

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (ELL-PBT) PARA PIRETRÓIDES EM ÁGUA E ANÁLISE POR CG

Heulla Pereira Vieira, Antônio Augusto Neves\* e Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz

Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa – MG, Brasil

Recebido em 20/1/06; aceito em 2/8/06; publicado na web em 19/1/07

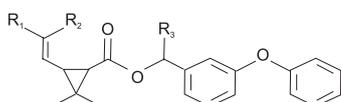
OPTIMIZATION AND VALIDATION OF LIQUID-LIQUID EXTRACTION WITH THE LOW TEMPERATURE PARTITION TECHNIQUE (LLE-LTP) FOR PYRETHROIDS IN WATER AND GC ANALYSIS. The liquid-liquid extraction with the low temperature partition technique was developed for the analysis of four pyrethroids in water by CG. Using a factorial design the extraction technique was optimised evaluating the effect of the variables ionic strength, contact time and proportion between sample and solvent volumes. The validation parameters sensitivity, precision, accuracy and detection and quantification limits were evaluated. The LOD and LOQ of the method varied from 1.1 to 3.2  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 2.7 to 9.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively.

Keywords: pyrethroid; validation; gas chromatography.

INTRODUÇÃO

Piretróides são inseticidas sintéticos, que apresentam estruturas semelhantes à piretrina. A piretrina, componente ativo extraído das flores do *Chrysanthemum cinerariaefolium*, tem sido utilizada há mais de dois séculos no controle de inúmeras espécies de insetos. Economicamente, as piretrinas constituíram-se no inseticida ideal em função de ser praticamente não tóxico para mamíferos, ter amplo espectro de atividade, apresentar baixo poder residual e alta eficiência em doses baixas<sup>1</sup>. Em razão disso, é relativamente grande o uso de piretróides no controle de pestes em ambientes domésticos com possíveis riscos de contaminação do homem<sup>2</sup>.

De acordo com o “International Programme on Chemical Safety” (IPCS)<sup>3</sup>, os piretróides cipermetrina, deltametrina,  $\lambda$ -cialotrina e permetrina são classificados como moderadamente tóxicos. Apesar da baixa toxicidade verificada para mamíferos, estudos toxicológicos recentes mostraram que os piretróides estão entre os pesticidas mais tóxicos para organismos aquáticos, como peixes e crustáceos, sendo ainda, altamente tóxicos para abelhas<sup>4</sup>. A fórmula dos piretróides é mostrada na Figura 1, juntamente com os radicais de cada um dos quatro piretróides que foram estudados.



Piretróides	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
$\lambda$ -cialotrina	Cl	CF <sub>3</sub>	CN
cipermetrina	Cl	Cl	CN
deltametrina	Br	Br	CN
permetrina	Cl	Cl	H

Figura 1. Estrutura química de piretróides sintéticos

Várias técnicas têm sido usadas para determinação e quantificação dos resíduos de piretróides em amostras ambientais. Dentre elas destacam-se a cromatografia gasosa (CG) acoplada a detector seletivo de captura de elétrons (DCE)<sup>1,5,6</sup> ou acoplada ao detector de massas no modo de seleção de íons<sup>7-9</sup> e a cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada a detector ultravioleta (UV)<sup>10</sup>. Atualmente são encontrados inúmeros trabalhos de monitoramento de resíduos de piretróides em águas<sup>4,11,12</sup>, solos<sup>13-15</sup> e alimentos<sup>10,16,17</sup> utilizando as mais diversas técnicas de extração e análise.

Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas de extração e purificação de resíduos de piretróides, com uma demanda menor de solventes, como a extração em fase sólida<sup>11-13</sup> e a microextração em fase sólida<sup>4,18</sup>. Apesar do desenvolvimento das técnicas de extração e microextração em fase sólida, a extração líquido-líquido continua sendo a mais empregada por ser uma técnica simples, que não exige instrumentação sofisticada, e de fácil execução. Assim, vários trabalhos foram realizados com o objetivo de otimizar e minimizar o consumo de solventes utilizados nesta técnica.

A extração líquido-líquido de analitos lipofílicos em amostras gordurosas tem o inconveniente da necessidade de purificação dos extratos. Mesmo assim, uma boa quantidade do material gorduroso é encontrada nos extratos<sup>19</sup>.

Uma variação da técnica de extração líquido-líquido foi, no passado, desenvolvida para extração de pesticidas em plantas e matrizes animais, em que os materiais gordurosos eram separados por precipitação em baixa temperatura. O abaixamento da temperatura a valores tão baixos como o recomendado (-70 °C) impedia o uso intensivo da técnica<sup>20</sup>. Recentemente, Goulart<sup>16</sup> descreveu o emprego da técnica de extração em baixa temperatura para piretróides em leite. A técnica aplicada em amostras de leite consistiu na adição de acetonitrila à amostra em uma proporção de 2:1 (v/v). Com a adição da acetonitrila é formada uma fase única líquida contendo água e solvente. A mistura formada pela fase líquida e o material sólido do leite é resfriada a -20 °C. Com o abaixamento da temperatura, o material sólido é precipitado e aprisionado na fase aquosa congelada. A acetonitrila, de temperatura de congelamento igual a -46 °C, fica líquida e é retirada facilmente. As taxas de recuperação dos piretróides ficaram próximas de 90%, não sendo necessários outros processos de purificação.

