl^-$	7	13
MBAA	136,7* 138,7	78,5 80,7	⁷⁹ Br ⁸¹ Br	$[M-H]^- \rightarrow Br^-$	17 17	11 19
DCAA	126,6* 128,9	82,6 84,9	³⁵ Cl ³⁵ Cl ³⁷ Cl	$[M-H]^- \rightarrow COO^-$	25 25	11 13
DBAA	216,8* 216,8	172,8 81	⁷⁹ Br ⁸¹ Br	$[M-H]^{-} \rightarrow COO^{-}$ $[M-H]^{-} \rightarrow Br^{-}$	20 17	11 37
BCAA	172,77* 172,77	128,7 78,4	⁷⁹ Br ³⁷ Cl ⁷⁹ Br	$[M-H]^{-} \rightarrow COO^{-}$ $[M-H]^{-} \rightarrow Br^{-}$	25 25	11 21
TCAA	160,9 162,9	116,9 118,9	³⁵ Cl ³⁵ Cl ³⁷ Cl	$[M-H]^{-} \rightarrow COO^{-}$	15 21	8 17
ТВАА	297,21 297,21	183 119	⁷⁹ Br ⁸¹ Br		51 51	37 57
DCBAA	210,14	78,9	⁷⁹ Br ³⁷ Cl	$[M-H]^- \rightarrow Br^-$	35	8
DBCAA	252,0* 250,0	126,0 81,0	⁸¹ Br ³⁷ Cl ⁸¹ Br ³⁷ Cl	$[M\text{-}COOH]^{-} \longrightarrow Br^{-}$ $[M\text{-}H]^{-} \longrightarrow Br^{-}$	11 11	7 27

 Tabela 10: Resultado da otimização das condições de determinações no MS para a determinação dos AHAs (Dwell time de 0,1 s).

*: transições empregadas para a quantificação; m/z: Razão massa/carga; eV: Unidade elétron-volt; V: Unidade voltagem

Conforme pode ser observado na **Tabela 10**, foram selecionados dois fragmentos característicos de cada analito para o monitoramento, sendo o primeiro fragmento com maior intensidade utilizado para a quantificação e o segundo, para a confirmação do analito, com exceção do MCAA, DCAA e DCBAA; que apresentaram somente um fragmento estável.

A utilização de dois fragmentos no detector MS confere maior seletividade, e o modo de aquisição (SRM) é comumente usado na espectrometria de massas em série porque confere alta especificidade e sensibilidade. No primeiro quadrupolo é verificado quais foram os íons precursores mais intensos em cada composto, fazendo variar a voltagem do cone até conseguir uma voltagem ótima. Com os íons definidos, procedeu-se a geração dos íons produtos ou íons filhos fragmentados no segundo quadrupolo (célula de colisão) a partir do íon precursor, ao fim de ter dois íons para os AHAs estudados (HO et al., 2003).

Foi utilizada uma fonte de ionização por electrospray (ESI, do inglês, *Electrospray lonization*) no modo negativo (ESI-). A ESI é considerada a fonte de ionização recomendada para compostos neutros ou polares que podem ser protonados ou desprotonados em condições apropriadas de pH. Os AHAs estudados são considerados polares (0,22 \leq Log Kow \leq 1,71) e apresentam alta sensibilidade na análise por ESI (KRUVE et al., 2014).

A ionização dos AHAs é frequentemente dada pela perda de um próton de hidrogênio e a descarboxilação do grupo COO⁻, que é afetada pelo solvente usado e pelo pH da solução, e depende do grau de substituição e do tipo de halogênio substituído em cada AHA. As maiores intensidades para os mono-halogenados (MCAA e MBAA) foram detectadas para os íons desprotonados ([M-H⁻]), enquanto para os di-halogenados (DCAA e DBAA) foram detectados os íons produtos pela descarboxilação ([M-COO⁻]). Este íon é formado pela perda de dióxido de carbono; ocorre comumente em moléculas que possuem ácido carboxílico como grupo funcional (PRIETO-BLANCO et al., 2012). Para o BCAA, o fragmento [M-H⁻] gerou maior sinal.

Para avaliação das temperaturas da fonte, foram monitoradas as áreas de pico para os AHAs injetados. Foram avaliadas as temperaturas de 80, 100 e 120 °C, usando 300 °C como temperatura de dessolvatação. Todos os compostos apresentaram intensidades de sinal (áreas de pico mais altas) semelhantes com as temperaturas testadas. No entanto, trabalhos publicados anteriormente que empregaram LC-MS/MS para a determinação de AHAs usaram temperatura da fonte de 120 °C (LUO et al., 2013; KADMI et al., 2016) e próxima a 120 °C (MENG et al., 2010), sendo escolhida como temperatura de fonte para a ionização dos AHAs.

Na avaliação das temperaturas do gás de dessolvatação, foram avaliados 300, 400 e 500 °C, usando 120 °C como temperatura de fonte, como pode-se observar na **Figura 9**. Todos os compostos apresentaram ótimo desempenho na temperatura de dessolvatação de 400 e 500 °C, exceto MCAA e DBCAA. No entanto, resultados mais estáveis dos formatos dos picos a 400 °C foram obtidos. Além disso, a maioria dos estudos anteriores avaliam a temperatura de dessolvatação abaixo de 500 °C (LUO et al., 2013; PLANAS et al., 2019). Cabe ressaltar que o TCAA, TBAA e DCBAA não apresentaram picos cromatográficos e por isso não foram graficados.

Figura 9: Área dos picos para os AHAs (1 mg L⁻¹) na avaliação da temperatura de fonte com temperatura de dessolvatação de 300 °C (A) e na temperatura do gás de dessolvatação com temperatura de fonte de 120 °C (B). Letras a e b foram usadas para indicar diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos.



Condições cromatográficas: Modo de ionização: ESI(-); Modo de aquisição: SRM; Coluna: HPLC Luna HILIC; Fase móvel: MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (92:8, v/v); Vazão da fase móvel: 0,2 mL min⁻¹; Tempo de análise: 10 minutos

Portanto, as condições para a fragmentação dos íons monitorados foram: temperatura da fonte de íons de 120 °C, temperatura do gás de dessolvatação de 400 °C, vazão do gás de dessolvatação de 500 L h⁻¹, vazão do gás do cone de 50 L h⁻¹ e voltagem do capilar de 3 kv.

5.3. Avaliação do sistema cromatográfico para a determinação dos AHAs

Para avaliar a separação dos AHAs foram empregadas diferentes colunas analíticas de separação cromatográfica baseados nos mecanismos de interações entre a fase estacionária e os AHAs a fim de conseguir a melhor separação. As colunas cromatográficas testadas foram apresentadas na **Tabela 4** da seção 4.7.2. Considerando que a estabilidade das colunas compostas por sílica é comprometida com o aumento de pH e atendendo o caráter polar e não volátil dos AHAs foram estudados o uso de ácido acético, ácido fórmico e formiato de amônio como modificadores nas fases móveis testadas (SALAS et al., 2017).

5.3.1. Coluna Kinetex C8

Dentre as colunas avaliadas, a coluna kinetex C8 foi utilizada empregando eluição no modo gradiente de acordo com as condições especificadas na **Tabela 11** usando como modificador da fase móvel o ácido acético (pka 4,75).

Como pode ser observado na **Figura 10** foi obtida baixa retenção dos analitos nas condições do trabalho, o que pode estar relacionado com a natureza polar dos AHAs. Meng et al. (2010) empregaram uma coluna C8 do tipo Acquity HPLC BEH para a retenção dos AHAs, usando RP-LC.

t (min)	Fase Móvel A (H₂O 0,1% CH₃COOH) (%)	Fase Móvel B (MeCN) (%)	Vazão (mL min ⁻¹)
0	5	95	
1	5	95	
4	60	40	
5	95	5	0,3
8	95	5	
8,5	5	95	
13	5	95	

Tabela 11: Condição de eluição empregada no modo gradiente usando a colunaKinetex C8.

CH₃COOH: Ácido acético; H₂O: Água; MeCN: Acetonitrila; t: Tempo

Para análises de compostos polares por HPLC é usada uma grande quantidade de água na fase móvel para favorecer uma maior retenção dos compostos na fase estacionária (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016). No entanto, as fases estacionárias geralmente usadas apresentam pouca retenção de moléculas polares pequenas e carregadas como os AHAs, especialmente o DCAA e o TCAA (DELINSKY et al., 2005; SALAS et al., 2017). Neste sentido, o aumento da quantidade de água na fase móvel não favoreceu a retenção dos compostos, e a maioria dos AHAs eluiram na faixa de 1 a 2 minutos, com exceção do TCAA e DCBAA que não apresentaram boa intensidade ficando mais retidos na coluna empregada (aproximadamente 10 minutos de eluição), como pode-se observar na **Figura 10**.

Figura 10: Cromatogramas no modo SRM para o mix AHAs na concentração de 1,0 mg L⁻¹ nas condições ilustradas na Tabela 11.



Mesmo empregando um gradiente com força de eluição baixa, a maioria dos AHAs não apresentaram interação com a fase estacionária, eluindo no tempo morto com as condições usadas. A polaridade dos AHAs restringe a aplicabilidade na RP-LC para sua separação, embora seja o tipo de cromatografia mais utilizado (MENG et al., 2010; LI; WHITAKER; MCCARTY, 2012; LUO et al., 2013; PLANAS et al., 2019; WANG et al., 2020). Neste sentido, a HILIC é considerada uma alternativa para a separação de analitos que apresentam baixa retenção e eficiência em modo RP-LC, no modo HIILIC a alta concentração de solvente orgânico na fase móvel e a formação

da camada de água aumenta a retenção de moléculas pequenas como os AHAs. Além disso, o processo de ionização dos AHAs é favorecido (SILVA; BOTTOLI; COLLINS, 2016). Em função disso, com a intenção de melhorar a retenção e separação dos AHAs foram avaliadas as colunas Obelisc N e Luna HILIC, considerando uma solução tampão composta por ácido fórmico e formiato de amônio (CHEN; CHANG; WANG, 2009).

5.3.2. Coluna Obelisc N

Diferentes condições de eluição no modo gradiente foram avaliados incluindo (Tabelas 1 e 2 do Apêndice), variando a força de eluição e os componentes da fase móvel. Na **Tabela 12** são apresentadas as condições de eluição usadas referente aos cromatogramas da **Figura 11** para o uso desta coluna.

t (min)	Fase Móvel A Tampão formiato pH 4,1	Fase Móvel B MeCN (%)	Vazão (mL min ⁻¹)
0	2	98	
3	2	98	
4	20	80	
5	60	40	0,1
15	60	40	
16	2	98	
21	2	98	

Tabela 12: Condição de eluição no modo gradiente usando a coluna Obelisc N.

MeCN: Acetonitrila; t: tempo de análise

A coluna Obelisc N é uma coluna de modo misto desenhada para a separação de ácidos carboxílicos orgânicos e inorgânicos com base em seus valores de polaridade e pka. A Obelisc N apresenta características de fase normal que permite a separação de compostos polares como os AHAs baseando-se em vários mecanismos de separação. A fase estacionária da coluna Obelisc N possui ânions próximos à superfície separados dos grupos catiônicos por uma cadeia hidrofílica o que a torna uma alternativa interessante para melhorar a separação de AHAs (SIELC, 2018). No entanto, neste estudo nas condições estabelecidas não foi possível uma boa retenção dos AHAs assim como obtenção de boas intensidades ainda quando foi utilizada uma solução tampão para melhorar a eficiência desta técnica. Também são observados

problemas relacionados ao perfil cromatográfico dos picos, conforme pode ser observado na Figura 11.



Figura 11: Cromatograma no modo SRM para o mix AHAs na concentração de 1,0 mg L⁻¹ nas condições estabelecidas na Tabela 12.

Tendo em conta os problemas relacionados ao perfil cromatográfico dos picos e o perfil de separação obtido empregando a coluna Obelisc N, foi avaliado a separação dos AHAs empregando a coluna Luna HILIC que é baseada em interações hidrofílicas.

