

HEULLA PEREIRA VIEIRA

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO
SIMULTÂNEA DE PIRETRÓIDES EM ÁGUA E
SOLO E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA
GASOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

HEULLA PEREIRA VIEIRA

**OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO
SIMULTÂNEA DE PIRETRÓIDES EM ÁGUA E
SOLO E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA
GASOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 28 de Fevereiro de 2005

Profa. Dra. Maria Eliana L. R. de Queiroz
(Conselheira)

Prof. Dr. Jaime Wilson Vargas de Mello
(Conselheiro)

Prof. Dr. Efraim Lázaro Reis

Prof. Dr. Maurício Xavier Coutrim

Prof. Dr. Antônio Augusto Neves
(Orientador)

A Deus,

Aos meus pais Vilmar e Terezinha,

A minha irmã Sheilla,

Ao Ronald,

Com amor,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores Antônio Augusto Neves e Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz, pela confiança, incentivo, ensinamentos transmitidos, pela dedicada orientação e, sobretudo, pela amizade.

Aos professores Jaime Wilson Vargas de Mello, Maurício Xavier Coutrim e Efraim Lázaro Reis pela participação na banca examinadora e pelas sugestões para melhoria do trabalho.

Ao Professor César Reis pelas valiosas sugestões.

Ao Professor Raul Narciso Carvalho Guedes pelo apoio, disponibilizando os padrões.

Ao professor Elson Santiago Alvarenga pela colaboração.

Ao Professor Cláudio Ferreira Lima, ao Professor José Humberto de Queiroz e à Elizete pela amizade.

A todos os amigos do laboratório de química analítica – LAQUA: Anízio, Simone, Fabrícia, Telma, Raquel, Patrícia, Adalberto, Leila, Gevany, Marciano, Ricardo e Lucimara pelo alegre convívio, e pela inesquecível amizade.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

HEULLA PEREIRA VIEIRA, filha de Vilmar Pereira e Terezinha de Fátima Vieira, nasceu em Patos de Minas, Minas Gerais, em 21 de Março de 1981.

Em março de 1999, iniciou o Curso de Graduação em Química – Habilitação Química Industrial, pela Universidade Federal de Ouro Preto, diplomando-se como bacharel em março de 2003. Neste mesmo mês e ano, iniciou o curso de pós-graduação em Agroquímica, em nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2005.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Piretróides e o ambiente	1
1.1.1. Presença de resíduos de pesticidas na água.....	5
1.1.2. Presença de resíduos de pesticidas no solo	5
1.2. Técnicas de análise.....	7
1.3. Técnicas de extração e purificação.....	8
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1. Preparo de soluções e amostras.....	12
2.1.1. Soluções padrão de piretróides	12
2.1.2. Preparo de amostras de água fortificadas.....	13
2.1.3. Amostra de solo	13
2.1.3.1. Caracterização da amostra de solo	13
2.1.3.2. Preparo de amostras de solo fortificadas	13
2.2. Otimização das técnicas de extração ELL-PBT e ESL-PBT.....	14
2.2.1. Planejamento fatorial	14
2.2.1.1. Extração dos piretróides em água	15
2.2.1.2. Extração dos piretróides em solo.....	15
2.2.2. Avaliação da razão água:acetonitrila na eficiência de extração de piretróides no solo	16
2.2.3. Efeito da adição de metanol na porcentagem de extração dos piretróides em água pela técnica ELL-PBT	17
2.2.4. Efeito da adição de acetato de etila na porcentagem de extração dos piretróides em água e solo pelas técnicas ELL-PBT e ESL-PBT.....	18
2.2.5. Efeito do tempo de congelamento na eficiência da ELL-PBT e da ESL-PBT	18
2.3. Análise cromatográfica.....	19
2.3.1. Curva analítica (método da padronização interna).....	20
2.4. Validação do método analítico	20
2.4.1. Seletividade	21
2.4.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	21
2.4.3. Linearidade de resposta do detector	22
2.4.4. Precisão	22

