

# Validação de método analítico por extração líquido-líquido e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para detecção de ácidos haloacéticos em amostras ambientais

*Validity of the analytical method of LLE-GC-MS for the detection of haloacetic acids in environmental samples*

Elton Franco<sup>1\*</sup> , Júlia Camargo<sup>1</sup>, Núbia Aguilar<sup>1</sup>, Diego Silva<sup>1</sup>, Jairo Rodrigues<sup>1</sup>, Valter Pádua<sup>2</sup>, Marcelo Libânio<sup>2</sup>, Alessandra Giani<sup>2</sup>, Layde Dyana Sierau<sup>2</sup> 

## RESUMO

O estudo teve como objetivo o desenvolvimento e a validação de um método analítico para detecção e quantificação de ácidos haloacéticos por meio da extração líquido-líquido e da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Para a validação, consideraram-se parâmetros como linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação e seletividade. Adicionalmente, aplicou-se o método para avaliar a formação de ácidos haloacéticos em ensaios de cloração de células de *Cylindrospermopsis raciborskii* com o oxidante hipoclorito de cálcio, simulando situações em estações de tratamento de água. O método apresentou baixo tempo de análise, excelente seletividade, precisão, repetitividade e sensibilidade, com possibilidade de aplicação para análises de rotina em substituição à cromatografia a gás por captura de elétrons. Observou-se a formação de ácidos haloacéticos durante os ensaios com doses de 2,5 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> do oxidante, com destaque para os ácidos dicloroacético e tricloroacético.

**Palavras-chave:** ácidos haloacéticos; extração líquido-líquido; cromatografia gasosa; espectrometria de massas; *Cylindrospermopsis raciborskii*.

## ABSTRACT

The objective of the study was to develop and validate an analytical method for the detection and quantification of haloacetic acids through liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis. For validation, parameters such as linearity, precision, detection and quantification limits, and selectivity were considered. Additionally, the method was applied to evaluate the formation of haloacetic acids in in *Cylindrospermopsis raciborskii* cell chlorination assays with the calcium hypochlorite oxidant, simulating full scale situations in water treatment plants. The method presented low analysis time, excellent selectivity, precision, repeatability, and sensitivity, with possibility of application for routine analysis in substitution gas chromatography by electron capture. The formation of haloacetic acids was observed during the tests with 2.5 and 5.0 mg.L<sup>-1</sup> doses of the oxidant, with emphasis on dichloroacetic and trichloroacetic acids.

**Keywords:** haloacetic acids; liquid-liquid extraction; gas chromatography; mass spectrometry; *Cylindrospermopsis raciborskii*.

## INTRODUÇÃO

Apesar dos benefícios no processo de controle de microrganismos e patógenos presentes na água de abastecimento, estudos demonstram que a utilização do cloro pode contribuir para a formação de subprodutos orgânicos halogenados (SOH) indesejados, tais como os trihalometanos (TAM) e os ácidos haloacéticos (AHA), quando há presença de matéria orgânica natural (MON) na água.

A MON pode ser derivada da decomposição das vegetações terrestre e aquática e da matéria orgânica algogênica (MOA), composta de algas e cianobactérias (CORAL *et al.*, 2013; ZAMYADI *et al.*, 2015).

Os AHA são compostos derivados do ácido acético para os quais os hidrogênios do grupo metilo podem ser substituídos por cloro e/ou bromo e iodo. Dependendo do grau de substituição, ocorre a formação de diferentes AHA: ácido

<sup>1</sup>Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - Teófilo Otoni (MG), Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte (MG), Brasil.

\*Autor correspondente: elton.santos@ufvjm.edu.br

Conflitos de interesse: os autores declaram não haver conflito de interesses.

Financiamento: nenhum.

Recebido: 12/02/2020 - Aceito: 31/07/2020 - Reg. ABES: 20200050

monocloroacético (AMCA), ácido monobromoacético (AMBA), ácido dicloroacético (ADCA), ácido dibromoacético (ADBA), ácido tricloroacético (ATCA), ácido tribromoacético (ATBA), ácido bromocloroacético (ABCA), ácido dibromocloroacético (ABDCA), ácido bromodichloroacético (ABDCA), ácido cloroiodoacético (ACIA), ácido bromoiodoacético (ABIA) e ácido diiodoacético (ADIA) (CARDADOR; SALGUERO; GALLEGO, 2015; HEALTH CANADA, 2019).

A soma das concentrações de ABDCA, ADBCA e ATBA é denominada AHA<sub>3</sub>, concentrações de AMCA, AMBA, ADCA, ADBA e ATCA são conhecidas como AHA<sub>5</sub>, e os AHA<sub>6</sub> referem-se à soma das concentrações de AHA<sub>5</sub> e ABCA. Juntos, os AHA<sub>6</sub> e os AHA<sub>3</sub> formam o AHA<sub>9</sub> e representam os AHA mais frequentes que se formam durante o processo de cloração. Com relação às espécies iodadas, apesar da ocorrência e alta toxicidade serem preocupantes, elas ainda não foram regulamentadas (USEPA, 1996; HEALTH CANADA, 2019).

Os AHA são substâncias classificadas pelas agências internacionais como agentes carcinogênicos para os seres humanos, o que torna extremamente relevante a realização de trabalhos de avaliação de risco (USEPA, 1996; 2012; WHO, 2011). Outros SOH potencialmente prejudiciais à saúde humana decorrentes da cloração da água também são relatados na literatura, como os TAM, haloaldeídos (HAD), halocetonas (HK), halofenóis (HF), halopicrinas (HP) e tricloronitrometano (TCNM) (LEGAY et al., 2010; BUTIÃO, 2011; GAN et al., 2013; CARDADOR; SALGUERO; GALLEGO, 2015). A inquietação acerca dos possíveis riscos à saúde dos seres humanos ocasionou a modificação da legislação de potabilidade de vários países, incluindo alguns dos compostos como obrigatórios no processo de monitoramento nas estações de tratamento de água (ETA). Os Estados Unidos e o Canadá, por exemplo, apresentam em sua legislação o limite de 60 e 80 µg.L<sup>-1</sup>, respectivamente, para os AHA<sub>5</sub> (USEPA, 1996; HEALTH CANADA, 2019).

No Brasil, foram regulamentados pela primeira vez na Portaria nº 2.914 de 2011 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), com valor máximo de 80 µg.L<sup>-1</sup> para AHA totais permitido na água destinada ao abastecimento público, valor esse correspondente ao somatório dos AMCA, ADCA, ATCA, AMBA, ADBA, ABCA, ABDCA, 1,2,3-tricloropropano e 2,2-dicloropropiônico (DALAPON). Em 2017, foi substituída pela Portaria da Consolidação nº 5 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017a), mantendo-se as substâncias monitoradas e o valor máximo permitido. Em 4 de maio de 2021, houve uma nova atualização, agora pela Portaria nº 888 (BRASIL, 2021), mantendo-se o valor máximo permitido em 80 µg.L<sup>-1</sup>, porém houve a adição das espécies ABDCA e ATBA e a retirada do 1,2,3-tricloropropano e DALAPON. Desse modo, as espécies monitoradas passaram a ser representadas pelos AHA<sub>9</sub>, e, com os TAM, representam os SOH que ocorrem em maior frequência em águas de abastecimento.