Neste trabalho procurou-se adaptar, otimizar e validar a técnica de extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura (ELL-PBT) de quatro piretróides em amostras de água. As melhores condições de extração e análise simultânea dos quatro piretróides foram otimizadas e posteriormente validadas com relação às prin-

\*e-mail: aneves@ufv.br

cipais figuras de mérito: exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação, linearidade, sensibilidade e seletividade. A técnica otimizada e validada foi utilizada para avaliar a persistência desses piretróides em águas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes e soluções

As soluções empregadas foram preparadas a partir de padrões de  $\lambda$ -cicalotrina (86,5% m/m – Syngenta), permetrina (92,2% m/m – Syngenta), cipermetrina (92,4% m/m – Chem Service), deltametrina (99,0% m/m – Chem Service) utilizando como solvente acetonitrila (Mallinckrodt/ HPLC). Uma solução de bifentrina (92,2% m/m – FMC do Brasil), também em acetonitrila, foi preparada com a finalidade de ser usada como padrão interno nas análises cromatográficas dos piretróides.

### Amostras de água

Na otimização e validação do método de extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura (ELL-PBT) foi utilizada água destilada e deionizada.

Do Ribeirão São Bartolomeu, corpo d'água que corta a cidade de Viçosa, MG, foram coletadas 3 amostras. A primeira amostra a montante da cidade, a segunda no centro da cidade e a terceira a jusante da cidade. As amostras foram coletadas, em triplicata, às margens do Ribeirão, em frascos de vidro com capacidade de 100 mL e levadas ao laboratório para análise, em caixa térmica. No laboratório as amostras foram guardadas em geladeira e não receberam nenhum tratamento antes de serem submetidas ao processo de extração e análise cromatográfica.

### Planejamento fatorial

A técnica de ELL-PBT foi otimizada para a extração simultânea de quatro piretróides:  $\lambda$ -cicalotrina, permetrina, deltametrina e cipermetrina, em amostra de água previamente contaminada com padrões dos piretróides. Na otimização foi empregado um planejamento fatorial completo,  $2^3$ , para avaliação do comportamento simultâneo de três fatores: proporção entre o volume de água e acetonitrila, adição de sal e tempo de extração. Os três fatores foram estudados em dois níveis (Tabela 1) e as análises foram realizadas em duplicata. Os níveis dos três fatores utilizados no planejamento fatorial foram estabelecidos em experimentos prévios. Verificou-se que a proporção entre os volumes de água e acetonitrila

**Tabela 1.** Planejamento fatorial  $2^3$  para amostras de água fortificadas (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ )

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais		
	F(1)	F(2)	F(3)	(1) Proporção $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN}$ (v:v)	(2) Adição de NaCl (mol $\text{L}^{-1}$ )	(3) Tempo (min)
1 e 2	-	-	-	1:1	0,020	15
3 e 4	+	-	-	1:2	0,020	15
5 e 6	-	+	-	1:1	0,100	15
7 e 8	+	+	-	1:2	0,100	15
9 e 10	-	-	+	1:1	0,020	30
11 e 12	+	-	+	1:2	0,020	30
13 e 14	-	+	+	1:1	0,100	30
15 e 16	+	+	+	1:2	0,100	30

afetava a eficiência da extração e que existia uma tendência de melhora nos rendimentos quando a proporção era aumentada. A adição de sal foi utilizada no nível máximo que permitia ainda a existência de uma fase única entre os solventes, água e acetonitrila, e que não afetasse severamente o congelamento da fase aquosa quando a mistura era resfriada.

Em frasco de vidro transparente com tampa e septo de Teflon®, de 22 mL de capacidade, foram adicionados 4,00 mL de água fortificada com padrões dos quatro piretróides em concentração de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A força iônica das amostras foi mantida em níveis iguais aos previstos no planejamento (Tabela 1), pela adição de NaCl. Foram adicionados volumes de 4,00 ou 8,00 mL de acetonitrila, correspondentes aos níveis (-) e (+) do planejamento fatorial, (Tabela 1). Essa solução foi mantida sob agitação mecânica, em mesa agitadora (Tecnal TE – 420), por 15 ou 30 min correspondentes aos níveis (-) e (+) do planejamento fatorial (Tabela 1), à temperatura ambiente e sob agitação suave.

Essas amostras foram deixadas em freezer a aproximadamente -20 °C por 12 h. Após esse período, a fase orgânica líquida foi passada por um papel de filtro com sulfato de sódio anidro (Nuclear – P.A.), sendo o papel de filtro previamente lavado com acetonitrila. Os volumes dos extratos foram ajustados para 8,00 mL de acetonitrila e armazenados em frascos de vidro em freezer até o momento da análise cromatográfica.