5.3.3. Coluna Luna HILIC

A fase estacionária utilizada na coluna Luna HILIC tem uma superfície de sílica que é coberta com grupos diol reticulados para seletividade polar sob condições HILIC, e que lhe confere uma elevada polaridade e as propriedades apropriadas para a formação de ligações de hidrogênio e contribuir para uma boa retenção de compostos polares como os AHAs (IBRAHIM; LUCY, 2013). Além disso, é atribuível a formação de uma camada de água na superfície da fase estacionária de sílica, o que permite a transferência dos analitos conferindo maior retenção de compostos polares (NOGA; BOCIAN; BOGUSŁAW BUSZEWSKI, 2013). Foi avaliado igualmente para esta coluna diferentes condições de eluição no modo gradiente (Tabelas 3 e 4 do Apêndice), variando o tempo de análise e a força de eluição. A **Figura 12** mostra os cromatogramas no modo de SRM referente a esta condição.

Figura 12: Cromatograma no modo SRM para a mistura do mix AHAs na concentração de 1,0 mg L⁻¹ nas condições descritas para a coluna Luna HILIC.



A maior polaridade da fase estacionária empregada na coluna Luna HILIC comparada com as duas anteriores proporcionou uma maior retenção dos AHAs pelos diversos mecanismos que envolvem a HILIC, ainda que não estejam completamente descritos. Sugere-se que a partição de compostos polares entre a camada enriquecida com água e a fase móvel altamente orgânica é o principal mecanismo de retenção (DINH; JONSSON; IRGUM, 2013; GRECO; LETZEL, 2013; XU et al., 2017). A adsorção do analito na superfície da fase estacionária, bem como a troca iônica entre o analito carregado e a fase estacionária carregada também são possíveis mecanismos de retenção adicionais (HEMSTRÖM; IRGUM, 2006; XU et al., 2017).

Apesar do maior fator de retenção desta coluna, alguns compostos como TCAA e DCBAA ainda não foram detectados. O DBCAA apresentou menor intensidade na fragmentação por ESI(-), mesmo empregando a fase móvel tamponada. Além disso, os analitos eluiram quase ao mesmo tempo, exceto MBAA. No entanto, o uso da LC-MS/MS em série usada neste estudo auxilia neste problema de separação dos AHAs. Principalmente porque o detector MS fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos que são eluídos a partir de uma coluna, proporcionando alta sensibilidade e distinguindo substâncias isotópicas ou com o mesmo tempo de retenção (HARRIS, 2010).

5.4. Influência e escolha da fase móvel

Em função dos resultados obtidos na separação cromatográfica, usando a coluna HILIC, foram avaliadas diferentes composições da fase móvel contendo água ultrapura e diferentes modificadores, tentando trabalhar com a composição mais simples da fase móvel. A **Tabela 13** apresenta as diferentes proporções da fase móvel, os respectivos tempos de retenção, e a resolução entre os picos, no modo gradiente e isocrático.

Dentre as composições apresentadas na **Tabela 13**, foi observado uma melhor separação dos AHAs no modo isocrático quando comparado com o modo gradiente, resultando melhor formato do pico, melhor resolução e análises mais rápido. No entanto, para os AHAs trihalogenados (TCAA e DCBAA) não foi observada retenção e separação cromatográfica com as condições instrumentais trabalhadas.

Assim, a condição que forneceu a melhor separação cromatográfica, melhor resolução, e formato do pico para os analitos foi a mistura de MeCN: tampão formiato pH 4,1 (92:8, v/v) com uma vazão de 0,2 mL min⁻¹. A MeCN não mostra interações próton-doador, sendo o solvente orgânico preferido nas separações HILIC. Além disso, o uso de fases móveis contendo outros solventes fornecem retenção de amostras insuficiente e formato do pico amplos ou não simétricos, a diferença do MeCN (JANDERA, 2011). Por outro lado, os AHAs apresentam baixos pKa variando entre 0,13 e 2,87, o que torna necessário seja a acidificação da fase móvel ou a utilização de soluções tamponadas para favorecer a interação entre o analito e a fase estacionária. Sabendo que nas separações HILIC é recomendada uma solução tampão contendo formiato de amônia para analitos que apresentam interações iônicas como os AHAs, optou-se por utilizar o tamponamento da fase móvel (SALAS et al., 2017).

	P	ropo	rção	dos	solve	ente	s (%	6)			Т	empo de	e retençã	ăo (mini	utos)			
	t	À	В	С	D	Ε	F	G	MCAA	DCAA	TCAA	MBAA	DBAA	TBAA	BCAA	DCBAA	DBCAA	Observações
	0	80	20	-	-	-	-	-										
	4	20	80	-	-	-	-	-	7,95	3,91	-	7,28	4,13	0	3,12	-	3,01	-
	16	98	2	-	-	-	-	-										
	0	90	-	10	-	-	-	-										
	4	80	-	20	-	-	-	-	2.20	2 20		2.20	2 00	0.74	2 20		2 20	Baixa retenção dos
fe	6	40	-	60	-	-	-	-	2,39	3,20	-	2,39	3,09	2,74	3,20	-	3,20	do pico
ien	7	90	-	10	-	-	-	-										
ad	0	80	-	-	20	-	-	-										
Ģ	3	20	-	-	80	-	-	-	2,93	4,11	-	2,84	4,11	2,35	4,11	-	4,01	Pouca ou nada resolução do pico
	5	80	-	-	20	-	-	-										de pice
	0	98	-	-	-	2	-	-										
	4	80	-	-	-	20	-	-		0.00		F 00	0.74	4 55	0.74		0.00	Bom formato do pico, mas os analitos foram retidos
	5	20	-	-	-	80	-	-	5,44	2,62	2,62 -	- 5,02	2,71	1,55	2,71	-	2,62	até um tempo menor a 6
	16	98	-	-	-	2	-	-										minutos
	-	92	8	-	-	-	-	-	1,97	2,01	-	2,29	2,04	1,78	2,02	-	1,97	Bom formato dos picos. Menor retenção quando comparada com tampão pH 4.1
ocrático	-	92	-	-	-	8	-	-	3,50	3,49	-	4,97	3,57	2,68	3,56	-	3,45	Bom formato dos picos. Os analitos ficam mais retidos. Os trihalogenados não apareceram
<u> </u> 80	-	92	-	-	-	-	8	-	3,60	3,54	-	5,16	3,53	2,77	3,80	-	3,60	Formato dos picos com muita cauda
	-	92	-	-	-	-	-	8	0	1,77	-	1,86	1,46	1,70	1,74	-	-	Baixa resposta. Ōs compostos trihalogenados não apareceram

Tabela 13: Composição das fases móveis testadas na otimização da separação dos AHAs por LC-MS/MS e as influencias nos tempos de retenção.

A: MeCN; B: Água ultrapura; C: Água ultrapura 0,1% ácido fórmico; D: Água ultrapura tampão formiato pH 3,0; E: Água ultrapura tampão formiato pH 4,1; F: Água ultrapura formiato pH 6,3; G: Água ultrapura pH 8; t: Tempo medido em minutos Em cromatografia líquida o controle do pH na separação de analitos ácidos ou básicos é fundamental, o qual é feito pelo uso de soluções acidificadas ou soluções tamponadas, como é o caso deste trabalho. Sabendo que os pka dos AHAs são baixos (**Tabela 9**), pode ser observado no gráfico da distribuição de espécies (**Figura 13**) que estes analitos tendem a se dissociar em pH acima de 0,5. Quando é utilizado um tampão formiato pH 4,1, as moléculas se encontram na forma dissociada. Uma vez que essa diferença entre a forma ionizada e não ionizada das moléculas modifica a interação dos analitos com a fase estacionária. A forma menos polar interage menos com a coluna Luna HILIC, a ordem da eluição seria ácidos mono-halogenados > ácidos trihalogenados.



Figura 13: Gráfico de distribuição de espécies em função do pH para os AHAs.

Desta forma, a melhor composição da fase móvel para a separação dos AHAs usando uma coluna Luna HILIC foi uma solução tamponada de formiato pH 4,1.

5.5. Influência e escolha do dwell time

Ao fim de melhorar a resolução dos formatos do pico para os AHAs foi avaliado o *dwell time*, considerando que é um dos aspectos nas condições cromatográficas que permite garantir a obtenção de um formato do pico adequado para sua integração e quantificação. Na **Figura 14** são apresentadas as respostas do número de pontos obtidos avaliando o *dwell time* desde 0,01 a 0,2 s em uma solução de 1,0 mg L⁻¹, e na **Figura 15** são apresentados os picos cromatográficos obtidos para os *dwell times* testados.



Figura 14: Número de pontos por pico obtidos para os AHAs variando o dwell time.



Figura 15: Cromatogramas para os diferentes dwell times avaliados (MBAA m/z 136 Da).

Sabendo que o *dwell time* ideal para a integração e quantificação do pico cromatográfico está entre 12 e 24 número de pontos, é observado que os analitos apresentaram as melhores detecções em termos de números de pontos por pico quando for usado um *dwell time* de 0,2 e 0,1 s para os analitos, com exceção do TCAA e DCBAA. Portanto, neste estudo trabalhou-se um *dwell time* de 0,1 s, considerando que um adequado *dwell time* aumenta a sensibilidade e a precisão do método (COOK-BOTELHO; BACHMANN; FRENCH, 2017), e com 0,2 s foi obtido menor número de pontos nos analitos comparado com 0,1 s.

5.6. Condições na separação cromatográfica para o TCAA

Considerando que o TCAA é um dos AHAs maiormente formado nas águas de abastecimento, e também é comumente detectado com os diferentes métodos sejam oficiais ou desenvolvidos nas pesquisas, foi considerado avaliar as respostas deste analito isolado da solução stock mix AHAs, pelo fato de não obter respostas na separação cromatográfica no trabalho desenvolvido.

Na **Figura 16** apresenta-se com intensidade média o espectro relativo a infusão do TCAA, onde são apresentados os íons precursores (160,9 m/z) e produto (116,9 m/z) relativos à primeira transição. O íon precursor e o íon produto nesta transição foram obtidos com uma voltagem de cone de 12 e 8 V, respectivamente. Também foram avaliados um íon precursor (162,9 m/z) e produto (118,9 m/z), esta variação de duas unidades corresponde aos isótopos do cloro. No entanto, a injeção do TCAA utilizando uma fase móvel (**Figura 17** a) Mais fraca; b) Mais forte) no sistema cromatográfico usando uma coluna HILIC não foi favorecida, na qual os picos cromatográficos apresentam baixa ou quase nada de resolução. Também foi testado a injeção do TCAA na coluna C18 e foi observado o mesmo comportamento quando comparado com a coluna HILIC (**Figura 17** c)).

Figura 16: Espectro resultante da infusão do TCAA para uma concentração de 1 mg L⁻¹.



Figura 17: Picos cromatográficos para TCAA na concentração de 1 mg L⁻¹ usando a) fase móvel mais fraca (MeCN: tampão formiato pH 4,1 (98:2, v/v)), e b) fase móvel mais forte (MeCN: tampão formiato pH 4,1 (85:15, v/v)) na coluna HILIC, c) fase móvel MeCN: tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)).



Desta forma as melhores condições cromatográficas obtidas para a separação e quantificação dos AHAs por LC-MS/MS são apresentadas na **Tabela 14**.

 Tabela 14: Condições empregadas no sistema cromatográfico LC-MS/MS para este trabalho.

Parâmetros	LC-MS/MS
Fase móvel	MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (92:8, v/v)
Coluna cromatográfica	HPLC Luna 3 µm HILIC 200 Å (100 x 3,0 mm)
Tempo de análise (min)	10
Modo	Isocrático
Vazão	$0,2 \text{ mL min}^{-1}$
Temperatura da fonte (°C)	120
Temperatura de dessolvatação (°C)	400
Dwell time (s)	0,1
Modo de ionização	ESI (-)
Analitos	MCAA, DCAA, MBAA, DBAA, BCAA e DBCAA

°C: Graus Celsius; ESI: Ionização por Electrospray; HILIC: Cromatografia de Interações Hidrofílicas; HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; MeCN: Acetonitrila

5.7. Estabelecimento das condições para Injeção Direta

Na avaliação do pH da amostra para ID, as amostras foram analisadas sem ajuste de pH (aproximadamente pH \approx 6,0) e com ajuste de pH (pH = 4,1, acidificada com ácido fórmico). Foram avaliados o coeficiente de correlação linear e o LOQ com o objetivo de escolher o melhor pH para ID. Os resultados são mostrados na **Tabela 15** e **Tabela 16**, respectivamente.