Além das substâncias orgânicas às quais, tradicionalmente, se atribui sua formação, estudos destacam e relacionam espécies de cianobactérias como parte importante na composição da MOA e, também, na formação de outros SOH (CORAL et al., 2013; ZAMYADI et al., 2015). A espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* é bem conhecida em águas tropicais do Brasil. Autores apontam o primeiro relato da ocorrência de *C. raciborskii*, em 1969, no Lago Paranoá em Brasília (DF). Grande expansão na distribuição ocorreu a partir da década de 1990, coincidindo com o aumento da eutrofização dos sistemas aquáticos nas mais diversas regiões do país (SANT'ANNA et al., 2008; ARAGÃO, 2011).

De modo geral, pode-se obter a determinação de SOH pela técnica de cromatografia, e, por estarem em baixas concentrações, necessitam de uma etapa de pré-concentração. Os SOH podem ser isolados da matriz aquosa pela

técnica de extração líquido-líquido (ELL), seguida pela determinação por cromatografia a gás por captura de elétrons (CG-DCE) (NIKOLAOU et al., 2002; CULEA; COZAR; RISTOIU, 2006; PAVÓN et al., 2008). Pela sua força ácida e caráter hidrofílico, os AHA não podem ser determinados diretamente por CG. Assim, a maioria dos métodos requer uma etapa de derivatização, que consiste na esterificação dos grupos carboxílicos, mais voláteis e menos polares. No decorrer dos anos, a ELL foi a técnica com maior aplicação para preparar as amostras dos AHA utilizadas pela United States Environmental Protection Agency (USEPA) (SILVA, 2010).

Para análise dos AHA, os métodos aprovados pela USEPA são os 552.1, 552.2, 552.3, e o Standard Methods recomenda o método 6251B. Em todos eles, os AHA são extraídos da amostra de água usando metil-terc-butílico éter (MTBE) ou resina de troca aniônica e são convertidos em ésteres metílicos usando diazometano ou metanol acidificado. Os métodos da USEPA recomendam a CG com DCE pela baixa concentração com que os AHA são encontrados em água potável (SILVA, 2010). Na literatura, observaram-se interferências nas etapas de extração e derivatização principalmente para AMCA e espécies bromadas, justificadas conforme Xie (2001), dadas as reações químicas com outras substâncias (impurezas) na etapa de extração e derivatização por metilação ácida.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) são, no Brasil, agências que realizam credenciamento para verificar a competência de laboratórios de ensaios, disponibilizando guias para o procedimento de validação de métodos. Os principais parâmetros de validação de métodos analíticos, mencionados por Ribani et al. (2004), Zanchetta, Pena e Gonçalves (2015), INMETRO (2016), Brasil (2017a; 2017b) e Franco et al. (2018; 2019a; 2019b) são: curva analítica, precisão, limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) e exatidão.

Considerando que os AHA formam um grupo de substâncias de interesse para os gerenciadores das ETA, a vigilância da qualidade da água e a comunidade científica, este trabalho tem como objetivo a proposta de validação de um método ELL por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) para a quantificação de AHA em águas de abastecimento. A técnica ELL-CG-DCE, recomendada pela USEPA, geralmente é mais sensível, todavia, uma das vantagens do EM é que ele indica a provável massa molar do composto de interesse com um elevado nível de precisão (CARERI; MANGIA, 2011). Franco et al. (2019a) validaram o método ELL-CG com EM, em detrimento à DCE (detector recomendado pela USEPA), para detecção e quantificação de TAM, e obteve excelentes resultados para seletividade, precisão, repetitividade, sensibilidade e baixo tempo de análise.

Nesse contexto, o objetivo do estudo foi desenvolver e validar um método analítico que utilizasse a técnica de ELL, seguido pela determinação por CG, utilizando a EM como alternativa para os métodos USEPA (ELL, seguidos pela determinação por CG-DCE) para detecção de AHA. Ainda, utilizaram-se amostras em condições experimentais da espécie *Cylindrospermopsis raciborskii* para analisar a formação de espécies de AHA, buscando reproduzir o efeito da cloração em florações típicas encontradas nos sistemas de abastecimento no Brasil.

## METODOLOGIA

### Validação do método de detecção de ácidos haloacéticos

A validação do método observou os seguintes parâmetros: inexistência de interferentes (seletividade), proporcionalidade entre a resposta da área de cada composto e

a concentração (curva de calibração e linearidade), determinação do limite de detecção e quantificação, exatidão e precisão (RIBANI *et al.*, 2004; ZANCHETTA; PENA; GONÇALVES, 2015; INMETRO, 2016; BRASIL, 2017b; FRANCO *et al.*, 2019a).

## Reagentes e materiais

A Portaria nº 888 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2021), que substituiu a Portaria da Consolidação nº 5 (BRASIL, 2017a), determina que, na água destinada ao abastecimento público, o valor correspondente ao somatório dos AHA, não deve ultrapassar 80 µg.L<sup>-1</sup>. Procedeu-se à aquisição de um padrão com nove espécies de AHA em que os compostos de monitoramento obrigatório pudessem estar inseridos. Padrões certificados de pureza cromatográfica de AHA (AMCA, AMBA, ADCA, ADBA, ATCA, ATBA, ABCA, ADBCA e ABDCA) (4-7787, TraceCERT®) e do padrão interno 1,2,3-tricloropropano (47669-U, TraceCERT®), ambos diluídos em MTBE da marca Sigma, foram adquiridos. Para a ELL, utilizaram-se metanol (646377), MTBE (34875), também da Sigma, ácido sulfúrico destilado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (obtido por meio do destilador subferroso de quartzo Kurner - Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha, para aumento de pureza), sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) (agentes secantes da fase orgânica) e bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>). Utilizou-se também água ultrapura obtida por meio do sistema de purificação de água da Thermo Fisher.

## Otimização das condições de extração e elaboração da curva de calibração

O método utilizado para a determinação cromatográfica baseou-se nas recomendações da USEPA 552.2 (USEPA, 1995) e 552.3 (USEPA, 2003). A derivatização foi necessária para transformar os ácidos carboxílicos em ésteres, procedimento efetuado por uma metilação ácida. Como as concentrações originais dos padrões são elevadas, diluições foram necessárias; as quais se efetuaram em MTBE do padrão combinado de AHA (200–2.000 µg.mL<sup>-1</sup>) (4-7787, TraceCERT®) com as seguintes concentrações: 200 µg.mL<sup>-1</sup> para ATCA e ADBA; 400 µg.mL<sup>-1</sup> para AMBA, ABCA e ABDCA; 600 µg.mL<sup>-1</sup> para AMCA e ADCA; 1.000 µg.mL<sup>-1</sup> para ADBCA; 2.000 µg.mL<sup>-1</sup> para ATBA, assim como do padrão interno 1,2,3-tricloropropano (1.000 µg.mL<sup>-1</sup>) (47669-U, TraceCERT®).