### Polaridade do solvente extrator

Foi avaliado também o efeito da modificação da polaridade do solvente extrator na porcentagem de recuperação dos piretróides. Mantendo-se o volume da mistura extratora igual a 8,0 mL, foi avaliado o efeito da adição de 0,5; 1,0 e 1,5 mL de acetato de etila à acetonitrila. Em condições semelhantes foi avaliada também a adição de metanol ao solvente extrator, acetonitrila, em quantidades iguais a 0,2 e 0,5 mL.

### Validação do método

A técnica otimizada foi validada com relação aos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (ensaio de recuperação e comparação de métodos), de acordo com recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)<sup>21</sup> e de outras publicações<sup>22,23</sup>.

A seletividade foi avaliada pela aplicação da técnica ELL-PBT otimizada em amostras de água do Ribeirão São Bartolomeu sem e com adição de padrões dos piretróides a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

A linearidade de resposta foi avaliada submetendo-se amostras de água destilada fortificada com padrões dos piretróides entre 10,0 e 750,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  e submetidas à técnica de ELL-PBT. Os limites de detecção e quantificação foram calculados pelos coeficientes linear e angular das curvas analíticas de extratos de amostras de água fortificadas com piretróides entre 2,0 e 12,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , submetidas à ELL-PBT.

A precisão do método foi determinada em amostras de água fortificadas com padrões dos piretróides (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), com sete repetições e submetidas ao método de ELL-PBT. A precisão intermediária foi determinada avaliando-se os valores dos coeficientes de variação de resultados da ELL-PBT de amostras de água fortificadas com os piretróides (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). A extração e análise feitas com sete repetições pelo mesmo analista aconteceram em três datas diferentes (1 dia; 1 semana e 1 mês).

A exatidão do método foi avaliada, em triplicata, por ensaios de recuperação em três níveis de concentração (20,0; 40,0 e 200,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e por comparação com outros métodos de extração<sup>24</sup>.

## Análise cromatográfica

A identificação e quantificação dos piretróides nos extratos foram realizadas em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC 17A) com detector por captura de elétrons, usando como padrão interno solução de bifentrina a  $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Na análise cromatográfica foi utilizada uma coluna capilar Agilent Technologies HP-5 de 30 m de comprimento,  $0,25 \mu\text{m}$  de d. i. e  $0,1 \mu\text{m}$  de espessura de filme. As condições cromatográficas de análise simultânea foram: temperatura do injetor igual a  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ ; temperatura da coluna a  $220 \text{ }^\circ\text{C}$  com rampa de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  por min até  $280 \text{ }^\circ\text{C}$ , sendo esta temperatura mantida por 2 min e temperatura do detector de  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ . O volume do extrato injetado foi de  $1,0 \mu\text{L}$ , a vazão do gás de arraste ( $\text{N}_2$ ) de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$  e divisão de fluxo de 1:5.

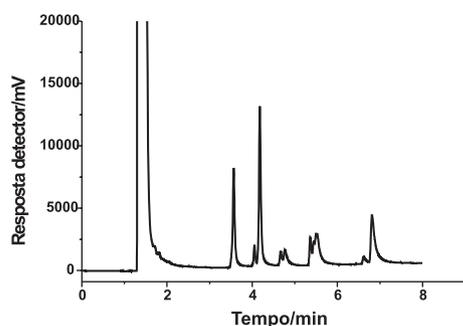
## Persistência dos piretróides em água

No estudo da persistência dos quatro piretróides em água foram preparados  $500,0 \text{ mL}$  de solução aquosa contendo  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada piretróide. Essa mistura foi mantida sob condições ambientais,  $25\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$  aproximadamente, durante 80 dias. Em datas pré-definidas ( $1^\circ$ ,  $5^\circ$ ,  $10^\circ$ ,  $15^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $40^\circ$ ,  $50^\circ$ ,  $60^\circ$  e  $80^\circ$  dia), foram coletados  $4,00 \text{ mL}$  dessa solução e os piretróides foram extraídos pelo processo de ELL-PBT otimizado e os extratos analisados por CG-DCE. Os experimentos foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise cromatográfica

Na Figura 2 está representado um cromatograma de uma solução padrão destes piretróides, em acetonitrila, a  $500 \mu\text{g L}^{-1}$ . O segundo pico, com tempo de retenção ( $t_R$ ) igual a 3,6 min corresponde ao padrão interno, bifentrina. Os demais picos, com  $t_R$  iguais a 4,2; 4,8; 5,5 e 6,8 min correspondem à  $\lambda$ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina, respectivamente. A presença de picos duplos para os piretróides está relacionada com a conversão em isômeros durante a injeção no cromatógrafo<sup>25</sup>. A quantificação desses piretróides foi feita considerando-se a soma das áreas dos picos dos isômeros, tanto nos cromatogramas das amostras como dos padrões.