2.4.4.1. Repetitividade	22
2.4.4.2. Precisão intermediária	23
2.4.5. Exatidão	23
2.4.5.1. Ensaio de recuperação	23
2.4.5.2. Comparação de métodos.....	24
2.5. Estudo da persistência dos piretróides deltametrina, cipermetrina, permetrina e λ - cialotrina na água e no solo	25
2.6. Determinação dos piretróides deltametrina, cipermetrina, permetrina e λ -cialotrina em água do Ribeirão São Bartolomeu	26
2.6.1. Avaliação do efeito da matriz na porcentagem de recuperação de extração dos piretróides	26
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
3.1. Caracterização das amostras de água e de solo	27
3.2. Análise cromatográfica	28
3.2.1. Curvas analíticas e linearidade de resposta do detector	29
3.3. Otimização das técnicas ELL-PBT e ESL-PBT	31
3.3.1. Planejamento fatorial	32
3.3.2. Avaliação da razão água:acetonitrila na eficiência de extração de piretróides no solo	38
3.3.3. Efeito da adição de metanol e acetato de etila na ELL-PBT de piretróides na água	39
3.3.4. Efeito da adição de acetato de etila na técnica ESL-PBT de piretróides no solo	41
3.3.5. Efeito do tempo de congelamento na eficiência da ELL-PBT e da ESL-PBT	43
3.4. Metodologia otimizada	44
3.5. Validação do método analítico	45
3.5.1. Seletividade	45
3.5.2. Limite de detecção e limite de quantificação.....	47
3.5.3. Precisão	48
3.5.3.1. Repetitividade	48
3.5.3.2. Precisão intermediária	49
3.5.4. Exatidão	50
3.5.4.1. Ensaio de recuperação	50
3.5.4.2. Comparação de métodos.....	51
3.6. Estudo da persistência dos piretróides deltametrina, cipermetrina, permetrina e λ - cialotrina na água e no solo	53
3.7. Determinação dos piretróides deltametrina, cipermetrina, permetrina e λ -cialotrina em água do Ribeirão São Bartolomeu e avaliação do efeito de matriz	56
4. CONCLUSÕES	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

RESUMO

VIEIRA, Heulla Pereira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2005. **Otimização e validação da extração simultânea de piretróides em água e solo e análise por cromatografia gasosa.** Orientador: Antônio Augusto Neves. Conselheiros: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz e Jaime Wilson Vargas de Mello.

Procurou-se nesse trabalho otimizar e validar as técnicas de extração líquido-líquido por partição em baixa temperatura (ELL-PBT) e extração sólido-líquido por partição em baixa temperatura (ESL-PBT) dos piretróides: deltametrina, cipermetrina, λ -cialotrina e permetrina em água e em um solo argiloso, respectivamente. Para otimizar a técnica de ELL-PBT, foi feito um experimento obedecendo a um planejamento fatorial 2^3 para avaliar quantitativamente o efeito dos fatores: proporção dos volumes de água e acetonitrila (1:1 e 1:2), força iônica (0,02 e 0,10 mol L⁻¹ em sódio) e tempo de agitação (15 e 30 minutos), na eficiência de extração dos piretróides de amostras de água. As misturas, em fase única, foram agitadas e deixadas em freezer por 12 horas. Depois de separadas as fases pelo congelamento da fase aquosa, o líquido sobrenadante foi separado e submetido à análise cromatográfica usando detector por captura de elétrons e bifentrina como padrão interno. Os mesmos fatores foram avaliados na otimização da técnica ESL-PBT na extração dos piretróides do solo, sendo o tempo de agitação em níveis diferentes (30 e 60 minutos). Pelos resultados do experimento, não houve nenhuma interação, estatisticamente significativa, entre os fatores, sendo significativo somente o aumento da proporção água:acetonitrila. Os melhores resultados obtidos para a extração dos quatro piretróides em água, usando a técnica ELL-PBT e em solo usando a ESL-PBT foram conseguidos com uma proporção água:acetonitrila 1:2, uma força iônica de 0,02 mol L⁻¹ em sódio e um tempo de agitação de 15 minutos para ELL-PBT e 30 minutos para