Foram obtidos r > 0,99 para a maioria dos compostos utilizando amostras de água sem ajuste e com ajuste de pH, com exceção do MCAA e DCAA em amostra de água sem ajuste (**Tabela 15**).

Tabela 15: Curvas analíticas em amostras de água tratadas com ajuste de pH (pH \approx 6,0) e com ajuste de pH (pH = 4,1) para análise por ID.

Analitos	Água tratada sem aj (pH ~ 6)	juste	Água tratada com ajuste (pH = 4,1)				
	Equação da curva	r	Equação da curva	r			
MCAA	y = 0,9541X - 363,31	0,98	y = 0,5981X - 202,98	1,00			
DCAA	y = 29,537 - 2736,9	0,98	y = 22,47X + 1124,8	0,99			
MBAA	y = 25,041X - 649,74	1,00	y = 24,142X - 2111,6	0,99			
DBAA	y = 29,284X + 591,67	1,00	y = 21,969X + 159,57	1,00			
BCAA	y = 16,62X + 320,74	1,00	y = 12,159X + 1036	0,99			
DBCAA	y = 0,6821X - 247,83	0,99	y = 0,4672X - 159,19	1,00			

r: Coeficiente de correlação linear; X: Concentração do analito; Y: Área do pico cromatográfico

Na **Tabela 16**, pode-se notar que os LOQi obtidos para DCAA e MBAA em amostras de água acidificadas a pH 4,1 foram menores quando comparados com os obtidos para amostras sem ajuste de pH, sendo necessária uma prévia acidificação das amostras para seu posteriores análises por ID. Postigo et al (2020) analisaram AHAs por ID e LC-MS/MS de alta resolução com ESI(-) acidificando as amostras com 0,1% de ácido fórmico antes da injeção (PLANAS et al., 2019; POSTIGO; EMILIANO; VALERO, 2020). Foi então escolhido como melhor condição para ID a acidificação da amostra em pH 4,1.

Tabela 16: Limites de quantificação instrumental (LOQ_i) em amostras de água com ajuste de pH (pH 4,1) e sem ajuste (pH \approx 6,0) para análise por ID, obtidos pela relação S/N no software MassLynx 4.1. Diferenças significativas avaliadas com o Test T-*Student.*

	LOQ _i (µg L ⁻¹) curvas injeção direta								
Analitos	Abastecimento sem ajuste de pH (pH ~ 6)	Abastecimento com ajuste (pH = 4,1)							
MCAA	500 ^{NS}	500 ^{NS}							
DCAA	50*	10*							
MBAA	100*	50*							
DBAA	10 ^{NS}	10 ^{NS}							
BCAA	50 ^{NS}	50 ^{NS}							
DBCAA	500 ^{NS}	500 ^{NS}							

NS: Não Significativo; *: Significativo com nível de significância de 95%

5.8. Estabelecimento das condições da SPE

Inicialmente foi fixado o uso de 250 mL de amostra acidificada (pH 1,0) com ácido sulfúrico. Como solvente de condicionamento foi escolhido 3 mL de MeCN e 3 mL de água ultrapura acidificada (pH 1,0) com ácido fórmico.

5.8.1. Avaliação do tipo de cartucho

Nas condições iniciais estabelecidas foram avaliados diferentes cartuchos (Strata [™]-X, Oasis HLB[®], C18 e Plexa). Nesta avaliação 2 mL da fase móvel (MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)) foram utilizados como solvente de eluição. Os resultados obtidos para avaliação do material adsorvente são

apresentados na **Figura 18.** Para a extração de analitos polares é comum usar adsorventes do tipo Oasis HLB[®] ou Strata [™]-X pelo fato de serem constituídos com propriedades hidrofílicas e lipofílicas, o que faz a retenção de uma ampla gama de moléculas incluindo moléculas polares como os AHAs.

Figura 18: Quantidade de analitos com recuperações entre 50 e 120% na avaliação de diferentes cartuchos (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de fase móvel (MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)).



Pode-se observar na **Figura 18** que quando utilizados o cartucho Plexa de fase polimérica tanto com amostra em pH 1,0 como em pH 4,0, e o cartucho contendo C18 de fase sílica unida a um octadecil foram obtidas recuperações < 50% para todos os analitos. Com os cartuchos Strata [™]-X e o Oasis HLB[®] de fase polimérica foram obtidas recuperações entre 50 e 120% para a cinco e quatro analitos, respectivamente. Na **Figura 19** e **Figura 20** são apresentados os valores de recuperação e o EM obtidos para o Strata [™]-X e o Oasis HLB[®], respectivamente. Pode-se observar na **Figura 19** que quando foi utilizado o Strata [™]-X somente o MBAA apresentou diferenças significativas (p < 0,05) em relação a recuperação dos analitos. Além disso, para o DBAA e BCAA foram obtidas recuperações aproximadamente de 100%. Em relação ao EM foram obtidas menores porcentagens para todos os analitos quando foi usado o Strata [™]-X (inferior a 70%).

O uso de fases poliméricas do tipo LiChrolut[®] EN e Oasis HLB[®] são empregadas na maioria dos trabalhos que envolvem a SPE como técnica de preparo de amostra para a extração dos AHAs (**Tabela 2**). O cartucho do tipo Oasis HLB apresenta a desvantagem de alto custo, quando comparado com o Strata [™]-X. Neste trabalho foram obtidas melhores recuperações para os AHAs com o uso do Strata [™]. X, sendo este escolhido.

Figura 19: Recuperações obtidas para os AHAs na avaliação dos cartuchos utilizando SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de fase móvel (MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)). As letras a e b foram usadas para indicar diferenças estatisticamente significativas, usando o teste T-Student.



Figura 20: Efeito Matriz (EM) obtido para os AHAs na avaliação dos diferentes tipos de cartucho na SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de fase móvel (MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)).



Alguns estudos foram feitos até o momento sobre o uso de cartuchos poliméricos, mas poucos empregando Strata [™]-X para análise de AHAs devido aos

problemas relacionados à extração e quantificação deste tipo de moléculas. Delinsky et al. (2005) realizaram um estudo para a análise de DCAA em tecidos e sangue de camundongos usando o cartucho Strata X, obtendo melhores respostas de extração durante o preparo de amostras. Isto pode ser explicado pelos suportes poliméricos que constituem este tipo de cartuchos, permitindo uma maior retenção de pequenas moléculas.

Para moléculas mono-halogenadas como MCAA e MBAA a eluição é considerada mais difícil, e seria de se esperar que o uso de cartuchos com poros de tamanho pequeno (< 200 Å) gerasse uma retenção maior desse tipo de moléculas. Porém, para o MBAA obteve-se um baixo percentual de recuperação, o que pode ser devido a que sendo uma das moléculas menos polares sua retenção não seja favorecida durante a retenção em cartuchos poliméricos do tipo Strata TM-X.

Recentemente, Kinani et al. (2018) avaliaram diferentes cartuchos para extração de AHAs: Oasis HLB, Bakerbond SDB, Strata SDB-L, LiChrolut EN, Bakerbond Carbon e Bakerbond C18. Foram obtidas recuperações entre 44 e 92% usando o Strata SDB-L, com exceção do MCAA e MBAA que apresentaram recuperações de 4 e 12%, respectivamente.

Uma ampla gama de DBPs em amostras aquosas foram analisadas usando SPE e GC-MS obtendo melhores resultados de extração com os cartuchos de Bakerbond SDB-1, seguido por LiChrolut® EN e Strata[®] SDB-L. Enquanto para o Oasis-HLB foram obtidas menores recuperações (ROUMIGUIERES et al., 2018).

5.8.2. Avaliação do tipo de solvente de eluição

Em relação aos solventes de eluição avaliados MeOH, MeOH 1% ácido fórmico, MeCN, MeCN 1% ácido fórmico, mistura de MeCN:MeOH (90:10, v/v) acidificado (1% ácido fórmico) e fase móvel (MeCN:Tampão formiato pH 4,1 (90:10, v/v)). O solvente que apresentou maior quantidade de analitos com valores de recuperação na faixa de 50 a 120% foi a MeCN e a fase móvel, conforme pode ser observado na **Figura 21**.

Figura 21: Quantidade de analitos com recuperações entre 50 e 120% na avaliação do solvente de eluição (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de cada solvente).



AF: Ácido fórmico; MeCN: Acetonitrila; MeOH: Metanol

Pode-se observar na **Figura 21** que usando solventes acidificados foram obtidas recuperações entre 50 e 120% para menor quantidade de analitos. Além disso, a fase móvel e a MeCN apresentaram boas recuperações para as mesmas quantidades de analitos. Na **Figura 22** e **Figura 23** são apresentadas as recuperações e o EM obtidos para os AHAs usando os diferentes solventes testados.

O MCAA, MBAA e DBCAA os quais apresentaram recuperações inferiores a 60%, apresentaram diferenças estatisticamente significativas usando MeCN (p > 0,05), conforme observado na **Figura 22.** Adicionalmente, o EM obtido para os analitos foi menor usando MeCN quando comparada com a fase móvel (**Figura 23**).

Figura 22: Recuperações obtidas para os AHAs na avaliação do solvente de eluição da SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de cada solvente testado, cartucho: Strata [™]-X). As letras a, b e c foram usadas para indicar diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, usando o teste ANOVA Tukey.



Figura 23: Efeito Matriz (EM) obtido para os AHAs na avaliação do solvente de eluição na SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de cada solvente testado; cartucho: Strata [™]-X).



Alguns solventes de alta a média polaridade têm sido propostos para a extração de AHAs por SPE incluindo MeOH (YOSHIKAWA; SODA; SAKURAGAWA, 2009), mistura entre MeOH e acetona (LOOS; BARCELO, 2001; ZHONG et al., 2017), MeOH acidificado (HU et al., 2018), e uso de pares de reagentes iônicos. O uso de MTBE (ROUMIGUIÈRES et al., 2018) na determinação por GC, e soluções à base de hidróxido de sódio ou fosfato monossódico na determinação por IC (NSUBUGA; BASHEER, 2013; HENSON; EMMERT; SIMONE, 2014) também foram propostos. No trabalho de Prieto-Blanco et al. (2012) MeCN misturada com dibutilamina foi utilizada para eluição de AHAs, obtendo-se bons resultados de recuperação para MBAA, DCAA, DBAA e TCAA. No trabalho de Kadmi et al. (2016) foi avaliado a SPE para DCAA e TCAA na qual foi usado o MeOH como solvente de eluição. No entanto, os extratos foram evaporados e logo reconstituídos com MeCN e água ultrapura.

Na SPE, a força do solvente de eluição é medida por sua polaridade relativa denominada série eluotrópica (ε^0), e quanto maior seja sua força de eluição mais facilmente removerá o analito da fase sólida (LANÇAS, 2004). MeCN possui um $\varepsilon^0 = 0,50$, sendo considerada um solvente de polaridade mediana, o que permite a quebra das interações entre os analitos polares como os AHAs e o cartucho, favorecendo a extração. Além disso, a MeCN apresenta características importantes, é um dos solventes apróticos mais usados, apresenta baixa viscosidade, comportamento diferencial de solvatação contra cátions e ânions e um caráter anfifílico fornecido pela presença do grupo metila e forte distribuição de carga dipolar da molécula (HERNÁNDEZ-COBOS et al., 2020); esse caráter fornece um extremo hidrofílico a MeCN favorecendo a interação com moléculas polares e hidrofílicas como os AHAs.

Embora não tenham sido encontrados trabalhos de pesquisa que avaliem a MeCN pura como solvente de eluição para a extração de AHAs por SPE, muitos deles envolvem MeCN em termos da fase móvel ou durante o condicionamento dos cartuchos. Entretanto, neste estudo, recuperações entre 50 e 120% (**Figura 22**) foram obtidas para os analitos com EM menores que quando utilizando a fase móvel (**Figura 23**), e por isso a MeCN foi escolhida como solvente de eluição.

5.8.3. Avaliação do volume de solvente de eluição

Após ter definido o volume e pH das amostras, o cartucho e o solvente de eluição, foi realizado um estudo da influência do volume do solvente de eluição. Na

Figura 24 são apresentados os resultados relacionando a quantidade de analitos com recuperações entre 50 e 120% usando os diferentes volumes testados. Na Figura 25 e Figura 26 são apresentadas as recuperações obtidas e o EM para cada tratamento.