**Figura 2.** Cromatograma de uma solução padrão de  $500,0 \mu\text{g L}^{-1}$  dos piretróides estudados, onde:  $t_R = 3,6 \text{ min}$ : bifentrina (padrão interno),  $t_R = 4,2 \text{ min}$ :  $\lambda$ -cialotrina,  $t_R = 4,8 \text{ min}$ : permetrina,  $t_R = 5,5 \text{ min}$ : cipermetrina e  $t_R = 6,8 \text{ min}$ : deltametrina

As curvas analíticas e os dados da regressão linear, Tabela 2, indicam que a resposta do detector por captura de elétrons (DCE) é linear para todos os compostos estudados, no intervalo de  $10,0$  a  $750,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Além disso, é possível verificar pelos valores dos coeficientes angulares das curvas analíticas que o detector por captura de elétrons (DCE) é mais sensível à  $\lambda$ -cialotrina que aos de-

mais piretróides. Esta sensibilidade está relacionada com a presença e o número de grupos eletrofílicos presentes na molécula.

**Tabela 2.** Linearidade de resposta do detector (DCE) na faixa de  $10,0$  a  $750,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para os quatro piretróides com os valores dos coeficientes angular (sensibilidade), linear e de regressão  $r$  (linearidade)

Piretróide	Coef. angular $\times 10^3$ (sensibilidade)	Coef. linear $\times 10^2$	Coef. correlação, $r$ (Linearidade)
$\lambda$ -cialotrina	3,7	2,64	0,9984
cipermetrina	2,5	4,48	0,9956
deltametrina	2,2	7,43	0,9911
permetrina	1,0	3,34	0,9992

### Otimização da técnica de extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura

No processo de otimização da técnica de extração e análise dos quatro piretróides, os efeitos de três fatores foram avaliados simultaneamente: a proporção entre volume de amostra e acetonitrila, a adição de NaCl e o tempo de agitação e contato da mistura. Nessa avaliação, um planejamento fatorial  $2^3$  foi conduzido e os efeitos avaliados pelas porcentagens de recuperação. Os ensaios, realizados em duplicata, geraram 16 respostas que permitiram estimar os erros experimentais associados à determinação de cada resposta média. Com essas repetições foi possível, usando o programa estatístico Statistica®, calcular as porcentagens de recuperação média, os efeitos de cada fator e as interações entre os fatores na extração de cada um dos piretróides. Os erros associados a cada efeito e suas interações foram avaliados pelo teste  $t$  para 95% de probabilidade ( $\alpha = 0,05$ ) e 8 repetições ( $n = 8$ ). Alguns resultados da análise estatística são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores ( $\pm$  estimativa do erro experimental) na extração de cada um dos piretróides, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de água, pelo método ELL-PBT

	$\lambda$ -cialotrina	cipermetrina	deltametrina	permetrina
Recup. Média	$57 \pm 0,8$	$65 \pm 1$	$66 \pm 1$	$81 \pm 1$
(1) Volume	<b><math>11 \pm 2^*</math></b>	$7 \pm 2$	$4 \pm 2$	$1 \pm 3$
(2) Adição sal	<b><math>-8 \pm 2^*</math></b>	$-4 \pm 2$	<b><math>-6 \pm 2^*</math></b>	$-2 \pm 3$
(3) Tempo	$-2 \pm 2$	$-4 \pm 2$	$-4 \pm 2$	$6 \pm 3$
(1) e (2)	$3 \pm 2$	$1 \pm 2$	$1 \pm 2$	$1 \pm 2$
(1) e (3)	$3 \pm 2$	$1 \pm 2$	$2 \pm 2$	$-5 \pm 3$
(2) e (3)	$-3 \pm 2$	$-3 \pm 2$	$-2 \pm 2$	$-3 \pm 3$

\*( $P > 0,05$ ) Os números em negrito correspondem a resultados significativos em nível de 95% de probabilidade pelo teste  $t$ .

Os resultados da Tabela 3 permitem concluir que, nos níveis avaliados, não houve interação entre os fatores estatisticamente significativos em nível de 95% de probabilidade pelo teste  $t$ . Conclui-se, no entanto, que pelo menos dois fatores isolados afetam significativamente os resultados. O aumento da proporção do volume do solvente acetonitrila em relação ao volume de amostra, de 1:1 para 1:2 (v/v) (amostra:acetonitrila), aumentou o rendimento de extração de 11% para  $\lambda$ -cialotrina e de 7% para cipermetrina. Para os demais piretróides, permetrina e deltametrina, os aumentos de 1 e 4%, respectivamente, não foram significativos. Isto significa que, isoladamente, o aumento da proporção de amostra:acetonitrila (de 1:1 para 1:2 v/v) contribui para o aumento na por-

centagem de extração de pelo menos dois piretróides em amostra de água.

Pode-se notar, também, o efeito negativo da adição de sal. O rendimento da extração cai de 8% em média para  $\lambda$ -cicalotrina e de 6% para deltametrina. Permetrina e cipermetrina também apresentaram efeito negativo, 2 e 4%, respectivamente, não significativo. Com o aumento da força iônica da solução aquosa pela adição de NaCl esperava-se um efeito positivo devido à solvatação dos íons pelas moléculas de água, facilitando a migração dos piretróides para a fase orgânica. Os resultados, no entanto, indicam que a adição de sais pode dificultar a formação de uma fase única, diminuindo a porcentagem de extração dos compostos. Os aumentos dos tempos de contato e de agitação dos piretróides na água não proporcionaram aumento significativo na porcentagem de recuperação de extração desses compostos.