ESL-PBT. Ainda na otimização dos métodos, avaliou-se o efeito da adição de metanol e acetato de etila como modificadores da polaridade do solvente extrator e o efeito do tempo de congelamento. As técnicas otimizadas foram validadas, determinando-se os principais parâmetros como: seletividade, limites de detecção e de quantificação, linearidade, precisão e exatidão. Os resultados obtidos na otimização e validação indicam que os métodos ELL-PBT e ESL-PBT são eficientes para extração dos quatro piretróides na água e no solo com pequeno consumo de solventes, permitindo determina-los em níveis menores que $20 \mu\text{g L}^{-1}$, limite aceito pela legislação brasileira para permetrina em água potável. As técnicas usadas na extração simultânea dos quatro piretróides mostraram-se eficientes (porcentagem de recuperação maior que 80%), não sendo observado efeito de matriz nas análises realizadas em amostras de água do Ribeirão São Bartolomeu. As técnicas otimizadas e validadas foram usadas na avaliação da taxa de permanência desses piretróides em água e em solo úmido, protegidos da incidência direta da luz do sol, pelo período de 80 dias. Nessas condições, a estabilidade dos piretróides é relativamente pequena. Os piretróides permaneceram no solo durante o período avaliado, sendo observada uma meia-vida de 20 dias para permetrina, 30 dias para cipermetrina e deltametrina e 80 dias para λ -cialotrina, aproximadamente. Os piretróides permaneceram na água, sendo observadas duas etapas características. Nos primeiros 10 dias, ocorreu uma redução drástica das quantidades dos piretróides, sendo observada a degradação de aproximadamente 80 % dos princípios ativos. Na segunda etapa, ocorreu um declínio lento, permanecendo somente 3 %, em média, dos piretróides aos 80 dias. Os métodos de ELL-PBT e ESL-PBT além da vantagem de menor consumo de solventes, não aumenta o volume dos extratos, reduzindo ou evitando etapas de evaporação e troca de solvente, reduzindo os riscos de contaminação e perdas de amostras, proporcionando níveis mais altos de recuperação quando comparado com os procedimentos tradicionais.

ABSTRACT

VIEIRA, Heulla Pereira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2004.

Optimization and validation of pyrethroids simultaneous extraction in water and soil and gas chromatography analysis. Adviser: Antônio Augusto Neves. Committee Members: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz and Jaime Wilson Vargas de Mello.

In this work, the liquid-liquid extraction method by partition at low temperature (LLE-PLT) and the solid-liquid extraction method by partition at low temperature (SLE-PLT) were optimized and validated to analyze the pyrethroids pesticides: deltamethrin, cypermethrin, λ -cyhalothrin and permethrin in water and in a loamy soil, respectively. A factorial design 2^3 was carried out to evaluate quantitatively the influence of the factors: water and acetonitrile proportion (1:1 and 1:2), ionic strength (0,02 and 0,10 mol L⁻¹ in sodium) and shaking time (15 and 30 minutes) in the recovery rate of the pyrethroids from water samples. The mixtures, in one phase, were shaken and left in the freezer during 12 hours. Then, the phases were separated by freezing the aqueous phase, and the supernatant liquid was separated and submitted to gas chromatography analysis with electron capture detector. Biphenthrin was used as internal standard. The SLE-PLT was optimized for extraction of the pyrethroids in soil, evaluating the same factors and shaking time in different levels (30 and 60 minutes). Through the experimental results, the interactions between the factors were not statistically significant, only the increase of the water:acetonitrile proportion was significant. The best results obtained for the extraction of the four pyrethroids using the LLE-PLT method in water and using SLE-PLT method in soil were obtained with a 1:2 water:acetonitrile proportion, an ionic strength of 0,02 mol L⁻¹ in sodium and a shaking time of 15 minutes for LLE-PLT and 30 minutes for SLE-PLT. Still in the optimization of the methods, solvents as methanol and ethyl acetate were used as modifiers of the polarity of