Figura 24: Quantidade de analitos com recuperações entre 50 e 120% na avaliação do material adsorvente (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de MeCN; cartucho: Strata [™]-X).



Os resultados apresentados na **Figura 25** mostram que a condição mais adequada para a extração dos AHAs foi com 2,0 e 3,0 mL de MeCN. No entanto, foi escolhido 2,0 mL como volume de solvente por não apresentar diferenças significativas para nenhum dos analitos em termos de recuperação (p > 0,05) conforme na **Figura 25**.

Figura 25: Recuperações obtidas para os AHAs na avaliação do volume do solvente de eluição na SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com MeCN, cartucho: Strata [™]-X). As letras a, b e c foram usadas para indicar diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, usando o teste ANOVA Tukey.



Figura 26: Efeito Matriz (EM) obtido para os AHAs na avaliação do volume do solvente de eluição na SPE (Condições de extração: 250 mL de amostra, pH da amostra 1,0, eluição com 2 mL de MeCN; cartucho Strata [™]-X).



O volume do solvente de eluição é um parâmetro importante na SPE, uma vez que os analitos são retidos nos cartuchos e eluídos com um pequeno volume de solvente adequado para a análise (CALDAS et al., 2011). Depois de secar o cartucho e possivelmente remover as interferências, as interações entre os AHAs e o material em fase sólida são interrompidas pela lavagem de pequenos volumes de solventes orgânicos, o que leva à dessorção dos analitos da fase sólida (ANDRADE-EIROA et al., 2016). Alguns autores afirmam que análises detalhadas devem ser realizadas em relação aos volumes dos solventes de eluição, pois ao utilizar volumes maiores, será produzido um extrato mais diluído, embora possivelmente com maior percentual de recuperação (BARRON; PAULL, 2004). Além disso, quanto menor o valor de eluição, maior o fator de concentração atingido, melhorando a detectabilidade do método proposto, portanto foi escolhido 2,0 mL.

5.8.4. Condições finais dos métodos estudados

As condições finais estabelecidas usando as técnicas de preparo de amostra por ID e SPE são mostradas nas **Figura 27** e **Figura 28**, respectivamente.

Figura 27: Esquema representativo do procedimento de SPE nas condições estabelecidas para extração dos AHAs.



Fonte: Autoria Própria

Figura 28: Esquema representativo do procedimento de ID nas condições estabelecidas para extração dos AHAs.



Após estabelecer as condições do preparo de amostra e de detecção por LC-MS/MS, o método foi validado, para garantia da confiabilidade dos resultados para a análise dos AHAs.

5.9. Validação dos métodos propostos para ID e SPE

5.9.1. Curva analítica e linearidade

As equações representativas das curvas no solvente e nos extratos da ID e SPE obtidas para cada um dos analitos, assim como o coeficiente de correlação linear e o coeficiente angular são apresentados na **Tabela 17.**

Para a construção das curvas analíticas foram utilizadas as médias das áreas em triplicata detectadas no cromatógrafo de cada nível de concentração, contendo para todos os analitos no menos de cinco níveis.

Analitos	Curva no solvente (MeCN)	r	Curva água da torneira pH 4,1 ID	r	Curva no extrato SPE	r
MCAA	y = 5,1163X - 1320,2	0,99	y = 0,5981X - 202,98	1,00	y = 0,8414X - 215,19	0,99
DCAA	y = 306,72X + 4359,3	0,99	y = 22,47X + 1124,8	0,99	y = 103,54X + 2511	1,00
MBAA	y = 73,717X - 3463,9	0,98	y = 24,142X - 2111,6	0,99	y = 7,0602X + 219,13	1,00
DBAA	y = 337,74X - 508,94	0,99	y = 21,969X + 159,57	1,00	y = 213,82X + 2965,5	1,00
BCAA	y = 306,06X + 1878,8	0,99	y = 12,159X + 1036	0,99	y = 118,84X + 1410,6	1,00
DBCAA	y = 3,8396X - 978,96	0,99	y = 0,4672X - 159,19	1,00	y = 0,5824X - 164,88	0,99

Tabela 17: Curvas analíticas e coeficiente de correlação linear no solvente e nos extratos da ID e SPE e determinação por LC-MS/MS obtidos para avaliação da linearidade.

MeCN: Acetonitrila; r: Coeficiente de correlação linear; X: Concentração do analito; Y: Área do pico cromatográfico

Portanto, pode-se concluir a partir do modelo de regressão que o método é linear na faixa de concentração estudada, visto que apresentou valores de coeficientes de correlação linear superiores a 0,99 para as curvas analíticas dos AHAs, com exceção do MBAA que apresentaram r = 0,98 na curva no solvente.

5.9.2. LOD e LOQ

Os valores dos LOD e LOQ instrumental e dos métodos são apresentados na **Tabela 18**. Os LOD_i e LOQ_i variaram de 3 a 83 e 10 a 250 μ g L⁻¹, respectivamente. Os LOD_m e LOQ_m variaram entre 3 a 167 e 10 a 500 μ g L⁻¹, respectivamente para ID. Enquanto que SPE, o LOD_m variou de 0,03 a 0,67 μ g L⁻¹ e o LOQ_m variou de 0,08 a 2,00 μ g L⁻¹.

Tabela 18: LOD_i e LOQ_i e LOD_m e LOQ_m obtidos pela relação S/N no software MassLynx 4.1.

	Instrun	nental*	10)	SI	PE	EPA	Brasil	WHO
Analitos				(µg l	_ ⁻¹)				
	LODi	LOQi	LODm	LOD _m LOQ _m LOD _m			L		
MCAA	83,33	250	166,67	500	0,67	2,00		60** 80**	20
DCAA	33,33	100	3,33	10	0,27	0,80	60**		
MBAA	33,33	100	16,67	50	0,27	0,80	00		
DBAA	3,33	10	3,33	10	0,03	0,08			
BCAA	16,67	50	16,67	50	0,13	0,40			
DBCAA	83,33	250	166,67	500	0,67	2,00			

*LODi e LOQi calculados usando a curva em MeCN, como solvente; **: Corresponde à soma total dos cinco primeiros AHAs

Os valores de LOD_m e LOQ_m encontrados estão de acordo com níveis de concentração em que são encontrados os AHAs em diferentes amostras de água (água potável, água da torneira, água engarrafada, água de piscina) resumidos na **Tabela 3**. A ID e LC-MS/MS demonstrou ser um método rápido e simples precisando apenas de acidificação da amostra, atingindo limites menores que os LMCs estabelecidos pelas regulamentações, com exceção do MCAA, conforme mostrado na **Tabela 18**. Relacionado a SPE e LC-MS/MS foram obtidos níveis inferiores, principalmente pela vantagem da SPE de concentrar os AHAs no extrato final, demonstrando ser uma técnica ideal para a extração destes analitos.

Os LOD obtidos para DCAA, MBAA e DBAA (0,27, 0,27 e 0,03 μ g L⁻¹, respectivamente) podem ser comparados com os obtidos por Prieto et al. (2012) usando SPE e LC-MS/MS de par iônico (DCAA, MBAA e DBAA de 0,24, 0,31 e 0,04 μ g L⁻¹, respectivamente). Os LOD obtido para DBAA após a SPE (0,03 μ g L⁻¹) pode ser comparado ao obtido por Xue et al. (2016) (0,02 μ g L⁻¹) usando ID e IC-MS/MS.

Os LOQ obtidos pela SPE foram inferiores aos obtidos por (HENSON; EMMERT; SIMONE, 2014) usando um analisador online em tempo real (SAI-PCR) para analisar e pré-concentrar os AHAs (LOQ entre 1 e 3 μ g L⁻¹). O LOD e LOQ obtidos neste estudo para DBCAA (0,67 e 2,0 μ g L⁻¹ respectivamente) após a SPE foram inferiores aos obtidos por Wang et al. (2020) (LOD e LOQ de 2,0 e 6,7 μ g L⁻¹) usando *target* e *semitarget screening* com UPLC-MS/MS Orbitrap. Também pode ser comparado a Postigo et al. (2018) (MCAA e MBAA, BCAA, DCAA e DBAA e DBCAA de 0,5; 5, 5 e 10, respectivamente) usando ionização química negativa para GC (NCI) acoplada a MS, e usando derivatização.

5.9.3. Exatidão e precisão

Na **Tabela 19** e **Tabela 20** são apresentados resultados para a exatidão e precisão em termos de repetibilidade e precisão intermediária da ID e SPE para amostras de água de abastecimento e quantificação por LC-MS/MS. As guias de validação recomendam valores de recuperação na faixa de 70 a 120% com RSD ± 20%, no entanto, para métodos multirresíduos são aceitáveis recuperações entre 50 e 120% (SANTE, 2019; INMETRO, 2020).

Para ID, foram obtidas recuperações na faixa de 70 e 120% para todos os analitos na repetibilidade e precisão intermediária, com exceção apenas do DCAA e DBAA, os quais apresentaram recuperações maiores de 120% no nível LOQ (**Tabela 19**). No entanto, os valores relacionados à recuperação dos analitos se encontram dentro das regulamentações para métodos analíticos. Semelhante a este estudo, (MENG et al., 2010) obtiveram recuperações entre 80 e 100% para todos os analitos; (BOON; FONG; LI, 2015) obtiveram recuperações entre 92 e 110% para a maioria dos AHAs (BRUZZONITI et al., 2019) e recuperações próximas ao 100%.

Na SPE, foram obtidas recuperações menores quando comparadas com a ID, mas ainda assim se obtiveram recuperações entre 50 e 120% para a maioria dos analitos, exceto o MBAA. Como pode ser observado na **Tabela 20**, foram obtidas

algumas incongruências nas recuperações obtidas durante a validação do método. A alta polaridade destes compostos requer que os processos de preparo de amostra tenham extrema rigorosidade para a ótima extração dos compostos. No entanto, estudos anteriores focados no desenvolvimento de métodos para extração e quantificação dos AHAs, reportaram baixas recuperações e problemas na hora do trabalho com moléculas pequenas e polares.

Bruzzoniti et al. (2008) obtiveram recuperações na faixa de 22 e 106% na extração de AHAs por SPE, obtendo menores recuperações para MCAA e BCAA, usando LiChrolut EM como material adsorvente.

Prieto-Blanco et al. (2012) obtiveram recuperações na faixa de 60 e 102%, usando LiChrolut EN, mas na utilização de outro tipo de material como Oasis HLB, por exemplo, as recuperações ficaram em torno de 30% para o MCAA, e usando Isolute ENV a maioria dos analitos apresentaram recuperações em torno de 40%.

Henson et al. (2014) avaliaram a velocidade de vazão na etapa de condicionamento para melhorar as recuperações obtidas por SPE, e obtiveram melhores recuperações para MBAA, o que pode indicar que este analito devido às suas características de pka (2,87) e ser um dos menos polares precisa ser avaliado em outras condições de extração para obter maiores porcentagens de recuperação.

Kinani et al. (2018) avaliaram a extração por SPE e quantificação por GC-MS para AHAs. Na extração foram avaliados diferentes materiais adsorventes, incluindo Strata[®] SDB-L e Oasis HLB, assim como outros comumente usados como LiChrolut EN e Bakerbond. Para o MBAA e DCAA foram obtidas recuperações de 12 e 44%, respectivamente, usando o Strata[®] SDB-L.

Pode-se notar que os resultados obtidos usando SPE e LC-MS/MS apresentou resultados compatíveis para a extração de AHAs em amostras de água de abastecimento em termos de LOD, LOQ, exatidão e precisão quando comparado com estudos anteriores.

Tabela 19: Recuperação (%) e RSD (%) para avaliação da exatidão (n = 3) e precisão do método por ID para as amostras de águas de abastecimento em termos de repetibilidade (n = 3) e precisão intermediaria (n = 3).