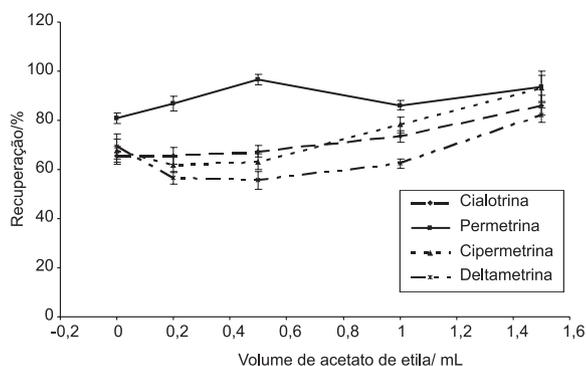
Pelos resultados obtidos da análise estatística, Tabela 3, os ensaios 3 e 4 (Tabela 1) que correspondem aos fatores proporção amostra:acetonitrila 1:2 v/v, concentração de NaCl igual a 0,020 mol L<sup>-1</sup> e tempo de extração de 15 min foram os escolhidos para dar continuidade ao desenvolvimento e otimização da técnica de ELL-PBT para determinar os piretróides cipermetrina, deltametrina,  $\lambda$ -cicalotrina e permetrina em água.

Usando uma proporção de volumes amostra:acetonitrila de 1:2 v/v, pequenas modificações na polaridade do solvente extrator foram avaliadas com a adição de acetato de etila e de metanol.

Na Figura 3 estão apresentadas as porcentagens de recuperação dos quatro piretróides estudados, após extração com acetonitrila e 0,00; 0,20; 0,50; 1,00 e 1,50 mL de acetato de etila. O valor máximo de acetato de etila que foi adicionado à mistura amostra:acetonitrila sem romper a fase única foi de 1,50 mL.

O acetato de etila é menos polar que a acetonitrila, e como os piretróides são hidrofóbicos, a adição de acetato de etila favorece as extrações. Pode-se observar que a mistura de 1,50 mL de acetato de etila e 6,50 mL de acetonitrila proporcionou o melhor rendimento na extração dos piretróides água, apresentando resultados que variaram de 82 a 90% para  $\lambda$ -cicalotrina, 87 a 98% para permetrina, 88 a 97% para cipermetrina e 80 a 86% para deltametrina. Os demais volumes adicionados apresentaram maior dispersão dos resultados obtidos, além de menor eficiência de extração.

A adição de 0,50 mL de metanol à acetonitrila, com a finalidade de alterar a polaridade da mistura extratora, causou uma queda acentuada na eficiência de extração para os quatro piretróides, com porcentagens de recuperação menores que 15%. A adição de 0,20 mL de metanol à acetonitrila somente apresentou resultados satisfatórios para a extração de permetrina em água. O uso de metanol como modificador da polaridade da mistura extratora não



**Figura 3.** Porcentagens de recuperação de  $\lambda$ -cicalotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água, pela ELL-PBT, em condições otimizadas e com adição de 0,00; 0,20; 0,50; 1,00 e 1,50 mL de acetato de etila ao solvente extrator (acetonitrila)

contribuiu para maior eficiência no processo de extração. O aumento da polaridade da mistura extratora além de diminuir a eficiência da extração, dificultou o congelamento da fase aquosa.

Na otimização do tempo de congelamento no processo de extração simultânea dos piretróides por ELL-PBT observou-se que em um tempo menor que 6 h o congelamento da água não ocorreu totalmente e que a partir de 6 h, não houve diferenças significativas nas porcentagens de recuperação de  $\lambda$ -cicalotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina.

### Validação do método

A validação da técnica de extração e análise simultânea dos quatro piretróides foi executada determinando os principais parâmetros, seguindo recomendações descritas em publicações específicas<sup>21-23</sup>.

Os limites de detecção e quantificação do método (LD e LQ) foram calculados pelos parâmetros da curva analítica. Para este cálculo, foram feitas curvas analíticas utilizando soluções padrão contendo estes piretróides em concentrações decrescentes (12,0; 10,0; 8,0; 6,0; 4,0 e 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e próximas ao limite de detecção. O LD e o LQ foram considerados como 3 e 10 vezes, respectivamente, a razão entre a estimativa dos coeficientes linear e angular da curva analítica<sup>21</sup>. Segundo orientações do INMETRO<sup>21</sup> o limite de detecção e de quantificação do método pode ser determinado pela razão dos coeficientes linear e angular da curva analítica.

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

$$\text{LQ} = 10 \times \frac{s}{S}$$

onde: s = coeficiente linear da curva analítica; S = coeficiente angular da curva analítica.