Em balões volumétricos alongados, adicionaram-se alíquotas de 50 mL de água isenta de compostos orgânicos voláteis em concentrações distintas, que variaram de 200 µg.L<sup>-1</sup> (correspondente às menores concentrações, ATCA e ADBA) a 2.000 µg.L<sup>-1</sup> (para a maior, ATBA). Posteriormente, realizaram-se

ensaios, que consistem na ELL e na derivatização das alíquotas, para identificação preliminar dos tempos de retenção livre de interferências dos compostos em relação ao volume da alíquota. Com base na análise das alíquotas no CG-EM, gerou-se o cromatograma modo *total ion current* (TIC, respostas correspondentes a todas substâncias eluídas), com as respostas da sensibilidade (intensidade) das nove espécies-alvo de AHA e do 1,2,3-tricloropropano, separadamente modo *selected ion recording* (SIR, construído com base no TIC, mas apenas usando fragmentos dos compostos de interesse). Para minimizar interferências nas respostas em algumas espécies observadas nessas primeiras corridas cromatográficas, também relatadas por Xie (2001), procedeu-se à destilação do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Assim, definiram-se seis (p = 6, para a curva de calibração) e oito (p = 8, linearidade) pontos em concentrações variadas para cada espécie de AHA em triplicata (n = 3), conforme Tabela 1.

Desse modo, para a extração em cada concentração e do branco (n = 10, sem adição de concentrações de AHA), as alíquotas foram transferidas para balões volumétricos alongados de 50 mL e imediatamente foi adicionado 500 µL do padrão interno 1,2,3-tricloropropano (por meio da diluição do padrão para 20 µg.mL<sup>-1</sup>). Em seguida, a amostra foi acidificada com 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destilado e acrescentou-se 2 g de CuSO<sub>4</sub>, 16 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 3,5 mL de MTBE (resfriado) para posterior agitação por 3 minutos para ser resfriado em geladeira (5 minutos, repouso para separar as fases). Esse procedimento ocasiona uma reação exotérmica, tornando o resfriamento muito importante para que não haja perdas dos compostos na amostra.

Para a etapa posterior, derivatização, transferiu-se 2 mL da fase orgânica para um frasco âmbar com tampa rosqueável, no qual foi adicionado 1 mL de solução ácida de metanol 10% (utilizando-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destilado). Após o fechamento, ele foi mantido sob aquecimento imerso em banho de água a 50°C por 2 h. Posteriormente, o frasco foi resfriado e adicionou-se 4 mL de solução saturada de NaHCO<sub>3</sub> em incrementos de 1 mL e depois agitado por 3 minutos, seguido pelo mesmo tempo de repouso em *freezer*. O extrato obtido foi transferido para um frasco *vial* de 2 mL e armazenado em *freezer* (validade analítica de 14 dias); volume de 3,5 µL foi injetado no CG-EM. Utilizaram-se as informações para o levantamento dos parâmetros para validar o método.

## Instrumentação e condições cromatográficas

Utilizou-se um sistema de CG-EM, o CLARUS 680 SQ 8PerkinElmer (USA), para as análises, empregando-se os padrões dos AHA para a detecção. As condições

**Tabela 1 -** Concentrações das espécies de ácidos haloacéticos usados para curva de calibração e linearidade.

	AMCA	AMBA	ADCA	ATCA	ABCA	ADBA	ABDCA	ADBCA	ATBA
Concentração AHA (curva de calibração - µg.L <sup>-1</sup> )	6	4	6	2	4	2	4	10	20
	12	8	12	4	8	6	12	30	40
	18	12	18	6	12	8	16	40	60
	24	16	24	8	16	15	20	50	80
	30	20	30	10	20	40	80	200	100
	45	30	45	15	30	60	120	300	600
Concentração AHA (linearidade - µg.L <sup>-1</sup> )	240	160	240	80	160	80	160	400	800
	300	200	300	100	200	100	200	500	1.000

AHA: ácidos haloacéticos; AMCA: ácido monocloraacético; AMBA: ácido monobromoacético; ADCA: ácido dicloroacético; ATCA: ácido tricloroacético; ABCA: ácido bromocloroacético; ADBA: ácido dibromoacético; ABDCA: ácido bromodichloroacético; ADBCA: ácido dibromocloroacético; ATBA: ácido tribromoacético.

Fonte: elaborado pelos autores.

otimizadas para o CG foram 3,5 µL de amostra injetada no modo *splitless* separados por coluna capilar ZEBRON ZB - 5MS (30 m *length* × 0,25 mm *diameter* × 0,25 µm *film*; Fase G27 — 5% *Polysilarylene* e 95% *Polydimethylsiloxane*). A temperatura do injetor foi de 280°C, o gás de arraste foi hélio, de grau de pureza 99,9995% e fluxo constante de 1,2 mL.min<sup>-1</sup>. O forno foi programado a 30°C por 8 minutos, com taxa de aquecimento de 2°C.min<sup>-1</sup> até 35°C, seguido de 5°C.min<sup>-1</sup> até 90°C, acompanhado de 20°C min<sup>-1</sup> até 200°C.

O EM foi usado no modo de impacto de elétrons (EI+). O tempo de corte do solvente de 2,7 minutos, a velocidade de aquisição de 0,5 s.scan<sup>-1</sup>, o intervalo de leitura m.z<sup>-1</sup> de 50 a 260 u.m.a e o modo de ionização por impacto eletrônico de 70 eV. A temperatura da linha de transferência foi de 280°C.

## Aplicação do método de detecção de ácidos haloacéticos na cloração de cianobactérias

### Manutenção e cultivo

Assim como as análises cromatográficas, o cultivo de cianobactérias foi realizado nos laboratórios da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), *campus* Mucuri, em Teófilo Otoni (MG). A cepa tóxica de *Cylindrospermopsis raciborskii* foi obtida no Laboratório de Ficologia (ICB-UFMG) e cultivada no meio concentrado ASM-1, conforme orientação de Jacinavicius *et al.* (2013), sob as seguintes condições: temperatura 23 ± 2°C, irradiância 40–50 µmol fótons m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> e fotoperíodo 14–10 h claro-escuro, conduzidas em Erlenmeyers replicados de 500 mL e 1 L.