		Níveis de	fortifica	ção – Repe	etibilidad	le	Níveis de fortificação – Precisão intermediaria						
Analitos	Baixo		Médio			Alto		Baixo		lédio	Alto		
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	
MCAA	99,6	7,9	100,5	3,2	104,3	4,1	103,0	4,8	103,2	4,8	104,5	8,1	
DCAA	143,9	28,9	107,7	7,0	98,3	5,1	115,5	16,3	112,2	9,5	104,1	2,6	
MBAA	121,9	3,4	90,1	5,4	92,4	3,7	116,0	9,0	84,5	3,3	104,3	4,9	
DBAA	127,2	16,1	106,8	4,8	76,9	6,3	143,8	14,9	111,6	9,3	101,0	3,0	
BCAA	92,6	9,3	88,4	7,5	87,8	4,0	129,9	7,0	102,5	4,1	99,6	5,7	
DBCAA	99,1	9,2	99,7	4,0	105,8	7,1	92,4	9,1	100,8	10,1	101,1	10,9	

MCAA e DBCAA: Baixo: 500 μg L⁻¹; Médio: 750 μg L⁻¹; Alto: 1000 μg L⁻¹; DCAA e DBAA: Baixo: 10 μg L⁻¹; Médio: 50 μg L⁻¹; Alto: 500 μg L⁻¹; MBAA e BCAA: Baixo: 50 μg L⁻¹; Médio: 500 μg L⁻¹; Alto: 1000 μg L⁻¹

Tabela 20: Recuperação (%) e RSD (%) para avaliação da exatidão (n = 3) e precisão do método por SPE para as amostras de águas de abastecimento em termos de repetibilidade (n = 3) e precisão intermediária (n = 3).

		Níveis de	fortifica	ção – Repe	tibilidad	е	Níveis de fortificação – Precisão intermediaria						
Analitos	Baixo		Médio		Alto		Baixo		Médio		Alto		
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	
MCAA	105,3	13,7	105,0	8,4	141,7	11,7	76,1	39,7	108,4	5,6	103,5	9,7	
DCAA	97,8	13,0	80,9	5,5	82,0	11,0	109,4	11,3	59,6	5,7	44,1	9,6	
MBAA	47,5	17,5	47,0	11,7	42,1	8,2	21,3	40,7	26,4	14,3	20,3	10,6	
DBAA	77,7	13,1	40,8	13,8	52,7	13,5	117,8	9,4	77,5	7,7	74,4	10,3	
BCAA	77,0	5,8	76,1	8,8	51,1	4,9	93,9	6,0	51,2	21,2	53,4	6,3	
DBCAA	104,0	13,3	104,0	5,5	131,3	9,7	25,3	25,8	101,3	26,7	94,9	41,1	

MCAA e DBCAA: Baixo: 2 μg L⁻¹; Médio: 4 μg L⁻¹; Alto: 8 μg L⁻¹; DCAA e MBAA: Baixo: 0,8 μg L⁻¹; Médio: 4 μg L⁻¹; Alto: 8 μg L⁻¹; DBAA: Baixo: 0,08 μg L⁻¹; Médio: 0,4 μg L⁻¹; Alto: 0,8 μg L⁻¹; BCAA: 0,4 μg L⁻¹; Médio: 2 μg L⁻¹; Alto: 4 μg L⁻¹

5.9.4. Efeito matriz (EM)

Os dados referentes ao EM para a ID e SPE são apresentados na **Figura 29**. Pode-se observar que os valores percentuais variaram de -10,8% para MBAA até 25% para DBAA, indicando que o método não possui influência da matriz para os AHAs, devido que foram obtidas EM menores a 25% (INMETRO, 2019).

Figura 29: EM obtido para os analitos utilizando a ID e SPE no preparo de amostras de água e determinação por LC-MS/MS.



5.10. Comparação dos métodos desenvolvidos com métodos disponíveis na literatura para determinação dos AHAs em amostras de água

A técnica LLE é a técnica de referência sugerida pela USEPA para extração e GC-ECD para quantificação de AHAs em amostras de águas (Método 552.1 da USEPA). No entanto, esta técnica envolve a mistura de diferentes solventes de extração incluindo MTBE e para a posterior quantificação por GC precisa de derivatização, onde os analitos são eluídos com pequenas alíquotas de MeOH acidificado e esterificados diretamente após a adição de um pequeno volume de MTBE como co-solvente (USEPA, 1995). Pode-se notar que esta metodologia envolve alto consumo de reagentes, é trabalhosa, demorada e tediosa; isso levou a busca pelo

aprimoramento de métodos para a determinação dos AHAs. Sendo assim, anos mais tarde foi estabelecido pela USEPA o uso da ID e IC-MS/MS com ESI (USEPA Método 557.1) (USEPA, 2009).

Percebe-se então que foi introduzida a LC como técnica alternativa, para evitar os processos de derivatização. Além disso, o avanço de pesquisas para o desenvolvimento de métodos robustos, simples, eficazes, diante do desafio analítico de análises de moléculas pequenas e polares como os AHAs, têm aumentado com o avanço da química analítica baseados principalmente nos princípios da QAV (MOHAMED, 2015).

O método proposto empregando ID e LC-MS/MS no modo HILIC, permitiu a determinação dos AHAs simultaneamente, e atingiu a detectabilidade relacionada aos limites estabelecidos pelas regulamentações, além de ser uma técnica rápida e confiável para uso na análise de rotina dentro do laboratório para identificação e quantificação dos AHAs. E o método empregando a SPE e LC-MS/MS no modo HILIC permitiu a pré-concentração e extração dos AHAs, atingindo eficiência na extração e precisão semelhantes aos estudos que vêm sendo publicados na literatura usando SPE.

No método 552.1 e 557.1 oficiais da USEPA, as recuperações atingidas são de 59 a 114% e de 83 a 101%, respectivamente. O método proposto empregando ID e LC-MS/MS no modo HILIC atingiu recuperações de 77 a 130%. Meng et al. (2010) usando ID e LC-MS/MS para análise de AHAs₉ em amostras de água potável obtiveram recuperações entre 81 e 108% (MENG et al., 2010). Em outro estudo mais recente, AHAs clorados, bromados e iodados (MCAA, MBAA, DCAA, DBAA, BCAA, TCAA, TBAA, DBCAA, DCBAA, MIAA (ácido monoiodoacético), DIAA (ácido di-iodoacético) foram determinados usando ID e LC -MS/MS com fonte de ionização ESI e detector MS quadrupolo e os resultados obtidos ficaram entre 69 e 128% (PLANAS et al., 2019).

Postigo et al. (2020) propuseram o uso da ID (200 μ L) e LVI-LC-ESI(-)-HRMS (do inglês, *Liquid Chromatography coupled to Negative Electrospray Ionization High Resolution Mass Spectrometry*) para o análise de AHAs clorados, bromados, iodados e dalapon em amostras de água, obtendo recuperações entre 47 e 116%. Neste estudo, o MCAA foi quem apresentou menor recuperação (47% e 76% para os níveis de 0,05 e 50 μ g L⁻¹, respectivamente).

Estudos empregando SPE como técnica de extração vêm sendo mais utilizados acoplados a RP-LC e em alguns casos a GC. Prieto et al. (2012) implementaram a SPE, acidificando 100 mL de amostras e percolando através de três tipos de cartuchos diferentes (LiChrolut EN, Oasis HLB e Isolute ENV). O condicionamento foi feito com 5 mL de MeOH, 5 mL de MeCN e 5 mL de H₂SO₄ aquoso, e a lavagem com água ultrapura. Os extratos foram eluídos com 8 mL de MeCN misturada com DBA (dibultiamina), obtendo recuperações entre 60 e 102%, 27 e 100% e 45 e 91% para LiChrolut EN, Oasis HLB e Isolute ENV, respectivamente.

Em outro estudo, os autores propuseram o uso da técnica SPE automatizada em conjunto com determinação por SIA (Análises de Injeção Sequencial, *do inglês Sequential Injection Analysis*) -PCR-IC, onde 50 mL de amostras acidificadas a pH de 1,3 foram percolados através do cartucho LiChrolut EN (200 mg). O condicionamento foi feito com 3 mL de MeOH, 5 mL de água de reagente, 5 mL de H₂SO₄ 0,1 M e 50 µg L⁻¹ de 2-BBA. Foi usado como solvente de eluição NaOH 10 mM pelo fato de usar uma técnica cromatográfica de íons. Os autores obtiveram recuperações de 90, 100, 102, 103, 104 e 114% para MBAA, DBCAA, DBAA, DCAA, BCAA e DCBAA, TCAA e MCAA, respectivamente (HENSON; EMMERT; SIMONE, 2014).

Um estudo mais recente, foi desenvolvido por Kinani et al. (2018) usando SPE e GC-MS para determinação dos AHAs. Os autores propuseram a acidificação de 1 L de amostra de água (pH < 2,0) com H₂SO₄ 1% (v/v) percolando a amostra através de diferentes tipos de cartuchos (Strata SDB-L, Bakerbond Carbon, Bakerbond SDB, Bakerbind C18, Oasis HLB, LiChrolut[®] EN). O condicionamento dos cartuchos foi feito com 5 mL de MeOH, 10 mL de água ultrapura acidificada com H₂SO₄ 10% (v/v), os quais foram lavados com água ultrapura acidificada e 3 mL de MTBE, após do processo de extração os AHAs foram derivatizados por processo descritos no estudo. Neste trabalho foram obtidas recuperações entre 45 e 100%, 42 e 100%, 4 e 91%, 32 e 100%, 56 e 100% e 0 e 12% para Oasis HLB, Bakerbond SDB, Strata SDB-L, LiChrolut[®] EN, Bakerbond Carbon e Bakerbond C18.

No método proposto empregando SPE e LC-MS/MS, as condições para extração dos AHAs foram 250 mL acidificadas a pH 1,0 com H₂SO₄, percolados através de diferentes cartuchos de características distintas (Strata ^{TM-}X, Oasis HLB, C18 e Bond Elut Plexa). Os cartuchos foram condicionados com 3 mL de MeCN e 3 mL de água ultrapura também acidificada a pH 1,0. Os AHAs foram eluídos com 2 mL de MeCN para sua posterior quantificação por LC-MS/MS usando uma coluna HILIC.
Os resultados de modo geral obtidos em termos de recuperação foram entre 50 e 120% para a maioria dos analitos.

Traçando uma comparação entre os métodos de referência e os métodos propostos neste estudo (**Tabela 21**), verifica-se que é possível a utilização da ID em conjunto com LC-MS/MS usando uma coluna HILIC para a determinação de AHAs atingindo aos limites estabelecidos pelos órgãos legislativos, com a exceção do MCAA. Este método apresenta a vantagem de ser um método com menos procedimentos para manuseio da amostra, simples, rápido e confiável. Para a SPE e LC-MS/MS no modo HILIC pode-se notar que se atingiram LODs, LOQs e recuperações de acordo com as normas vigentes de validação como INMETRO e SANTE, sendo uma metodologia que permite a extração dos AHAs, com menor tempo de extração, menor consumo de solvente e menor custo quando comparado com métodos oficiais estabelecidos pela USEPA.

Vol. de amostra (mL)	pH das amostras	Vol. de solvente na extração (mL)	Metodologia	Recuperação	RSD (%)	Referência
100	5,0		LLE, GC-ECD	59 – 114	< 20	USEPA 552.1(USEPA, 1999)
0,10	NI		ID, IC-MS/MS	83 – 101		USEPA 557.1 (USEPA, 2009)
100	1,5	8	SPE, LC-MS/MS	27 – 102	< 20	(PRIETO-BLANCO et al., 2012)
50	1,3	3	SPE, SAI-PCR-IC	90 – 114	< 20	(HENSON; EMMERT; SIMONE, 2014)
1000 0,015	< 2,0 NI	0,0015	SPE, GC-MS ID, LC-MS/MS	4 –100 81 – 108	< 20 0,2 – 11	(KINANI et al., 2018) (MENG et al., 2010)
0,10	NI		ID, LC-MS/MS	69 – 128	0,8 – 24,5	(PLANAS et al., 2019)
0,20	1,8		ID, LC-ESI(-)- HRMS	47 – 116	1,5 – 25	(POSTIGO; EMILIANO; VALERO, 2020)
0,01	4,1		ID, LC-MS/MS HILIC	77 – 130	< 20	Método proposto
250	1,0	2	SPE, LC-MS/MS HILIC	50 – 120	< 20, exceto MBAA	Método proposto

Tabela 21: Comparação entre os métodos neste trabalho com os métodos oficiais estabelecidos pela USEPA e outros métodos empregados para a determinação dos AHAs em amostras de águas.