Os coeficientes linear e angular da curva analítica, bem como os valores de LD e LQ obtidos para os piretróides são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Coeficientes linear (s) e angular (S) das curvas analíticas obtidas de amostras de água fortificada com piretróides (2,0 a 12,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), em triplicatas, submetidas à ELL-PBT e os respectivos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Piretróide	s	S	LD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
$\lambda$ -cicalotrina	0,00142	0,00419	1,1	7,6
cipermetrina	0,00163	0,00289	1,9	2,7
deltametrina	0,00171	0,00197	2,9	5,5
permetrina	0,00200	0,00207	3,2	9,5

Verificou-se que os valores do LD obtidos para análise dos piretróides  $\lambda$ -cicalotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina utilizando CG-DCE estão entre 1,1 e 3,2  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Esses resultados são concordantes com resultados de análises de piretróides em leite obtidos por outros pesquisadores<sup>16</sup>, que é de 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Valores um pouco menores, entre 0,02 e 0,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  de piretróides em urina, foram encontrados por outros pesquisadores usando CG/MS<sup>25</sup>.

Os valores de LQ do método, obtidos para os piretróides estudados estão entre 3,3 e 9,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  apresentando coeficiente de variação (CV) de 2,7 a 9,5%, valores menores que 10% como recomendado<sup>21</sup>.

A precisão do método de ELL-PBT para os quatro piretróides estudados em amostras de água, sob condições de repetibilidade, foi avaliada pelo cálculo da estimativa do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de sete repetições do procedimento analítico otimizado. As porcentagens de recuperação obtidas (%R) e os coeficientes de variação (CV) estão apresentados na Tabela 5.

Os coeficientes de variação obtidos estão entre 3,7 e 4,9%, valores bem menores que os aceitáveis para amostras complexas que podem ser de até 20%<sup>23</sup>. Esses valores são equivalentes à precisão observada em análises de piretróides em outras matrizes<sup>25,26</sup>.

A precisão intermediária refere-se às variações ocorridas dentro de um mesmo laboratório, quando um ou mais fatores são alterados<sup>23</sup>. Neste trabalho, procurou-se determinar a variação na porcentagem de recuperação (%R) de  $\lambda$ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina extraídas de amostras de água pela técnica ELL-PBT em diferentes dias. A precisão intermediária do método foi avaliada pelos valores da porcentagem de recuperação (%R) e do coeficiente de variação (CV), obtidos de análises executadas em diferentes dias, pelo mesmo analista. Os resultados obtidos para extração dos compostos estudados na água bem como os respectivos coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Porcentagens de recuperação, (%R), e coeficientes de variação, CV (%), obtidos da aplicação do método ELL-PBT, com sete repetições, em amostras de água fortificadas com piretróides, (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), em diferentes dias

	$\lambda$ - cialotrina		cipermetrina		deltametrina		permetrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
Dia 1	87,0	4,6	93,1	4,4	82,1	3,0	93,4	4,6
1 semana	86,0	4,8	93,1	3,5	85,5	3,9	93,6	4,6
1 mês	86,1	2,9	88,4	4,5	81,2	3,3	91,9	4,6

Os resultados confirmaram que a técnica de extração e análise dos piretróides em água não sofre influências quando realizada no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, em diferentes dias. A precisão intermediária do método é satisfatória, mostrando que os resultados de recuperação são estatisticamente iguais, em nível de 95% de probabilidade.

Neste estudo, foram realizados ensaios de recuperação (Tabela 6) e comparação de métodos (Tabela 7) para avaliar a exatidão do método ELL-PBT. A porcentagem de recuperação foi calculada segundo as recomendações do INMETRO<sup>21</sup>. Os piretróides foram adicionados em concentrações iguais a 20,0; 40,0 e 200,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Assim, os ensaios de recuperação foram feitos extraíndo-se os compostos em estudo, presentes em matrizes de água, segundo a técnica proposta. Os resultados obtidos para extração dos piretróides  $\lambda$ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina em água, bem como os respectivos coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Porcentagens de recuperação, (%R), e coeficientes de variação, CV (%), obtidos da extração de piretróides em amostras de água fortificadas (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), em triplicata, pela técnica de ELL-PBT

Conc. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$\lambda$ - cialotrina		cipermetrina		deltametrina		permetrina	
	% R	CV(%)	% R	CV(%)	% R	CV(%)	% R	CV(%)
20,0	89,3	6,1	92,1	5,2	86,9	4,5	91,2	12,6
40,0	86,7	4,3	88,8	5,0	83,1	9,4	89,6	6,6
200,0	87,4	6,8	87,0	5,8	83,4	4,7	89,5	4,1

Os resultados, dispostos na Tabela 6, para extração dos piretróides em água nas concentrações especificadas não diferem entre si (em nível de 95% de probabilidade), mostrando que a recuperação independe do nível de concentração dos analitos na amostra. Esses resultados são equivalentes aos obtidos nos cálculos da precisão intermediária, Tabela 5, comprovando a exatidão e precisão do método.

Os resultados obtidos empregando-se a ELL-PBT foram comparados com os obtidos por dois métodos usados como referência<sup>24</sup>, para extração de pesticidas  $\lambda$ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água. (Tabela 7).