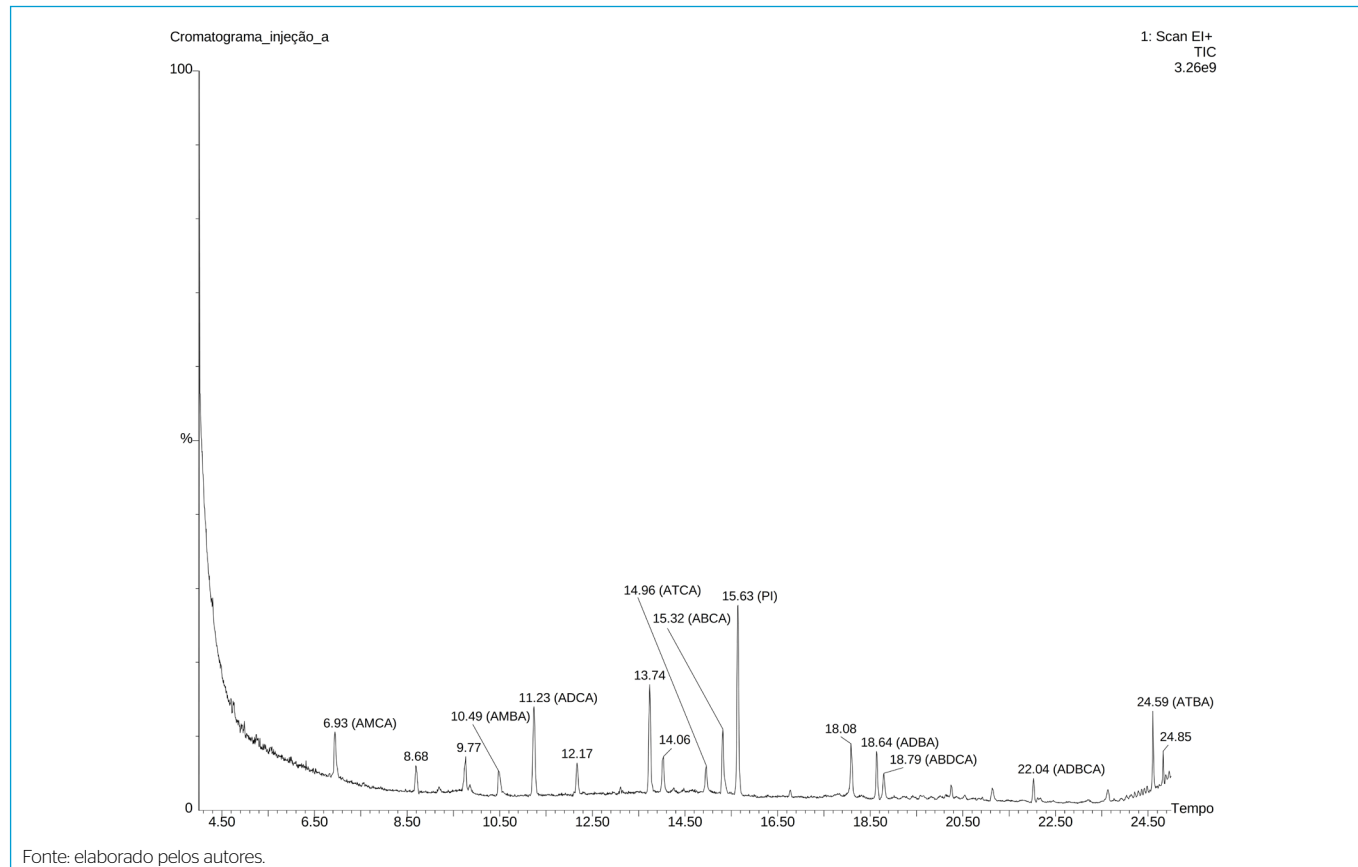
## Amostragem e extração nas amostras

A densidade de 1,0 × 10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>, obtida durante a fase exponencial de crescimento (período de 20–25 dias), foi utilizada para os ensaios por estar associada a eventos de floração (JACINAVICIUS *et al.*, 2013; FUNASA, 2015). O hipoclorito de cálcio foi escolhido como oxidante e utilizado nas doses de cloro de 2,5 e 5,0 mg.L<sup>-1</sup> para avaliar os efeitos na formação de AHA. As condições de formação foram pH 6,5 (no qual comumente predomina a coagulação na maioria das ETA brasileiras), temperatura 30°C (recorrente na Região Nordeste do Brasil onde há eventos de floração) e tempo de contato de 30 minutos (formação de AHA nos primeiros minutos da cloração). As alíquotas em triplicata foram submetidas ao procedimento de extração descrito anteriormente para detecção dos AHA, após validação e preparação da curva de calibração.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Parâmetros de validação analítica

Conforme mencionado anteriormente, podem ocorrer reações químicas com impurezas na etapa de extração e derivatização por metilação ácida. Como proposta de evitá-las, procedeu-se com o processo de destilação do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para o aumento de sua pureza durante o processo de validação. Inicialmente, realizaram-se seis extrações para obter os parâmetros iniciais da rampa da corrida cromatográfica do método, tomando por referência valores monitorados por Xie (2001), para identificar a presença dos AHA. Após a identificação



**Figura 1** - Cromatograma modo TIC da otimização da rampa dos AHA, inclusive o padrão interno 1,2,3-tricloropropano, obtido por injeção pela extração de um padrão na concentração 80-800 µg.L<sup>-1</sup>.

das massas ( $m.z^{-1}$ ), procedeu-se com a otimização da rampa (modo TIC e SIR) para a separação de AMCA, ADCA, ATCA, AMBA, ADBA, ATBA, ADCA, ADBCA, ABDCA e ADBCA, além do padrão interno 1,2,3-tricloropropano. A Figura 1 apresenta o cromatograma no modo TIC e a Figura 2 no modo SIR, inclusive do 1,2,3-tricloropropano, obtida por injeção com base em uma extração na concentração variada de AHA (80–800  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).