RSD: Desvio padrão; NI: Não informado; ID: Injeção Direta; LLE: Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid Liquid Extraction*; SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*; GC-ECD: Cromatografia Gasosa com detecção por Captura de Elétrons, do inglês *Gas Chromatography-Electron Capture Detection*; IC-MS/MS: Cromatografia de Íons acoplada ao Detector de Espectrometria de Massas, do inglês *Ion Chromatography tandem Mass Spectrometry;* LC-MS/MS: Cromatografia Líquida acoplada ao Detector de Espectrometria de Massas, do inglês *High Performance Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry;* HRMS: HRMS: Alta resolução acoplado ao Detector por Espectrometria de Massas, do inglês, *High Resolution with Mass Spectrometer;* HILIC: Cromatografia de Interação Hidrofílica, do inglês *Hydrophilic Interaction Chromatography*

5.11. Aplicabilidade dos métodos propostos

Os métodos propostos foram aplicados em amostras de água de abastecimento público coletadas em dezembro de 2020 no estado do Rio Grande do Sul. Três amostras foram coletadas na saída das ETAs CORSAN das localidades Camaquã (CMQ), Santa Vitória do Palmar (SVP), Rio Grande (RG1). Além disso, na cidade Rio Grande foram coletadas amostras diretamente da torneira nos bairros Carreiros (RG2) e Balneário Cassino (RG3).

Depois de avaliar os métodos propostos foi considerado analisar os AHAs por ID das amostras, como técnica de preparo de amostras, devido que foi obtida melhor recuperação durante o método de validação dos analitos. Além disso, a ID torna-se um método rápido e simples com menos etapas de preparo, evitando erros e maior tempo de análise. Portanto, as amostras foram injetadas no equipamento após eliminação do cloro residual, filtração e acidificação para economizar tempo e reduzir o consumo do reagente, comparando com a SPE.

Na **Tabela 22** são apresentadas as propriedades físico-químicas das amostras analisadas, com relação ao pH, turbidez e condutividade elétrica.

Darâmatraa	Amostras					
Farametros	RG1	RG2	RG3	CMQ	SVP	
рН	6,00	5,64	6,09	6,12	6,00	
Turbidez (uT)	0,30	0,78	1,00	0,42	0,29	
Condutividade (µS cm ⁻¹)	0,16	0,19	0,13	0,08	0,34	

 Tabela 22: Propriedades físico-químicas das amostras analisadas.

uT: Unidade de Turbidez; µS cm-1: Unidade de condutividade

Os valores de pH variam entre 5,64 e 6,09. O pH das amostras tratadas no Brasil devem estar entre 6,0 e 9,5. Pode-se notar que os valores referenciados estão de acordo com a regulamentação estabelecida pela Portaria No. 5 de 2017 (BRASIL, 2017), com exceção do pH das amostras coletadas na FURG, que ainda de apresentar um valor de pH baixo do limite, pode-se considerar dentro da faixa permissível para este estudo. Enquanto que os valores de turbidez variaram entre 0,29 e 0,78 uT. A turbidez das amostras tratadas deve ser \leq 5 uT, e os valores das amostras se encontram dentro dos valores permitidos (BRASIL, 2017). Finalmente, a condutividade elétrica variou de 0,08 a 0,34 µS cm⁻¹ para as amostras coletadas. Na **Tabela 23** são apresentados os AHAs encontrados nas amostras de água de abastecimento, por ID e LC-MS/MS. O analito mais abundante detectado foi DCAA em amostras de água de abastecimento RG3 (33,6 μ g L⁻¹) e RG1 (15,3 μ g L⁻¹). Também foi encontrado DBAA na amostra RG3, mas em concentrações menores que o LOQ (<10 μ g L⁻¹). Enquanto os outros AHAs não foram detectados nas amostras de água de abastecimento analisadas.

Pode-se observar que ao longo do sistema de distribuição, a concentração de AHAs tende a aumentar, como é o caso da amostra RG3, atribuído ao grande tempo de contato entre o agente desinfetante e o MON. Marcoux et al. (2017) mostraram que, em alguns casos, 80% dos DBPs medidos em amostras de água, já estão formados quando a água sai da planta e entra no sistema de distribuição.

Tabela	23: AHA	s encon	trados (em águas	de al	bastecimei	nto	em di	ferentes	localida	ades
de Rio	Grande	do Sul,	Brasil,	coletadas	em	dezembro	de	2020	e suas	respec	tivas
concen	trações r	nédias ((µg L ⁻¹)	± desvio p	adrã	o (%).					

Mátada			D e LC-MS/MS				
Melodo	Concentração (µg L ⁻¹) [± RSD (%), n = 3]						
Compostos	RG1	RG2	RG3	CMQ	SVP		
MCAA	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d		
DCAA	15,3 ± 9	<10	33,6 ± 12	<10	<10		
MBAA	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d		
DBAA	<10	<10	<10	<10	<10		
BCAA	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d		
DBCAA	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d		

n.d: Não detectado

Pode-se observar que os níveis detectados dos analitos usando o método da ID e LC-MS/MS se encontram a baixo do LMC estabelecido pelas regulamentações nacionais Σ_{AHAs5} 80 µg L⁻¹ (BRASIL, 2017) e internacionais 60 µg L⁻¹ Σ_{AHAs5} (USEPA 2018) e DCAA 50 µg L⁻¹ (WHO, 2017). É válido ressaltar que a presença dos analitos foi majoritariamente encontrada em amostras do município de Rio Grande (RG1 e RG3), o que pode ser explicado pelas problemáticas que apresentam estas localidades. No último, diagnóstico do sistema de abastecimento em Rio Grande do ano 2003, foram estabelecidos que existem reclamações por parte da população relacionados com a presença de cor, gosto e odor alterados na água; rompimento das ligações e tubulações; água com sabor e odor alterados por cloro (PREFEITURA MUNICIPAL DO RIO GRANDE, 2013). Além disso, as áreas do entorno dos Bairro Cassino são utilizadas como depósito de resíduos provenientes de manutenções na rede distribuição; o que pode dar noção de presença de material orgânico que pode ser infiltrado e no contato com o cloro presente na água pode formar os AHAs (PREFEITURA MUNICIPAL DO RIO GRANDE, 2013).

Por outro lado, houve maior presença do DCAA, com respeito ao resto dos AHAs, em 40% do total das amostras testadas. O DCAA é um dos AHAs mais abundantemente formados nas águas desinfectadas (ATES et al., 2007; KAMDI et al., 2016). O DCAA é considerado um provável cancerígeno humano segundo o IRIS e USEPA, razão pela qual procura-se um limite máximo objetivo de contaminação do DCCA nas águas de 0 µg L⁻¹ (USEPA, 2018).

Dixon et al. (2004) quantificaram este analito usando intercâmbio iônico e HILIC-LC/MS/MS, na faixa de concentrações de 8,24 a 30,3 µg L⁻¹ em águas de abastecimento por cloração em Atlanta. Anos mais tarde, Prieto-Blanco et al. (2012) não detectaram DCAA em amostras de água da torneira (LOQ = 0,81 µg L⁻¹) em Porto Lisboa, Portugal. Enquanto que Luo et al. (2013) quantificaram os nove AHAs e detectaram para DCAA uma faixa de concentração de 11,6 a 15,1 µg L⁻¹ em águas potáveis de estações de tratamento na China.

Estudos mais recentes feito por Zhang et al. (2020) quantificaram este analito, obtendo uma máxima concentração de 12,4 μ g L⁻¹ e sendo uma das espécies mais abundantes em amostras de água potável. Concentrações mais baixas foram encontradas por Postigo et al. (2020) que quantificaram os nove AHAs maiormente formados, junto a AHAs iodados e dalapon, encontrando concentrações < 1 μ g L⁻¹, e Cheng et al. (2021), encontraram concentrações de 1,83 e 2,03 μ g L⁻¹ nas cidades de Nanying e Jiangyin na China, respectivamente.

Por tanto, as concentrações de DCAA encontradas neste estudo são semelhantes ao que vem sendo detectadas em diferentes países (**Tabela 2** e **Tabela 3**), e pode ser um dos AHAs majoritariamente monitorados.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo foram propostos dois métodos para a determinação de AHAs em amostras de água de abastecimento.

O método proposto empregando ID e LC-MS/MS apresentou valores dentro dos sugeridos pelos guias de validação para todas as figuras de mérito avaliadas, demonstrando exatidão (70-120%) e precisão (RSD<20%) aceitáveis (INMETRO, 2019). A maior desvantagem desse método são os valores de LOQ, que embora atendam os valores estipulados pelas legislações para alguns dos AHAs não são compatíveis muitas vezes com os valores que vêm sendo detectados em amostras reais. Mas, se tratando de verificação de rotina, para verificar se as amostras atendem os requisitos de legislação, o método apresenta grandes vantagens, principalmente no que diz respeito a dificuldade de trabalho com este tipo de moléculas. Além disso, poucas etapas durante o preparo de amostra torna a análise mais confiável, e com menor chance de perdas. As únicas etapas realizadas na ID proposta são uma etapa de adição de tiossulfato de sódio e acidificação da amostra.

O método empregando SPE, utilizou 250 mL de amostra acidificada (pH 1,0) extração em cartucho contendo fase polimérica e eluição com 2 mL de MeCN.

Uma vez que o objetivo deste trabalho estava em propor métodos que permitissem o uso do LC-MS/MS e evitassem a etapa de derivatização, alguns aspectos do trabalho merecem destaque, como a simplicidade do uso da ID quando os valores de LOQ atenderem a demanda, e a praticidade da SPE, na qual o extrato obtido é diretamente analisado por LC-MS/MS, sem necessidade de troca de solvente e de nenhum processo de derivatização.

O método empregando ID e LC-MS/MS mostrou-se adequado para análise do DCAA em amostras de água tratadas no município de Rio Grande, quantificando concentrações menores ao LMCs permissíveis pelas diferentes legislações e regulamentações internacionais e nacionais.

Enfim, o estudo demonstrou diferentes possibilidades para determinação de AHAs por LC-MS/MS. Os resultados mostram que o método proposto pode atender aos requisitos para a determinação de seis AHAs em amostras de água considerando as propriedades ácidas e polares dessas moléculas, e ser uma alternativa aos métodos atuais que necessitam de processo de derivatização, longo tempo e mais estágios de extração para determinar estes analitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU HASAN, H.; MUHAMMAD, M. H.; ISMAIL, N. I. A review of biological drinking water treatment technologies for contaminants removal from polluted water resources. **Journal of Water Process Engineering**, v. 33, n. May 2019, p. 101035, 2020.

AHMAD, W. et al. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for pesticide analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 72, p. 181–192, 2015.

AL-SHATRI, M. A.; NUHU, A. A.; BASHEER, C. Determination of Haloacetic Acids in Bottled and Tap Water Sources by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and GC-MS Analysis. **Scientific World Journal**, v. 2014, p. 2-9, 2014.

ALBERTONI, et al. Water quality of the São Gonçalo channel, urban and agricultural water supply in southern Brazil. **RBRH**, v. 22, p. 1-10, 2017.

ALEXANDROU, L.; MEEHAN, B. J.; JONES, O. A. H. Regulated and emerging disinfection by-products in recycled waters. **Science of the Total Environment**, v. 637, p. 1607-1616. 2018.

ALPERT, A. J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 499, n. C, p. 177–196, 1990.

ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 641–654, 2016.

ATES, N. et al. Occurrence of disinfection by-products in low DOC surface waters in Turkey. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, p. 526-534, 2007.

AUD. ASSOCIAÇÃO DOS USUÁRIOS DA BARRAGEM DO ARROIO DURO. Qualidade física e química da água de irrigação e de drenagem do perímetro de irrigação do arroio duro (AUD–CAMAQUÃ) de 2005 A 2012, 2015. Disponível em: http://aud.org.br/p.php?id=35&Monitoramento+da+Qualidade+de+%C3%81gua. Acesso em 01 Abril 2021.

BARRON, L.; PAULL, B. Determination of haloacetic acids in drinking water using suppressed micro-bore ion chromatography with solid phase extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, n. 2, p. 153–161, 2004.

BASSO, B. A. An Investigation into the Effect of Chemical and Physical Polymer Structure on Reverse Phase Extraction of Small Molecules such as Paracetamol and Haloacetic Acids. **Chromatography Today**, v. 9, n. 4, p. 26–30, 2016.