the extracting solvent, and the effect of the freezing time were evaluated with the purpose of improving the recovery rate. The optimized methods were validated, determining the main parameters: selectivity, detection limits, quantification limits, linearity, precision and accuracy. The results obtained in the optimization and validation indicate that the LLE-LTP and SLE-LTP methods are efficient for extraction of the four pyrethroids in water and soil, affording the determination of these pyrethroids in water in lower levels than 20 mg L⁻¹, limit accepted by the Brazilian legislation for permethrin in drinking water. The methods used in the simultaneous extraction of the four pyrethroids showed efficient (recovery percentage more than 80%), with low consumption of solvents. Matrix effect was not observed in the analysis of water samples from São Bartolomeu River. The optimized and validated methods were used in the evaluation of the permanence rate of these pyrethroids in water and in a humid soil protected from sunshine, during 80 days. In those conditions, the stability of the pyrethroids is relatively low. The pyrethroids were kept in soil during the evaluated period, being observed a half-life of 20 days for permethrin, 30 days for cypermethrin and deltamethrin and 80 days for λ-cyhalothrin, approximately. The pyrethroids were maintained in water, and two characteristics steps were observed. A reduction of the pyrethroids happens in the first 10 days, in this step, the degradation observed was approximately 80% of the active ingredient. In the second step, a slow decline happens, remaining an average of 3% of the pyrethroids in the 80th day. The optimized LLE-PLT and SLE-PLT, besides the advantage of lower consumption of solvents, don't increase the volume of the extracts, either reducing or avoiding evaporation steps and solvent changes, reducing the contamination risks and samples losses, providing higher recovery rate when compared to the traditional procedures.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Piretróides e o ambiente

As piretrinas, componentes ativos extraídos das flores do *Chrysanthemum cinerariaefolium*, têm sido utilizadas há mais de dois séculos no controle de inúmeras espécies de insetos em produtos armazenados. Economicamente, as piretrinas se constituíram no inseticida ideal em função do amplo espectro de atividade, eficiência em doses baixas, praticamente não tóxica para mamíferos e baixo poder residual (CHEN & WANG, 1996). Mesmo com essas vantagens, as piretrinas foram pouco utilizadas no campo para o controle de pragas agrícolas devido a sua instabilidade ao ar e à luz.

Numa tentativa de obter compostos inseticidas com propriedades adequadas, a permetrina, o primeiro piretróide fotoestável e biologicamente ativo para uso agrícola, foi sintetizada por Elliot, em 1973. Posteriormente, outros piretróides foram sintetizados como a deltametrina em 1974, a cipermetrina em 1977 e a λ -cialotrina em 1985, dentre outros piretróides sintéticos (Figura 01) que foram desenvolvidos com sucesso (HIRATA, 1995).

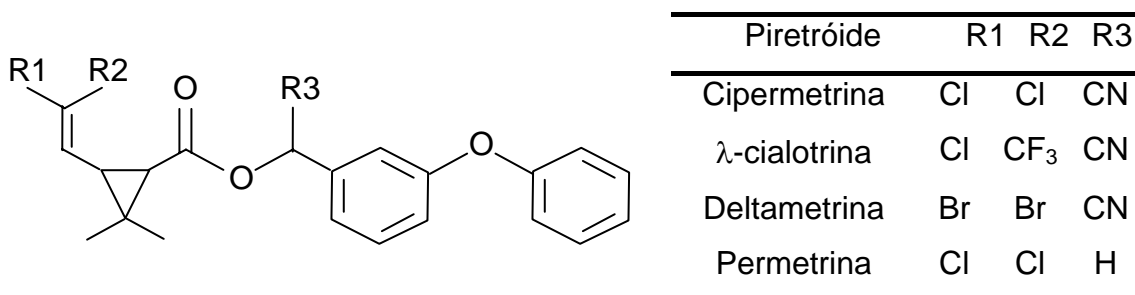


Figura 01. Fórmula estrutural básica de piretróides sintéticos e seus radicais.