**Tabela 7.** Porcentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação, CV (%), obtidos de extrações dos piretróides em amostras de água fortificadas (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), em triplicata, usando a ELL-PBT e dois métodos de referência<sup>24</sup>

	$\lambda$ - cialotrina		cipermetrina		deltametrina		permetrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
Método 1	81,8	3,0	76,5	3,2	82,3	1,8	83,1	9,2
Método 2	89,8	15,7	87,6	19,2	75,5	11,2	80,3	14,1
ELL-PBT	87,2	3,7	92,2	4,9	82,3	4,5	93,4	4,6

Os métodos 1 e 2 consistem basicamente de uma extração líquido-líquido utilizando como solvente extrator acetato de etila e diclorometano, respectivamente. Os resultados obtidos da porcentagem de recuperação para cada piretróide pelos métodos 1 e 2 foram equivalentes, sendo observado um coeficiente de variação menor no método 1, de 1,8 a 9,2%.

Avaliando-se o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos métodos 1 e 2 e o método de ELL-PBT pode-se concluir que as porcentagens de recuperação obtidas para  $\lambda$ -cialotrina, permetrina e deltametrina foram estatisticamente iguais nos três métodos estudados, com exceção da cipermetrina em que a ELL-PBT apresentou maior eficiência de extração que o método 1.

Os métodos 1 e 2 apresentaram como vantagem o fator de pré-concentração das amostras de água, aproximadamente igual a 3 e 12 vezes, respectivamente. Entretanto a ELL-PBT apresenta menor consumo de solvente (8 mL) em relação aos métodos 1 e 2 (135 e 20 mL) e não necessita de etapas de evaporação e troca de solvente. Com isso são reduzidos os riscos de contaminação e perdas de amostras, proporcionando recuperações com resultados repetitivos, o que pode ser percebido pela comparação com os coeficientes de variação do método 2, de 11,2 a 19,2%. O método 2 apresenta como principal desvantagem o uso do solvente diclorometano que, além de não ser compatível com o detector por captura de elétrons utilizado na análise cromatográfica, apresenta alta toxicidade, inflamabilidade e riscos ambientais.

O método de extração líquido-líquido e partição em baixa temperatura, depois de otimizado e validado, foi também aplicado em amostras de águas coletadas no Ribeirão São Bartolomeu, com o objetivo de aplicar o método em amostras naturais e avaliar a seletividade do mesmo. Esse ribeirão recebe quase todo o esgoto doméstico da cidade e dele foram coletadas 3 amostras. Nessas amostras não foi detectada a presença de nenhum dos quatro piretróides, uma vez que a meia-vida dos piretróides avaliados é relativamente pequena. Essas amostras, que se mostravam bastante turvas em razão do material em suspensão, foram contaminadas com quantidades conhecidas dos quatro piretróides. Sem nenhum tratamento prévio as amostras foram submetidas ao método de extração e análise para avaliar a seletividade e se algum efeito de matriz poderia ser observado. Comparativamente, as taxas de recuperação e os coeficientes de variação das análises (Tabela 8) são estatisticamente semelhantes, não havendo efeito de matriz nos resultados.

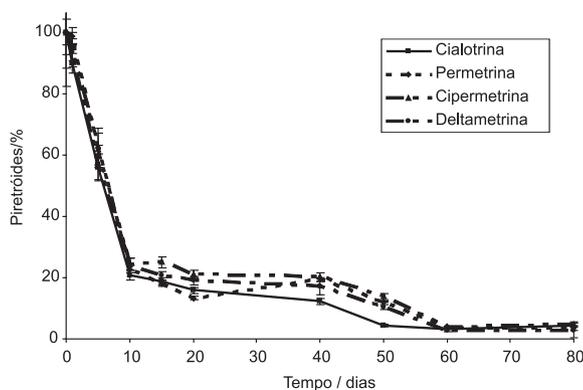
### Persistência dos piretróides em água

A persistência dos piretróides em água foi avaliada por 80 dias e os resultados (Figura 4) mostram que a estabilidade dos piretróides

**Tabela 8.** Percentagens de recuperação (%R) e coeficientes de variação, CV (%), obtidos de extrações de piretróides em amostras de água destilada e de água do Ribeirão São Bartolomeu fortificadas com piretróides (1000 µg L<sup>-1</sup>), em triplicata, usando o método de ELL-PBT

	λ-cialotrina		cipermetrina		deltametrina		permetrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
Água dest.	87,2	3,7	92,2	4,9	82,3	4,5	93,4	4,6
Amostra 1	87,4	2,1	85,0	5,7	83,4	5,8	95,3	7,9
Amostra 2	87,2	1,6	84,0	3,2	85,3	2,0	87,2	0,8
Amostra 3	85,9	2,9	85,6	3,4	86,0	2,7	90,2	7,1

em solução aquosa é muito pequena. Nos primeiros 10 dias, ocorre uma rápida degradação dos piretróides com uma perda de aproximadamente 80% do total. Posteriormente, entre o 10<sup>o</sup> e 60<sup>o</sup> dia, ocorre uma degradação lenta dos piretróides, permanecendo em média 3% de permetrina, cipermetrina, deltametrina e λ-cialotrina, após 80 dias.