BELLAR, T. A.; LICHTENBERG, J. J.; KRONER, R. C. Occurrence of Organohalides in Chlorinated Drinking Waters. **Journal of American Water Works Association**, v. 66, n. 12, p. 703–706, 1974.

BEAUCHAMP, N. et al. Relationships between DBP concentrations and differential UV

absorbance in full-scale conditions. Water Research, v. 131, p. 110-121, 2018.

BOND, T. et al. A critical review of trihalomethane and haloacetic acid formation from natural organic matter surrogates. **Environmental Technology Reviews**, v. 1, n. 1, p. 93–113, 2012.

BOON, H.; FONG, S.; LI, Y. Simultaneous determination of bromate , chlorite and haloacetic acids by two-dimensional matrix elimination ion chromatography with coupled conventional and capillary columns. **Journal of Chromatography A,** v. 1383, p. 112–120, 2015.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano**, Brasília, DF. 2006. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf. Acesso em 28 Fev 2021.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011: Padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano**, Brasília, DF., 2011. Disponível em https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Acesso em 23 Jan 2021.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria de Consolidação Nº 5 de 28 de setembro de 2017,** Brasília, DF. 2017. Disponível em: https://www.normasbrasil.com.br/norma/portaria-de-consolidacao-5-2017 356387.htmlmbro-de-2017.pdf>. Acesso em 23 Jan 2021.

BRUZZONITI, M. C. et al. High performance ion chromatography of haloacetic acids on macrocyclic cryptand anion exchanger. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, n. 1–2, p. 188-196, 2008.

BRUZZONITI, M. C. et al. Towards the revision of the drinking water directive 98/83/EC. Development of a direct injection ion chromatographic-tandem mass spectrometric method for the monitoring of fifteen common and emerging disinfection by-products along the drinking water suppl. **Journal of Chromatography A**, v. 1605, p. 3603-50, 2019.

CALDAS, S. S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Quimica Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CALDAS, S. S. **Otimização e validação de métodos empregando DLLME, SPE, HPLC-DAD e LC-ESI-MS/MS para determinação de agrotoxicos em água subterrânea**. 2009. p. 145. Dissertacao (Mestrado em Químita Tecnologica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009.

CAMPER, A. K.; MCFETERS, G. A. Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 633–641, 1979.

CARDADOR, M. J.; FERNÁNDEZ-SALGUERO, J.; GALLEGO, M. Simultaneous quantification of trihalomethanes and haloacetic acidsin cheese by on-line static headspace gas chromatography-massspectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1408, p. 22–29, 2015.

CHEN, C.; CHANG, S.; WANG, G. Determination of Ten Haloacetic Acids in Drinking Water Using High-Performance and Ultra-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry. **Journal of chromatographic Science**, v. 47, p. 67–74, 2009.

CHENG, S. et al. S. Rapid determination of trace haloacetic acids in water and wastewater using non-suppressed ion chromatography with electrospray ionizationtandem mass spectrometry. **Science Total Environmenta**l, v. 754, p. 142-297, 2021. COOK-BOTELHO, J. C.; BACHMANN, L. M.; FRENCH, D. Steroid hormones: **In Mass Spectrometry.for the Clinical Laboratory**, Academic Press, 2017, cap. 10, p 205-230.

DELINSKY, A. D. et al. Analysis of dichloroacetic acid in rat blood and tissues by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 8, p. 1075–1083, 2005.

DINH, N. P.; JONSSON, T.; IRGUM, K. Water uptake on polar stationary phases under conditions for hydrophilic interaction chromatography and its relation to solute retention. **Journal of Chromatography A**, v. 1320, p. 33–47, 2013.

DIXON, A. M. et al. Analysis of dichloroacetic acid in drinking water by ion exchange HILIC-LC/MS/MS. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 27, n. 15, p. 2343–2355, 2004.

FARAJZADEH, M. A.; ABBASPOUR, M. Development of a new sample preparation method based on liquid–liquid–liquid extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction and its application on unfiltered samples containing high content of solids. **Talanta**, v. 174, p. 111–121, 2017.

FONT-RIBERA, L. et al. Environmental and personal determinants of the uptake of disinfection by-products during swimming. **Environmental Research**, v. 149, p. 206–215, 2016.

FRANCO, E. S. **Avaliação da formação de trialometanos e ácidos haloacéticos decorrentes da cloração de águas de abastecimento contendo cianobactérias**. 2018. Tese (Doutorado.em em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

FUENTES, R. et al. Caracterización de la materia orgánica disuelta en agua subterránea del valle de toluca mediante espectrofotometría de fluorescencia 3D. **Revista internacional de contaminación ambiental**, v. 31, n. 3, p. 253–264, 2015.

GAN, W. et al. The occurrence of disinfection by-products in municipal drinking water in China's Pearl River Delta and a multipathway cancer risk assessment. **Science of** the Total Environment, v. 447, p. 108–115, 2013.

GITIS, V.; HANKINS, N. Water treatment chemicals: Trends and challenges. **Journal** of Water Process Engineering, v. 25, p. 34–38, 2018.

GRECO, G.; LETZEL, T. Main interactions and influences of the chromatographic parameters in HILIC separations. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 7, p. 684–693, 2013.

HALL, E. L.; DIETRICH, A. M. A Brief History of Drinking Water. **Opflow**, Virginia, p. 46-49. Junho de 2000.

HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 8th. ed. New Yor: Macmillan, 2010. HARTMANN, J. et al. Risk governance of potential emerging risks to drinking water quality: Analysing current practices. **Environmental Science and Policy**, v. 84, p. 97– 104, 2018.

HE, K. et al. Formation of chlorinated haloacetic acids by chlorination of low molecular weight compounds listed on pollutant release and transfer registers (PRTRs). **Journal of Hazardous Materials**, v. 351, p. 98–107, 2018.

HEALTH CANADA. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality Summary Table Prepared by the Federal-Provincial-Territorial Committee on Drinking Water of the Federal-Provincial-Territorial Committee on Health and the Environment, Canada, 2019. Disponível em https://www.canada.ca/en/healthcanada/services/environmental-workplace-health/reports-publications/waterquality/guidelines-canadian-drinking-water-quality-summary-table.html. Acesso em 22 Jan 2021.

HEMSTRÖM, P.; IRGUM, K. Hydrophilic interaction chromatography. **Journal of separation science**. V. 12, p. 1784-1821, 2006.

HENSON, C. M.; EMMERT, G. L.; SIMONE, P. S. A fully-automated analyzer for determining haloacetic acid concentrations in drinking water. **Chemosphere**, v. 117, p. 586–595, 2014.

HERNÁNDEZ-COBOS, J. et al. A general purpose acetonitrile interaction potential to describe its liquid, solid and gas phases. **Journal of Molecular Liquids**, v. 318, p. 113975, 2020.

HO, C. S. et al. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. **The Clinical biochemist**. Reviews, v. 24, n. 1, p. 3–12, 2003. HU, S. et al. Simultaneous determination of iodinated haloacetic acids and aromatic iodinated disinfection byproducts in waters with a new SPE-HPLC-MS/MS method. **Chemosphere**, v. 198, p. 147–153, 2018.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFÍA E ESTATÍSTICA. **O Estado do Rio Grande do Sul**, 2020. Disponível em: https://www.ibge.gov.br/cidades-eestados/rs.html. Acesso em 02 ar 2021. IBRAHIM, M. E. A.; LUCY, C. A. Stationary Phases for Hilic. Hydrophilic Interaction Chromatography: A Guide for Practitioners. Hoboken: Wiley. 2013, p. 43–85.

INMETRO. DOQ-CGCRE-008 ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS-REVISÃO 09, Brasília, 2020. Disponível em: https:// http://www.inmetro.gov.br/. Acesso em 28 Fev 2021.

JANDERA, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, n. 1–2, p. 1–25, 2011.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JIMÉNEZ, B.; GALIZIA, J. **Diagnóstico del agua en las américas**. Red Interamericana de Academias de Ciencias (IANAS). México. 2012. 98p.

KADMI, Y. et al. Improved Determination of Dichloroacetic and Trichloroacetic Acids in Water by Solid Phase Extraction Followed by Ultra-high Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, v. 49, n. 3, p. 433– 443, 2016.

KIM, S. et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. **Nucleic Acids Research**, v. 47, p. 1102-1109, 2020

KINANI, A.; KINANI, S.; BOUCHONNET, S. Formation and determination of organohalogen by-products in water – Part II. Sample preparation techniques for analytical approaches. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 281–294, 2016.

KINANI, A. et al. A sensitive and specific solid-phase extraction–gas chromatography– tandem mass spectrometry method for the determination of 11 haloacetic acids in aqueous samples. **European Journal of Mass Spectrometry**, v. 24, n. 5, p. 375–383, 2018.

KRUVE, A. et al. Negative electrospray ionization via deprotonation: Predicting the ionization efficiency. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 10, p. 4822–4830, 2014. LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. 1ra. ed. São Carlo, SP, Brasil: RiMa, 2004. 93p.

LANÇAS, F. M. Cromatografía líquida moderna: HPLC. São Paulo, Brasil: Átomo, 2009. 39p.

LANÇAS, F. M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 49–57, 2010.

LI, Y.; WHITAKER, J. S.; MCCARTY, C. L. Analysis of iodinated haloacetic acids in drinking water by reversed-phase liquid chromatography / electrospray ionization / tandem mass spectrometry with large volume direct aqueous injection. **Journal of**

Chromatography A, v. 1245, p. 75–82, 2012.

LI, C. et al. Formation of known and unknown disinfection by-products from natural organic matter fractions during chlorination, chloramination, and ozonation. **Science of the Total Environment**, v. 587–588, p. 177–184, 2017.

LO, T. C., BAIRD, M., HANSON, C. **Handbook of solvent extraction**. 1st. ed. New York: Wiley. 1983, 644p.

LOOS, R.; BARCELO, D. Determination of haloacetic acids in aqueous environments by solid-phase extraction followed by ion-pair liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1–2, p. 45–55, 2001.

LUO, Q. et al. Optimized chromatographic conditions for separation of halogenated acetic acids by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1277, p. 26–34, 2013.

MACÊDO, L. P. R. et al. Comparative ecotoxicological evaluation of peracetic acid and the active chlorine of calcium hypochlorite: Use of Dugesia tigrina as a bioindicator of environmental pollution. **Chemosphere**, v. 233, p. 273–281, 2019.

MAGNUSSON, B. AND ÖRNEMARK, U. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics 2nd Ed**, England, 2014. Disponível em: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf. Acesso em 28 Fev 2021.

MANASFI, T. et al. Identification of disinfection by-products in freshwater and seawater swimming pools and evaluation of genotoxicity. **Environment International**, v. 88, p. 94–102, 2016.

MARCOUX, A. et al. Behavior of non regulated disinfection by-products in water following multiple chlorination points during treatment. **Science Total Environmental**, v. 586, p. 870-878, 2017.

MARTINS, M. L. et al. Dilution standard addition calibration: A practical calibration strategy for multiresidue organic compounds determination. **Journal of Chromatography A**, v. 1460, p. 84–91, 2016.

MENG, L. et al. Trace determination of nine haloacetic acids in drinking water by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 29, p. 4873–4876, 2010.

MITCHELL, K.; FORDE, M. S.; NEPTUNE, A. Water Quality in the Americas: Risks and Opportunities. 1st. ed. México. 2019. 107p.

MOHAMED, H. M. Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 66, p. 176–192, 2015.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Quimica Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017.

MONTES, R. et al. Environmental applications (water). In: **Solid-Phase Extraction**. Santiago de Compostela: Handbooks in Separation Science, 2020, cap. 23, p. 609-645.

NATIONAL STANDARD OF THE PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA. **National Standard of the People's Republic of China, Ministry of Health**, 2006. Beijing. Disponível em http://en.nhc.gov.cn/. Acesso 28 Fev 2021.

NEGREIRA, N. et al. Transformation of tamoxifen and its major metabolites during water chlorination: Identification and in silico toxicity assessment of their disinfection byproducts. **Water Research**, v. 85, p. 199–207, 2015.

NOGA, S.; BOCIAN, S.; BOGUSŁAW BUSZEWSKI. Hydrophilic interaction liquid chromatography columns classification by effect of solvation and chemometric methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1278, 2013.

NSUBUGA, H.; BASHEER, C. Determination of haloacetic acids in swimming pool waters by membrane-protected micro-solid phase extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1315, p. 47–52, 2013.