Hoje em dia, os piretróides são uma das classes de inseticidas mais utilizadas, sendo extensamente usados na agricultura, horticultura, silvicultura, saúde pública, estando presentes ainda em sprays de uso doméstico.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), os piretróides podem ser utilizados no campo para controle de diversas pragas. Normalmente são aplicados nas partes aéreas de culturas como: algodão, arroz, alho, batata, berinjela, café, cebola, feijão, milho, soja, trigo, tomate, diversos tipos de frutos e outras leguminosas, e ainda em grãos armazenados de feijão, milho e trigo, e em produtos ensacados e armazenados de arroz, café, feijão e milho. Existem ainda no mercado vários produtos comerciais para uso doméstico a base de piretróides. Além disso, são utilizados na pecuária para o controle de carrapatos nos rebanhos.

Piretróides são inseticidas lipofílicos, de ação prolongada (HIRATA, 1995), que atuam no sistema nervoso através da retenção de cálcio livre nos canais de sódio das células, potencializando o grau de excitação das células nervosas e interrupção da transmissão do impulso nervoso, levando os organismos à paralisia e morte (LAUFER et al., 1984; ANGERER & RITTER, 1997; FAKATA et al., 1998).

De acordo com o "International Programme on Chemical Safety" (IPCS, 2000), os piretróides cipermetrina, deltametrina, λ -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 (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001).

Segundo HENGEL e colaboradores (1997), a intoxicação de organismos aquáticos por piretróides torna-se mais pronunciada ao longo da primavera e meses de verão, pois as aplicações coincidem com o período de desova de alguns peixes. Permetrina e outros piretróides exibem efeitos prejudiciais aos organismos aquáticos, reduzindo ou eliminando algumas espécies em apenas 48 horas de exposição a uma concentração de $5,4 \mu\text{g L}^{-1}$.

No organismo humano, os piretróides podem ser absorvidos pelo trato gastrointestinal, pela pele, ou por via inalatória, sendo metabolizados no fígado através de reações de oxidação e hidrólise de ésteres. Seus metabólitos são

excretados, lentamente, na urina, podendo permanecer detectável nos tecidos corporais por até 3 semanas após a ingestão (WHO, 1990b).

Estudos detalhados do metabolismo e da toxicologia dos piretróides avaliam o risco da exposição humana a estes compostos. A primeira ação dos piretróides no sistema nervoso humano é a indução de atividades repetitivas e duradouras, como tremores, salivação e hipersensibilidade. Esses efeitos são mais pronunciados pelos piretróides cipermetrina e deltametrina, que apresentam o grupo ciano na molécula (MIYAMOTO et al., 1995).

Outros estudos mostram que uma alta exposição a piretróides pode causar problemas potenciais para humanos. Tais efeitos incluem: perturbações no sistema imunológico (MOHNSEN & HAHN, 1995), distúrbios endócrinos (SHAN et al., 2004), nódulos linfáticos e carcinogênicos (GO et al., 1999).

Vários outros trabalhos avaliaram a exposição humana à piretróides, por meio da análise de urina de trabalhadores expostos a piretróides durante a aplicação, (ANGERER & RITTER, 1997; SHAN et al., 2004). RAMESH & RAVI (2004) determinaram treze inseticidas piretróides em quarenta e cinco amostras de sangue humano, coletadas de uma população exposta continuamente a diferentes formulações de repelentes contendo piretróides como princípio ativo. Todas as amostras apresentaram resíduos abaixo do limite de quantificação ($0,5 - 2,0 \mu\text{g L}^{-1}$).

A deltametrina tem sido aplicada em grande escala no ambiente para combater a malária em vários países. No México, este piretróide tem sido utilizado desde 1999. Em razão disso, YÁÑEZ e colaboradores (2002), propuseram uma técnica de determinação da deltametrina em solo e estudaram os níveis de exposição da população, através de análises de sangue humano.

De maneira geral, os piretróides têm uma meia-vida curta no ambiente e seus produtos de degradação são resultantes de hidrólise do grupo éster e oxidação em vários locais na molécula. No solo, os piretróides podem ser degradados por processos biológicos ou fotoquímicos, sendo os processos biológicos os mais importantes. Quando no solo, os piretróides são adsorvidos fortemente pelas partículas coloidais, permanecendo na fração argila e na matéria orgânica (WHO, 1990c).