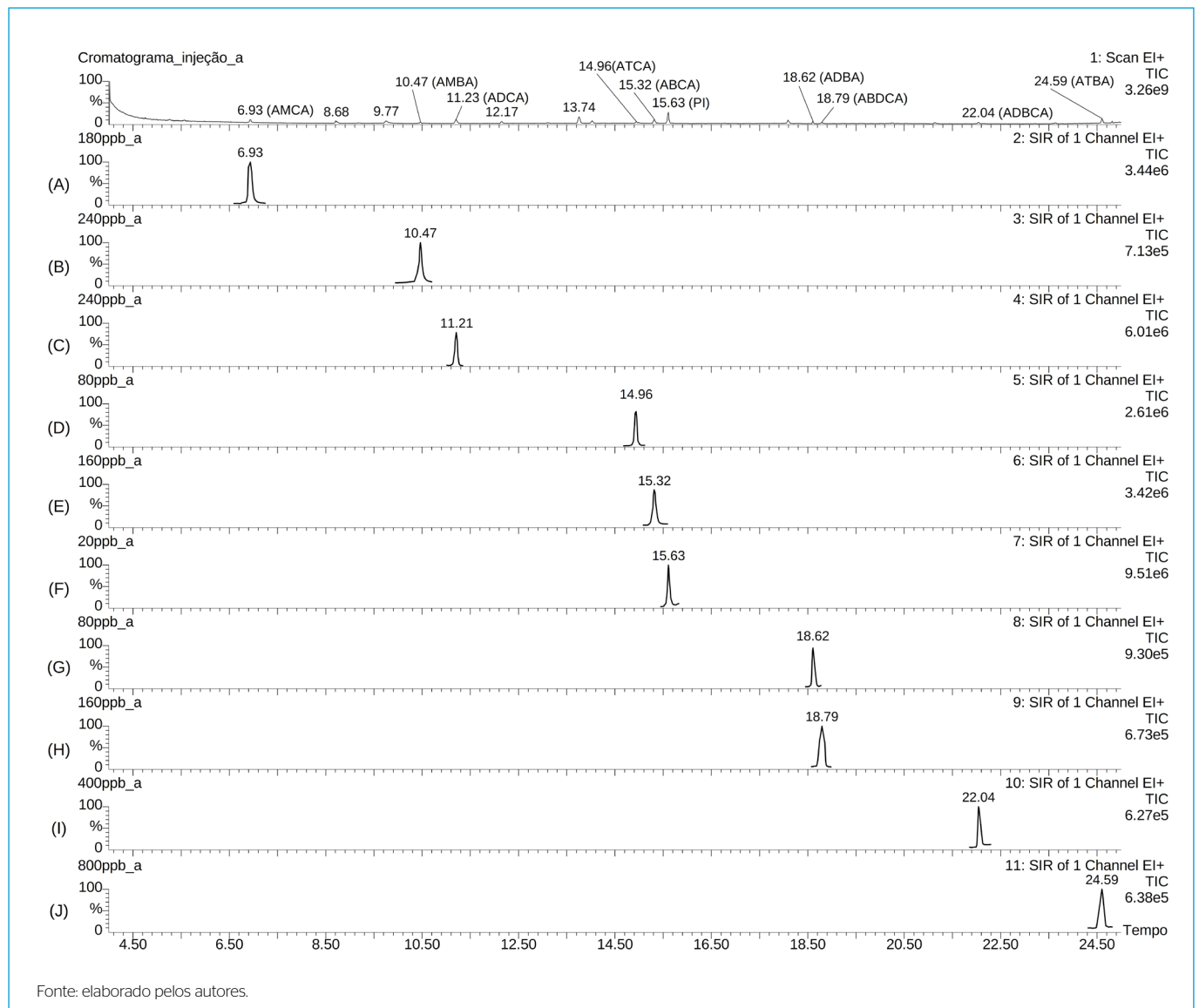
A sequência com que as espécies de AHA são exibidas nas Figuras 1 e 2 se deve às características químicas de cada composto. O AMCA foi detectado primeiro pois tem menor massa molar, enquanto o ATBA foi o último a ser detectado por apresentar maior massa molar que os demais compostos. As demais respostas demonstradas na Figura 1 ocorreram pelas interações físicas da amostra com a composição da coluna, contudo tais interações não influenciam a sensibilidade do método.

As Tabelas 2, 3, 4 e 5 apresentam os valores obtidos dos parâmetros de validação (linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão) para a curva analítica.

### Curva analítica e linearidade

Após a definição da otimização da rampa (TIC e SIR), procedeu-se com a construção da curva de calibração analítica, utilizando concentrações conforme Tabela 1 ( $p = 6$  e  $n = 3$ ), para as espécies de AHA. Por meio dos resultados, obtiveram-se as regressões lineares ( $Y = aX \pm b$ ), na qual  $Y$  é a área do pico obtida (descrito como sensibilidade ou intensidade) e  $X$  é a concentração de cada AHA no CG-EM.

Observou-se a similaridade dos resultados para as faixas de concentrações determinadas, com respostas lineares e correlações superiores (Tabelas 2 a 4) preconizadas por Ribani *et al.* (2004), INMETRO (2016), Brasil (2017b) e



**Figura 2** – Cromatogramas modo TIC e SIR da otimização da rampa dos AHA, inclusive o padrão interno 1,2,3-tricloropropano, obtido por injeção pela extração na concentração 80–800  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (A - SIR 2, AMCA; B - SIR 3, AMBA; C - SIR 4, ADCA; D - SIR 5, ATCA; E - SIR 6, ABCA; F - SIR 7, 1,2,3-tricloropropano; G - SIR 8, ADBA; H - SIR 9, ABDCA; I - SIR 10, ADBCA; J - SIR 11, ATBA).

**Tabela 2** – Coeficientes de correlação obtidos para as curvas de calibração em diferentes faixas de concentração de ácidos haloacéticos.

Espécie de AHA	Concentração AHA ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	R	Concentração AHA ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) (linearidade)	R
AMCA	6-45	0,9960	6-300	0,9986
AMBA	4-30	0,9904	4-200	0,9947
ADCA	6-45	0,9947	6-300	0,9997
ATCA	2-15	0,9944	2-100	0,9994
ABCA	4-30	0,9976	4-200	0,9998
ADBA	2-60	0,9944	2-100	0,9923
ABDCA	12-120	0,9942	12-200	0,9928
ADBCA	10-300	0,9901	10-500	0,9946
ATBA	20-600	0,9908	20-1000	0,9908

AHA: ácidos haloacéticos; R: coeficientes de correlação; AMCA: ácido monocloraacético; AMBA: ácido monobromoacético; ADCA: ácido dicloroacético; ATCA: ácido tricloroacético; ABCA: ácido bromocloroacético; ADBA: ácido dibromoacético; ABDCA: ácido bromodichloroacético; ADBCA: ácido dibromocloroacético; ATBA: ácido tribromoacético.

**Tabela 3** – Limite de detecção e limite de quantificação para a determinação de ácidos haloacéticos em água.

Espécie de AHA	LD ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )
AMCA	0,52	1,58
AMBA	0,08	0,24
ADCA	0,02	0,06
ATCA	0,04	0,14
ABCA	0,01	0,01
ADBA	0,13	0,43
ABDCA	0,11	0,32
ADBCA	0,57	1,93
ATBA	2,36	2,94

AHA: ácidos haloacéticos; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; AMCA: ácido monocloraacético; AMBA: ácido monobromoacético; ADCA: ácido dicloroacético; ATCA: ácido tricloroacético; ABCA: ácido bromocloroacético; ADBA: ácido dibromoacético; ABDCA: ácido bromodichloroacético; ADBCA: ácido dibromocloroacético; ATBA: ácido tribromoacético.

Franco *et al.* (2019a). Houve excelente linearidade em todas as espécies ( $p = 8$  e  $n = 3$ ), com correlações superiores às sugeridas pelas agências e por Xie (2001). O método forneceu resultados diretamente proporcionais à concentração dos AHA, dentro da faixa de aplicação (Tabela 5).