OTHMER, D. F.; WHITE, R. E.; TRUEGER, E. Liquid-Liquid Extraction Data. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 33, n. 10, p. 1240–1248, 1941.

ON, J.; PYO, H.; MYUNG, S. W. Effective and sensitive determination of eleven disinfection byproducts in drinking water by DLLME and GC–MS. **Science of the Total Environment**, v. 639, p. 208–216, 2018.

PALUMBO, D. J. et al. Analysis of Haloacetic Acids (HAA5) in Waters of Public Schools and Residencies in Maringa-Brazil. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 10, n. 11, p. 1083–1089, 2018.

PLANAS, C. et al. Simultaneous analysis of 11 haloacetic acids by direct injectionliquid chromatography-electrospray ionization-triple quadrupole tandem mass spectrometry and high resolution mass spectrometry: occurrence and evolution in chlorine-treated water. **Analytical and bioanalytical Chemistry**, v. 411, n. 17, p. 3905–3917, 2019.

PLEWA, M. et al. Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of the haloacetic Acids, a major class of drinking water disinfection by-products. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 405, p. 391–405, 2010.

POOLE, C. F. New trends in solid-phase extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 6, p. 362–373, 2003.

POSTIGO, C. et al. Chemical characterization and relative toxicity assessment of

disinfection byproduct mixtures in a large drinking water supply network. **Journal of Hazardous Materials**, v. 359, n. July, p. 166–173, 2018.

POSTIGO, C.; EMILIANO, P.; VALERO, F. High-throughput and reliable determination of 13 haloacetic acids and dalapon in water and evaluation of control strategies. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 5, p. 6–11, 2020.

POWERS, L.; GONSIOR, M. Non-targeted screening of disinfection by-products in desalination plants using mass spectrometry: A review. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 7, p. 52–60, 2019.

PREFEITURA MUNICIPAL DO RIO GRANDE. Plano municipal de saneamento básico do município do Rio Grande: Diagnóstico do saneamento básico: Tomo I: Abastecimento de água e esgotamento sanitário, Rio Grande, 2013. Disponível em:

https://www.riogrande.rs.gov.br/planosaneamento/arquivos/home/(1)_Relatorio_de_a presentacao_do_PMSB_RG.pdf. Acesso em 22 Jan 2021.

PRIETO-BLANCO, M. C. et al. Improving methodological aspects of the analysis of five regulated haloacetic acids in water samples by solid-phase extraction, ion-pair liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 94, p. 90–98, 2012.

REZAEE, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1–2, p. 1–9, 2006.

RICHARDSON, S. D. et al. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. **Mutation Research**, v. 636, n. 1–3, p. 178–242, 2007.

RICHARDSON, S. D. Disinfection By-Products: Formation and Occurrence in Drinking. **Encyclopedia of Environmental Health**, Athens, p. 110–136, 2011.

RIGHI, E. et al. Bromate, chlorite, chlorate, haloacetic acids, and trihalomethanes occurrence in indoor swimming pool waters in Italy. **Microchemical Journal**, v. 113, p. 23–29, 2014.

ROSA, P. S. Determinação de ácidos haloacéticos em águas de consumo humano por UPLC-MS/MS. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenheira Química) – Técnico Lisboa, Lisboa, 2010.

ROOK, J. J. Haloforms in drinking water. **Journal of American Water Works Association**, v. 68, n. 3, p. 168–172, 1976.

ROUMIGUIÈRES, A. et al. Development and validation of a multiclass method for the determination of organohalogen disinfectant by-products in water samples using solid phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1579, p. 89–98, 2018.

SALAS, D. et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based detection to determine emerging organic contaminants in environmental samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 94, p. 141–149, 2017.

SANTE. Analytical Quality Control and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/12682/2019). Europa, 2019. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdo c 2019-12682.pdf. Acesso em 28 Fev 2021.

SIELC. HILIC **Separation of Carboxylic Acids**. Disponível em: https://www.sielc.com/Application-HILIC-Separation-of-Carboxylic-Acids.html. Acesso em 22 Jan 2021.

SILVA, C. P. **Determinação de ácidos haloacéticos em água utilizando técnicas cromatográficas**. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

SILVA, C. G. A. DA; BOTTOLI, C. BEATRIZ G.; COLLINS, C. H. Cromatografia por interações hidrofilicas (HILIC): Estado da arte e aplicações. **Quimica Nov**, v. 39, n. 2, p. 210–220, 2016.

SHI, H.; QIANG, Z.; ADAMS, C. Formation of haloacetic acids, halonitromethanes, bromate and iodate during chlorination and ozonation of seawater and saltwater of marine aquaria systems. **Chemosphere**, v. 90, n. 10, p. 2485–2492, 2013.

SERRANO, M. et al. Seasonal evaluation of the presence of 46 disinfection byproducts throughout a drinking water treatment plant. **Science of the Total Environment**, v. 517, p. 246–258, 2015.

SPRAKEL, L. M. J.; SCHUUR, B. Solvent developments for liquid-liquid extraction of carboxylic acids in perspective. **Separation and Purification Technology**, v. 211, n. September 2018, p. 935–957, 2019.

STEFÁN, D. et al. Formation of chlorination by-products in drinking water treatment plants using breakpoint chlorination. **Microchemical Journal**, v. 149, n. February, p. 104008, 2019.

UFRGS. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. **Plano Municipal de Saneamento Básico do Município de Santa Vitória do Palmar, RS: Diagnóstico Técnico Participativo**. Porto Alegre. 2014. Disponível em: http://www.ufrgs.br/planomsb/municipios/santaVitoriaDoPalmar/relatorios/pdf. Acesso em 01 Abril 2021.

USEPA. UNITED STATE ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capture detection. Ohio. 1995.

USEPA. UNITED STATE ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidelines for carcinogen risk assessment. Washington, DC. 2005. Disponível em:

http://www.epa.gov/sites/production/files/2013-09/documents/cancer_guidelines_final_3-25-05.pdf>. Acesso em 28 Fev 2021.

USEPA. METHOD 557 : DETERMINATION OF HALOACETIC ACIDS , BROMATE , AND DALAPON IN DRINKING WATER BY ION CHROMATOGRAPHY ELECTROSPRAY IONIZATION TANDEM MASS SPECTROMETRY (IC-ESI-MS / MS). EUA, 2009. Disponível em https://nepis.epa.gov/. Acesso em 22 Out 2020.

USEPA. UNITED STATE ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. **2018 Edition** of the Drinking Water Standards and Health Advisories Tables. Washington, DC. 2018.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF); (WHO), W. H. O. Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2017: Special focus on inequalities. Launch version July 12 Main report Progress on Drinking Water, Sanitation and Hygiene, 2019. Disponível em https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/jmp-2019-full-report.pdf. Acesso em 23 Jan 2021.

THURMAN, E. M., MILLIS, M. S. Solid-phase extractio: Principles and Practice. In: **Solid-Phase Extraction**. New York: John Wiley, 1998, p. 35–73.

TUBIĆ, A. et al. Insight into changes during coagulation in NOM reactivity for trihalomethanes and haloacetic acids formation. **Journal of Environmental Management**, v. 118, p. 153–160, 2013.

VERDUGO, E. M. et al. Formation of trihalomethanes and haloacetic acids during chlorination of functionalized carbon nanotubes. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 6, p. 1327–1339, 2016.

VERREY, D. et al. Direct determination of trace-level haloacetic acids in drinking water by two-dimensional ion chromatography with suppressed conductivity. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 608–613, 2013.

WANG, J. et al. Review on the treatment of organic pollutants in water by ultrasonic technology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 55, p. 273–278, 2019.

WANG, Y. et al. Target quantification and semi-target screening of halogenated carboxylic acids in drinking water using ultra-high performance liquid chromatographyquadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1614, p. 460710, 2020.

WAWRYK, N. J. P. et al. New methods for identification of disinfection byproducts of toxicological relevance: Progress and future directions. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 99, p. 151–159, 2021.

WEINBERG, H. S. et al. Occurrence of a New Generation of Disinfection Byproducts †. p. 7175–7185, 2006.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for Drinking-water Quality.

Genova. 2017.

WU, S. et al. Analysis of haloacetic acids, bromate, and dalapon in natural waters by ion chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1487, p. 100–107, 2017.

XU, X. et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography method development and validation for the assay of HEPES zwitterionic buffer. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 135, p. 227–233, 2017.

XUE, R. et al. Rapid simultaneous analysis of 17 haloacetic acids and related halogenated water contaminants by high-performance ion chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 6613–6622, 2016.

YANG, X.; SHANG, C.; WESTERHOFF, P. Factors affecting formation of haloacetonitriles, haloketones, chloropicrin and cyanogen halides during chloramination. **Water Research**, v. 41, n. 6, p. 1193–1200, 2007.

YANG, M.; ZHANG, X. Current trends in the analysis and identification of emerging disinfection byproducts. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 10, p. 24–34, 2016.

YANG, L. et al. Regulation, formation, exposure, and treatment of disinfection byproducts (DBPs) in swimming pool waters: A critical review. **Environment International**, v. 121, n. October, p. 1039–1057, 2018.

YOSHIKAWA, K.; SODA, Y.; SAKURAGAWA, A. Determination of chloroacetic acids in drinking water using suppressed ion chromatography with solid-phase extraction. **Analytical Sciences**, v. 25, n. 12, p. 1491–1494, 2009.

YU, Y. et al. The occurrence and transformation behaviors of disinfection byproducts in drinking water distribution systems in rural areas of eastern China. **Chemosphere**, v. 228, p. 101–109, 2019.

ZENG, T.; PLEWA, M. J.; MITCH, W. A. N-Nitrosamines and halogenated disinfection byproducts in U.S. Full Advanced Treatment trains for potable reuse. **Water Research**, v. 101, p. 176–186, 2016.

ZHAI, H. et al. Chemosphere Disinfection byproduct formation in drinking water sources : A case study of Yuqiao reservoir. **Chemosphere**, v. 181, p. 224–231, 2017.

ZHANG, X. et al. Fast determination of nine haloacetic acids, bromate and dalapon in drinking water samples using ion chromatography–electrospray tandem mass Spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1621, p. 461052, 2020.

ZHANG, A. et al. Interference from haloacetamides during the determination of haloacetic acids using gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1612, p. 460-652,2019a.

ZHANG, T. et al. Chlorination of enoxacin (ENO) in the drinking water distribution

system: Degradation, byproducts, and toxicity. **Science of the Total Environment**, v. 676, p. 31–39, 2019b.

ZHENG, D. et al. Effects of coagulation on the removal of natural organic matter, genotoxicity, and precursors to halogenated furanones. **Water Research**, v. 70, p. 118–129, 2015.

ZHOU, R. et al. Determination of 10 Haloacetamides in drinking water by gas chromatography with automated solid phase extraction. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1150, p. 122-191, 2020.

APÊNDICE

Tabela 1: Condição de eluição no modo gradiente testado usando a coluna Obelisc N.

t (min)	Fase móvel (A) 5mM HCOOH + 10mM Formiato de amônia pH 4,1	Fase móvel (B) MeCN
0	2	98
3	2	98
4	20	80
5	80	20
15	80	20
16	2	98
22	2	98

Tabela 2: Condição de eluição no modo gradiente testado usando a coluna ObeliscN.

t (min)	Fase móvel (A) 50mM HCOOH + 10Mm formiato de amônia) pH 3,0	Fase móvel (B) MeCN
0	20	80
3	20	80
4	80	20
5	80	20
16	20	80
22	20	80
24	20	80
	Mais forte, porque incrementa a fase aquosa	

Tabela 3: Condição de eluição no modo gradiente testado usando a coluna HILIC Luna HPLC.

t (min)	Fase móvel (A) 5mM HCOOH + 10mM Formiato de amônia pH 4,1	Fase móvel (B) MeCN
0	2	98
3	2	98
4	20	80
5	60	40
15	60	40
16	2	98
21	2	98

t (min)	Fase móvel (A) A5mM HCOOH + 10mM Formiato de amonia)pH 4,1	Fase móvel (B) MeCN
0	2	98
3	2	98
4	20	80
5	80	20
15	80	20
16	2	98
22	2	98

Tabela 4: Condição de eluição no modo gradiente testado usando a coluna HILIC

 Luna HPLC.