Os resíduos de piretróides também têm sido monitorados em amostras de alimentos, como: trigo, milho e milho de pipoca (TREVIZAN, 1998), em grãos de trigo e em seus produtos processados (TREVIZAN & BAPTISTA, 2000), óleo de oliva (RIZOS et al., 2001), chá (TSUMURA et al., 1994), leite e derivados (VENANT et al., 1990; MUCCIO et al., 1997; GOULART, 2004), repolho, couve-flor e tomates (GUPTA et al., 1998), espinafre e laranja (OBANA et al., 2001) e ainda em lixo orgânico de diversas frutas e vegetais (TAUBE, et al., 2002).

Em razão da utilização em larga escala desses inseticidas em diferentes situações é de se imaginar a contaminação do ambiente e de alimentos pelos mesmos. Mesmo tendo uma meia-vida relativamente curta, essa preocupação permanece. Como pode ser observado na literatura, inúmeras são as publicações envolvendo análise e monitoramento desses resíduos em diferentes matrizes.

Em 2001, COLUMÉ e colaboradores investigaram a presença de dezessete piretróides em amostras de ameixa, laranja, maçã, morango, pêra, kiwi, tomate, espinafre, couve-flor e pimenta. ZROSTLÍKOVÁ e colaboradores (2003), determinaram resíduos de vinte pesticidas, como deltametrina e permetrina em maçã e pêssego.

Segundo RITTER (1990), que realizou uma revisão sobre a contaminação de águas subterrâneas nos Estados Unidos (país que mais utiliza pesticidas em todo o mundo), mais de setenta tipos diferentes de pesticidas já foram detectados em águas de lençóis freáticos de 38 estados até 1990.

Na Espanha, GUTIÉRREZ e colaboradores (1998) determinaram simultaneamente resíduos de endosulfan e dos piretróides: bifentrina, cipermetrina, fenvalerato, deltametrina e permetrina, em amostras de água do mar, subterrâneas e de consumo. COLY & AARON (1998) determinaram simultaneamente cinco resíduos de piretróides em água.

No Brasil, são encontrados alguns trabalhos de monitoramento de resíduos de piretróides em águas (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001; DORES & FREIRE, 2001; PINHEIRO & DÓREA, 2004), solos (PERES et al., 2002; LEE et al., 2002; REICHENBERGER et al., 2002) e alimentos (GOULART, 2004; BISSACOT & VASSILIEFF, 1997a,b).

1.1.1. Presença de resíduos de pesticidas na água

A preocupação com a contaminação de sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos por pesticidas tem crescido no meio científico. A concentração da maioria dos pesticidas em água é baixa, em parte pelo fato de serem geralmente pouco solúveis em água e pelo efeito de diluição. Isto, no entanto, não exclui a possibilidade de que concentrações muito altas venham a ocorrer depois de pesadas chuvas, especialmente quando as áreas ao redor de um pequeno córrego tenham sido recentemente tratadas com altas doses de pesticidas. Mesmo em concentrações baixas, os pesticidas representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos que podem concentrar estes produtos até 1000 vezes (DORES & FREIRE, 2001).

A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos aumenta, principalmente, quando a água é usada para o consumo humano. No Brasil, a portaria nº 1.469/2000, de 29 de dezembro de 2000, estabelece o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2001). Essa portaria estabelece valores máximos permitidos de alguns tipos de contaminantes em águas, dentre estes, estão alguns pesticidas, como os organoclorados e o piretróide permetrina, cujo valor máximo permitido é $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, esta legislação não contempla outros pesticidas piretróides em uso atualmente, como por exemplo: deltametrina, cipermetrina e λ -cialotrina.

A qualidade da água, recurso natural nobre e que deve absorver grande parte das preocupações desse século, deve ser monitorada constantemente. Para isso, necessita-se de metodologias analíticas rápidas e eficientes para análise multirresíduo de pesticidas em água das mais diversas origens.