### Precisão

A precisão foi obtida pela estimativa do DPR em níveis como repetitividade e intermediária, em pontos referentes à baixa, à média e à alta concentrações, respectivamente ( $p = 3$ ) (12, 18, 24  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o AMCA; 8, 12, 16  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o AMBA; 12, 18, 24  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o ADCA; 4, 6, 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o ATCA; 8, 12, 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o ABCA; 6, 8, 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o ADBA; 12, 16, 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o ABDCA; 30, 50, 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o ADBCA; 60, 80, 600  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o ATBA). A repetitividade foi avaliada por injeções em um mesmo dia ( $n = 3$ ) e, para a precisão intermediária, por injeções em dias distintos ( $n = 5$ ). Conforme constatado nas Tabelas 4 e 5, por meio

**Tabela 4** – Precisões intermediária e repetitiva em baixa, média e alta concentração de ácidos haloacéticos e respectivos desvios padrão relativos.

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

AHA: ácidos haloacéticos; DPR: desvio padrão relativo; AMCA: ácido monocloraacético; AMBA: ácido monobromoacético; ADCA: ácido dicloroacético; ATCA: ácido tricloroacético; ABCA: ácido bromocloroacético; ADBA: ácido dibromoacético; ABDCA: ácido bromodichloroacético; ADBCA: ácido dibromocloroacético; ATBA: ácido tribromoacético.

da curva de calibração ( $p = 6$  e  $n = 3$ ) de cada espécie de AHA, observou-se que todos os desvios foram inferiores a 20%, também no limite aceitável (20%) (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2016; BRASIL, 2017b; FRANCO *et al.*, 2019a).

### Limite de detecção e limite de quantificação

Os LD e LQ foram obtidos pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2016; BRASIL, 2017b; FRANCO *et al.*, 2019a). O LD ( $n = 10$ ) foi calculado com base na relação de 3,3 vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da curva analítica. O LD ( $n = 10$ ) foi a relação de 10,0 vezes também o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular da curva analítica de calibração, para cada espécie de AHA. Conforme observado na Tabela 3, o método é capaz de detectar e quantificar baixas concentrações em todas as espécies. Ribani *et al.* (2004) e recomendam por ser estatisticamente mais confiável.



**Tabela 5** - Exatidão e recuperação em baixa, média e alta concentração de ácidos haloacéticos para sua determinação em água.

Espécie de AHA	Concentração ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Média aferida ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	DPR (%)	Recuperação (%)
AMCA	12	11,34	0,83	94,47
	18	16,82	3,00	90,57
	24	24,34	1,02	101,40
AMBA	8	7,31	7,07	91,37
	12	11,11	1,34	92,56
	16	14,36	1,84	88,85
ADCA	12	12,11	1,49	100,93
	18	18,20	0,10	101,12
	24	22,46	1,07	93,60
ATCA	2	1,67	0,96	83,70
	8	6,27	0,87	104,55
	15	14,69	0,12	97,92
ABCA	4	4,16	3,69	103,99
	12	12,13	0,70	101,06
	20	20,83	1,81	104,14
ADBA	6	6,79	3,05	113,22
	8	7,39	2,34	92,33
	40	39,22	2,68	98,05
ABDCA	12	12,40	1,73	103,30
	16	13,76	2,92	86,00
	20	16,28	2,93	81,39
ADBCA	30	29,57	1,81	99,48
	50	40,51	3,19	81,02
	200	181,33	7,31	90,67
ATBA	60	58,24	1,85	97,06
	80	63,77	3,80	79,71
	600	574,62	5,24	95,77

AHA: ácidos haloacéticos; DPR: desvio padrão relativo; AMCA: ácido monocloraacético; AMBA: ácido monobromoaacético; ADCA: ácido dicloroaacético; ATCA: ácido tricloroaacético; ABCA: ácido bromocloroaacético; ADDBA: ácido dibromoaacético; ABDCA: ácido bromodichloroaacético; ADBCA: ácido dibromocloroaacético; ATBA: ácido tribromoaacético.

## Seletividade

Avaliou-se a possível interferência nos tempos de retenção comparando a matriz da substância (padrão) com a adição do composto 17 $\beta$ -Estradiol-D5. Não se observaram interferências no tempo de retenção dos AHA, mantendo também a característica de estar bem separada durante o cromatograma (RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2016; BRASIL, 2017b; FRANCO *et al.*, 2019a).

## Comparação dos resultados analíticos

A ELL, a derivatização por metilação ácida e a análise por CG-DCE para os nove AHA foram publicadas no método USEPA 552.2 (USEPA, 1995) e, desde então, foram amplamente adotadas por muitos laboratórios. Xie, Reckhow e Springborg (1998), utilizando-se de adaptações da USEPA 552.2

(USEPA, 1995), desenvolveram métodos analíticos para AHA para água potável empregando a ELL e a derivatização por metilação ácida, seguidas de detecção por CG-DCE. Incluíram-se no método apenas AMCA, AMBA, ADCA, ADDBA e ATCA. Obteve-se LD entre 0,07–0,40  $\mu\text{g.L}^{-1}$  para os compostos, exceto para AMCA, pela ausência de um pico atribuível.

Por meio de análises de amostras nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{g.L}^{-1}$  das espécies, as recuperações médias foram entre 109–118%. Comparando-se o LD e as recuperações com aqueles relatados no método 6251B (APHA; AWWA; WEF, 2012), os autores mostraram que ambos os métodos eram comparáveis, exceto para AMCA.

Em comparação com o uso do diazometano, outra opção para derivatização, a metilação ácida fornece melhor eficiência de metilação para os ácidos mono-haloacéticos e di-haloacéticos, mas fraca para os ácidos tri-haloacéticos. A metilação incompleta de algumas espécies com metanol ácido também foi relatada em estudo realizado por Xie (2001), no qual se associam as baixas respostas obtidas do ATBA à sua parcial descarboxilação. Segundo o autor, os cromatogramas obtidos por CG-DCE fornecem baixas respostas ao AMCA dado o seu menor teor de halogênio e a menor sensibilidade do detector para a espécie, além de ser suscetível à interferência cromatográfica durante a metilação ácida. O comportamento similar para as espécies tri-haloacéticos bromados (ADBCA, ABDCA e ATBA) são justificadas por sua fraca eficiência e instabilidade durante o processo de derivatização por metilação ácida.

Xie (2001), utilizando a configuração CG-EM e as adequações da USEPA 552.2 (USEPA, 1995), também menciona a metilação ácida como um passo crítico para detectar AHA. O autor detectou a baixa eficiência para ácidos tri-haloacéticos bromados assim como no detector DCE, e, em contrapartida, não foram observadas interferências na resposta do AMCA. Xie *et al.* (2002) realizaram uma série de modificações no método USEPA 552.2 (USEPA, 1995), como variação do tempo e temperatura de metilação, volume e fórmula do metanol ácido, e a instabilidade do ATBA pode ser atribuível à formação de peróxidos em MTBE envelhecido.