**Figura 4.** Persistência dos piretróides λ-cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água pelo período de 80 dias

A condição a que a solução contendo os piretróides foi submetida é bastante diferente daquela no campo. A solução foi exposta à luz, sem incidência direta dos raios solares, pH igual a 6,5. Conseqüentemente, os resultados de meia-vida obtida diferem um pouco dos já publicados. A meia-vida estimada para os quatro piretróides é de apenas 5 dias. Para a λ-cialotrina, esse resultado é bastante diferente do encontrado na publicação da OMS (WHO)<sup>27</sup>, que foi de 30 dias em solução aquosa de pH igual a 5. Em WHO<sup>28</sup>, a meia-vida da permetrina foi de 4 dias e para deltametrina exposta à luz solar a meia-vida é de 47,7 dias<sup>29</sup>. A meia-vida da cipermetrina descrita em WHO<sup>30</sup> em águas naturais foi de 14 dias. Essa diferença nos resultados pode estar relacionada com as condições em que foram avaliadas.

## CONCLUSÕES

O método de extração e análise simultânea desenvolvido para piretróides em água mostrou-se com algumas vantagens em relação aos demais. O método é prático e com número de etapas bastante reduzido. Isto o torna de fácil execução, apesar do tempo necessário para congelamento das misturas ser relativamente longo. Os extratos são limpos, mesmo em matrizes aquosas mais complexas, não sendo necessária nenhuma etapa posterior de “clean

up”. O método de extração e análise foi otimizado com resultados que podem ser considerados como ótimos. O único inconveniente do método é não permitir a pré-concentração da amostra, a não ser que seja incluída uma etapa de evaporação do solvente. Mesmo nessas condições e considerando os limites máximos permitidos de piretróides em águas estabelecidos pela portaria 1.469/2000 que é de 20 µg L<sup>-1</sup>, o método é adequado. Na validação do método os parâmetros avaliados são satisfatórios com LD e LQ para os quatro piretróides entre 1,1 e 3,2 e 3,3 e 9,6 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

## AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG pelo apoio financeiro, ao CNPq pela bolsa concedida, aos Profs. R. N. C. Guedes, do Departamento de Biologia Animal/UFV pelos padrões dos piretróides, e C. Reis do DQ/UFV, pela constante discussão sobre o assunto.

## REFERÊNCIAS

- Chen, Z. M.; Wang Y. H.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *754*, 367.
- Leng, G.; Ranft, U.; Sugiri, D.; Hadnagu, W.; Berger-Preib, E.; Idel, H.; *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2003**, *206*, 85.
- <http://www.inchem.org/documents/pds/pdsotter/class.pdf>, acessada em Julho 2004.
- Barrionuevo, R. W.; Lanças, F. M.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 172.
- House, W. A.; Ou, Z.; *Chemosphere* **1992**, *24*, 819.
- Hengel, M. J.; Mower, C. R.; Shibamoto, T.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1997**, *59*, 171.
- Zrostlíková, J.; Hajšlová, J.; Cajka, T.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1019*, 173.
- S'tajnbaher, D.; Kralj, A. Z.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *1015*, 185.
- Ramesh, A.; Ravi, P. E.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *802*, 371.
- Bissacot, D. Z.; Vassilieff, I.; *J. Anal. Toxicol.* **1997**, *21*, 397.
- Dores, E. F. G. C.; Freire, E. M. L.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 27.
- Goineiro, A. S.; Dórea, H. S.; *Resumos da 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latino-Americano de Química*, Salvador, Brasil, 2004.
- Angerer, J.; Ritter, A.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, *695*, 217.
- Peres, T. B.; Papini, S.; Marchetti, M.; Nakagawa, L. E.; Marcondes, M. A.; Andréa, M. M.; Luchini, L. C.; *Arq. Inst. Biol., São Paulo* **2002**, *69*, 87.
- Lee, S.; Gan, J.; Kabashima, J.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7194.
- Goulart, S. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2003.
- Bissacot, D. Z.; Vassilieff, I.; *Vet. Hum. Toxicol.* **1997**, *39*, 6.
- Komatsu, E.; Vaz, J. M.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 720.
- Cabras, P.; Angioni, A.; Melis, M.; Minelli, E. V.; Pirisi, F. M.; *J. Chromatogr. A* **1997**, *761*, 327.
- Jhuhler, R. K.; *J. Chromatogr. A* **1997**, *786*, 145.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, DOQ-CGCRE-008, 2003.
- Lanças, F. M.; *Validação de métodos cromatográficos de análise – Métodos Cromatográficos de Análise 6*, Ed. Rima: São Carlos, 2004.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
- Vinãs, P.; Campillo, N.; García, L. L.; Aguinaga, N.; Córdoba, M. H.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *978*, 249.
- Maštovská, K.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1040*, 259.
- Leng, G.; Gries, W.; *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *814*, 285.
- WHO-World Health Organization; *Environmental Health Criteria 99, Cyhalothrin*, Geneva, 1990.
- WHO-World Health Organization; *Environmental Health Criteria 94, Permethrin*, Geneva, 1990.
- WHO-World Health Organization; *Environmental Health Criteria 97, Deltamethrin*, Geneva, 1990.
- WHO-World Health Organization; *Environmental Health Criteria 82, Cipermetrin*, Geneva, 1989.