Em comparação ao presente estudo, não se observou interferência na resposta do AMCA nem baixa eficiência nos ácidos tri-haloacéticos bromados durante a metilação ácida. Os resultados podem ser atribuídos ao uso de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  destilado, que provavelmente aumentou a eficiência de metilação e/ou a redução da descarboxilação, minimizando a interferência na matriz. Nos cromatogramas obtidos utilizando o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  não destilado e com base em informações levantadas neste estudo, verificaram-se menores interferências de outros íons ( $\text{m.z}^{-1}$ ) nos espectros em AMCA e tri-haloacéticos bromados.

Destaca-se a importância do método desenvolvido nesta pesquisa nos diversos parâmetros abordados quando comparado com trabalhos na literatura nacional. Esta também aborda a mensuração de AHA em ambos detectores (DCE e EM), de modo que foi validado um método para as nove espécies mais recorrentes durante a cloração de águas para abastecimento com o tempo de corrida cromatográfica (25,5 minutos) similar aos detectores DCE. Entre os estudos internacionais relacionados à EM, verificaram-se menores tempos referentes à corrida cromatográfica, se comparados ao estudo de Xie (2001), aproximadamente 50 minutos, além da significativa melhora na sensibilidade do mono-halogenado AMCA e das espécies tri-haloacéticas bromado-cloradas, independentemente do detector utilizado.

**Tabela 6** - Formação de ácidos haloacéticos após cloração de água contendo *Cylindrospermopsis raciborskii* ( $1,0 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>; hipoclorito de cálcio).

Dose de hipoclorito de cálcio (mg L <sup>-1</sup> )	Temperatura	pH	Tempo de contato	ADCA (µg L <sup>-1</sup> )	ATCA (µg L <sup>-1</sup> )	AHA <sub>9</sub> * (µg L <sup>-1</sup> )
2,5	30°C	6,5	30 min	2,58	1,48	4,06
5,0				2,55	1,61	4,16

AHA: ácidos haloacéticos; ADCA: ácido dicloroacético; ATCA: ácido tricloroacético. \*Ácido monocloraacético, ácido monobromoacético, ácido bromocloroacético, ácido dibromoacético, ácido bromodichloroacético, ácido dibromocloroacético e ácido tribromoacético não foram formados durante os ensaios de cloração.

## Análise de formação de ácidos haloacéticos após cloração de águas com *C. raciborskii*

Os resultados de formação de AHA nas águas de estudo estão expostos na Tabela 6.

Com o hipoclorito de cálcio, obteve-se 4,16 µg.L<sup>-1</sup> como a maior concentração, novamente sem tendência definida nos diversos parâmetros estudados. Autores como Lee *et al.* (2010) afirmaram, após pesquisas sobre formação de subprodutos em águas de piscinas, que a formação de AHA foi maior, precedido de TAM e dos demais subprodutos. Comportamento também observado por Hang *et al.* (2016), em concentrações de diferentes tipos de SOH em amostras de piscinas e para as condições de cloração com cianobactéria *Microcystis aeruginosa*. Contudo, ressalta-se a significativa diferença em relação à matéria orgânica natural desses estudos com as que foram apresentadas.

Não se observaram espécies bromadas de AHA. Ates, Yetis e Kitis (2007) verificaram o impacto da combinação de brometo e da MON em água clorada e concluíram que a adição de brometo influencia positivamente a concentração de AHA, sendo o ADCA o principal composto formado no estudo. Os valores obtidos estão associados exclusivamente à cloração de águas contendo cianobactérias e seus metabólitos, já que foram cultivadas em água ultrapura, apenas com o meio ASM-1, justificando a não formação das espécies bromadas.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais, é possível concluir que:

- A validação dos AHA por ELL-CG-EM mostrou-se satisfatória com menor interferência de outras respostas no AMCA e nas espécies bromadas ABDCA, ADBCA e ATBA, dado o uso do H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> destilado, que influenciou positivamente a etapa de metilação ácida;
- Ótimas respostas nos principais parâmetros de validação analítica (curva de calibração, precisão, exatidão e seletividade) viabilizaram a quantificação de AHA pela instrumentação apresentada neste trabalho;

- O método apresentou eficiência quando aplicado para identificar e quantificar espécies de AHA em amostras cloradas contendo a espécie *Cylindrospermopsis raciborskii*, que é recorrente em reservatórios, principalmente nas estações de tratamento de água.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), as bolsas de iniciação científica vinculadas à pesquisa; e à Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), o apoio financeiro.

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Franco, E. S.: Conceituação, Curadoria de Dados, Análise Formal, Investigação, Metodologia, Administração do Projeto, Validação, Visualização, Escrita – Primeira Redação, Escrita – Revisão e Edição. Camargo, J. A.: Conceituação, Curadoria de Dados, Análise Formal, Investigação, Metodologia, Administração do Projeto, Validação, Visualização, Escrita – Primeira Redação, Escrita – Revisão e Edição. Aguilar, N. A.: Conceituação, Curadoria de Dados, Análise Formal, Investigação, Metodologia, Administração do Projeto, Validação, Visualização, Escrita – Primeira Redação. Silva, D. F.: Metodologia, Investigação, Metodologia, Administração do Projeto, Validação, Visualização. Rodrigues, J. L.: Metodologia, Recursos, Investigação, Metodologia, Administração do Projeto, Validação, Visualização, Escrita – Primeira Redação. Pádua, V. L.: Conceituação, Curadoria de Dados, Metodologia, Recursos, Investigação, Metodologia, Administração do Projeto, Validação, Visualização. Libânio, M.: Conceituação, Curadoria de Dados, Análise Formal, Investigação, Metodologia, Administração do Projeto, Validação, Visualização, Escrita – Primeira Redação. Giani, G.: Conceituação, Curadoria de Dados, Análise Formal, Investigação, Metodologia. Sierau, L. D.: Conceituação, Curadoria de Dados, Análise Formal, Investigação, Metodologia.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA); WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (WEF). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22. ed. Washington, D.C.: APHA; AWWA; WEF, 2012. 1496 p.

ARAGÃO, N.K.C.V. *Taxonomia, distribuição e quantificação de populações de cianobactérias em reservatórios do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil)*. 159f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

ATES, N.; YETIS, U.; KITIS, M. Effects of Bromide Ion and Natural Organic Matter Fractions on the Formation and Speciation of Chlorination By-Products. *Journal of Environmental Engineering*, Turquia, v. 133, n. 10, p. 947-954, 2007. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(2007\)133:10\(947\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(2007)133:10(947))

BRASIL. *Portaria GM/MS nº 888, de 4 de maio de 2021*. Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Ministério da Saúde, 2021.



- BRASIL. *Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017*. Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2017a.
- BRASIL. *Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011*. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde, 2017b.
- BUTIÃO, D.F. *Formação de subprodutos orgânicos halogenados da desinfecção em águas de piscinas*. 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas. Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2011.
- CARDADOR, M.J.; SALGUERO, J.F.; GALLEGO, M. Simultaneous quantification of trihalomethanes and haloacetic acids in cheese by on-line static headspace gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1408, p. 22-29, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.007>
- CARERI, M.; MANGIA, A. Trends in analytical atomic and molecular mass spectrometry in biology and the life sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 399, n. 8, p. 2585-2595, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4585-8>
- CORAL, L.A.; ZAMYADI, A.; BARBEAU, B.; BASSETI, F.J.; LAPOLLI, F.R.; PREVÓST, M. Oxidation of *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae* by ozone: Impacts on cell integrity and chlorination by-product formation. *Water Research*, v. 47, n. 9, p. 2983-2994, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.03.012>
- CULEA, M.; COZAR, O.; RISTOIU, D. Methods validation for the determination of trihalomethanes in drinking water. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 41, n. 12, p. 1594-1597, 2006. <https://doi.org/10.1002/jms.1149>
- FRANCO, E.S.; FERREIRA, A.F. A.; SILVA, D.F.; CAMARGO, J.A.; PÁDUA, V.L.; RODRIGUES, J.L.; RODRÍGUEZ, M.D.V.; GIANI, A. Validação de método analítico por ELL-CG-EM para detecção de trihalometanos decorrentes da cloração de águas contendo *Microcystis*. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 24, n. 5, p. 1003-1012, 2019a. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522019175794>
- FRANCO, E.S.; PÁDUA, V.L.; GIANI, A.; RODRÍGUEZ, M.; SILVA, D.F.; FERREIRA, A.F.A.; SANTANA JÚNIOR, I.C.; PEREIRA, M.C.; RODRIGUES, J.L. Validation of a robust LLE-GC-MS method for determination of trihalomethanes in environmental samples. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 190, n. 8, p. 473, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6835-8>
- FRANCO, E.S.; PÁDUA, V.L.; RODRIGUEZ, M.D.V.R.; SILVA, D.F.; LIBÂNIO, M.; PEREIRA, M.C.; SILVA, P.H.G.; SANTANA JÚNIOR, I.C.; ROCHA, B.A.; CAMARGO, J.A.; MOURÃO, A.O.; RODRIGUES, J.L. A simple liquid-liquid extraction-gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of haloacetic acids in environmental samples: Application in water with *Microcystis aeruginosa* cells. *Microchemical Journal*, v. 150, 104088, 2019b. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104088>
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (FUNASA). *Cianobactérias/cianotoxinas*: procedimentos de coleta, preservação e análise. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 106p.
- GAN, W.; GUO, W.; MO, J.; HE, Y.; LIU, Y.; LIU, W.; LIANG, Y.; YANG, X. 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.091>
- HANG, C.; ZHANG, B.; GONG, T.; XIAN, Q. Occurrence and health risk assessment of halogenated disinfection byproducts in indoor swimming pool water. *Science of the Total Environment*, v. 543, parte A, p. 425-431, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.055>
- HEALTH CANADA. *Guidelines for Canadian drinking water quality: Summary table*. Water and Air Quality Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada. Ottawa: Health Canada, 2019. 26 p.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). Coordenação Geral de Acreditação. Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Sismet). *Revisão nº 5, de agosto de 2016*. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos: Documento de caráter orientativo. (DOQ-CGCRE-008). Distrito Federal: INMETRO, 2016.
- JACINAVICIUS, F.R.; JÚNIOR, W.A.G.; AZEVEDO, M.T.P.; SANT'ANNA, C.L. *Manual para Cultivo de Cianobactérias*. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Instituto de Botânica – Núcleo de pesquisa em Ficologia, 2013.
- LEE, J.; JUN, M.J.; LEE, M.H.; LEE, M.H.; EOM, S.W.; ZOH, K.D. Production of various disinfection byproducts in indoor swimming pool water treated with different disinfection methods. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 213, n. 6, p. 465-474, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.09.005>
- LEGAY, C.; RODRIGUEZ, M.J.; SÉRODES, J.B.; LEVALLOIS, P. Estimation of chlorination by-products presence in drinking water in epidemiological studies on adverse reproductive outcomes: A review. *Science of the Total Environment*, v. 408, n. 3, p. 456-472, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.047>
- NIKOLAOU, A.D.; LEKKAS, T.D.; GOLFINOPOULOS, S.K.; KOSTOPOULOU, M.N. Application of different analytical methods for determination of volatile chlorination by-products in drinking water. *Talanta*, v. 56, n. 4, p. 717-726, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00613-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00613-0)
- PAVÓN, J.L.P.; MARTIN, S.H.; PINTO, C.G.; CORDERO, B.M. Determination of trihalomethanes in water samples: a review. *Analytical Chemistry Acta*, v. 629, n. 1-2, p. 6-23, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.09.042>
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIN, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- SANT'ANNA, C.L.A.; WERNER, V.R.T.P.; DOGO, C.R.; RIOS, F.R.C. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algological Studies*, v. 126, p. 251-265, 2008. <https://doi.org/10.1127/1864-1318/2008/0126-0251>
- SILVA, C.P. *Determinação de ácidos haloacéticos em Água utilizando técnicas cromatográficas*. 78f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Drinking Water Regulations and Health Advisories*. Washington, DC.: U.S. Environmental Protection Agency, 1996. 30 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories*. Washington, DC.: U.S. Environmental Protection Agency, 2012. 20 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Method 552.2: Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid extraction, derivatization and gas chromatography with electron capturedetection*. Washington, DC.: U.S. Environmental Protection Agency, 1995. 32 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Method 552.3: Determination of haloacetic acids and dalapon in drinking water by liquid-liquid microextraction, derivatization, and gas chromatography with electron capture detection*. Washington, DC.: U.S. Environmental Protection Agency, 2003. 55 p.

XIE, Y. Analyzing Haloacetic Acids Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Water Research*, v. 35, n. 6, p. 1599-1602, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00397-3](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00397-3)

XIE, Y.; RASHID, I.; ZHOU, H.J.; GAMMIE, L. Acidic methanol methylation for HAA analysis: Limitations and possible solutions. *Journal American Water Works Association*, v. 94, n. 11, p. 115-122, 2002. <https://doi.org/10.1002/j1551-8833.2002.tb10235.x>

XIE, Y.; RECKHOW, D.A.; SPRINGBORG, DC. Analyzing HAAs and ketoacids without diazomethane. *Journal American Water Works Association*, v. 90, n. 4, p. 131-138, 1998. <https://doi.org/10.1002/j1551-8833.1998.tb08416.x>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Guidelines for drinking-water quality*. 4. ed. Geneva: WHO, 2011. 564 p.

ZAMYADI, A.; CORAL, L.A.; BARBEAU, B.; DORNER, S.; LAPOLLI, F.R.; PRÉVOST, M. Fate of toxic cyanobacterial genera from natural bloom events during ozonation. *Water Research*, v. 73, p. 204-215, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.029>

ZANCHETTA, PG.; PENA, A.; GONÇALVES, R.F. Desenvolvimento e validação de método para quantificação simultânea de ofloxacina, norfloxacina e ciprofloxacina em urina humana. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 20, n. 2, p. 307-314, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1413-41522015020000114433>