1.1.2. Presença de resíduos de pesticidas no solo

No transcorrer do período que compreende desde a semeadura até a colheita e o armazenamento, são empregados diversos tipos de pesticidas. Se de um lado esses produtos permitem o controle de pragas e aumento da produtividade no campo, por outro causam problemas na saúde humana e do planeta. O Brasil desponta como o maior produtor de pesticidas da América

Latina e o terceiro maior do mundo e estima-se que na aplicação de pesticidas, cerca de 30% a 50% não atinge o seu destino, perdendo-se no ambiente, (PINHEIRO & DÓREA, 2004).

O solo é o compartimento do ecossistema considerado mais complexo e que apresenta maior probabilidade de acumulação de pesticidas ou outros produtos. Os resíduos de pesticidas ou de outros subprodutos da atividade humana podem interagir com a fase sólida, líquida e gasosa do solo. Nessa interação ocorrem diferentes processos que envolvem transformações químicas, físicas e biológicas. Como consequência pode-se detectar no solo, a persistência desses compostos, o desaparecimento dos mesmos e o aparecimento de seus produtos de degradação mais ou menos tóxicos que o produto original. No caso dos pesticidas, essas informações irão determinar a sua utilidade ou os efeitos prejudiciais causados pela persistência maior do que seria necessária para o controle.

A movimentação de pesticidas no solo é dependente de vários fatores como sua estrutura e composição mineralógica. A solubilidade em água e a adsorção às partículas do solo são essenciais para determinar a tendência de determinada substância para se movimentar, ou não, através do solo.

Os pesticidas mais polares são mais solúveis em água constituindo um perigo maior para os ecossistemas aquáticos. Por outro lado, a maioria dos pesticidas que têm pouca solubilidade na água, como os piretróides, têm tendência de se ligarem fortemente ao solo, diminuindo a sua movimentação e aumentando a sua estabilidade (LEE et al., 2002). Além dessas características do solo, outras como a intensidade das chuvas, as práticas de irrigação, temperatura, características da água (pH, profundidade, quantidade de partículas suspensas e outros compostos químicos dissolvidos) podem também afetar a movimentação de pesticidas no ambiente.

Nos últimos anos a demanda de monitoramento de contaminantes no meio ambiente tem aumentado significativamente, levando ao desenvolvimento e otimização de diversas técnicas analíticas de extração, determinação e quantificação. Os pesticidas são usados indiscriminadamente e na maioria das vezes deixam resíduos nas mais diferentes matrizes. Para sua quantificação é necessário o desenvolvimento de técnicas de extração e purificação que sejam eficientes, seletivas e sensíveis.

1.2. Técnicas de análise

Várias técnicas têm sido utilizadas para determinação e quantificação dos resíduos de piretróides em amostras ambientais. Dentre elas destaca-se a cromatografia gasosa (CG) acoplada a um detector seletivo de captura de elétrons (DCE) (HOUSE & OU, 1992; CHEN & WANG, 1996; HENGEL et al., 1997) ou acoplada ao detector de massas no modo de seleção de íons (ZROSTLÍKOVÁ et al., 2003; ŠTAJNBAHER, & KRALJ, 2003; RAMESH & RAVI, 2004) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), acoplada a um detector ultravioleta (UV) (BISSACOT & VASSILIEFF, 1997a). Estas técnicas baseiam-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa ou líquida) (COLLINS, 1997).

A cromatografia gasosa é o principal método para determinação de resíduos de pesticidas piretróides. Apesar de existirem vários sistemas de detecção, a presença de um ou mais halogênios na molécula dos piretróides faz com que o detector por captura de elétrons seja o mais adequado nas análises quantitativas (CHEN & WANG, 1996). A detecção de piretróides, usando esse tipo de detector, apresenta uma boa resposta, sendo possível um limite de detecção da ordem de 1,0 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001).

O detector de espectrometria de massa no modo de seleção de íons é importante na análise qualitativa de resíduos de pesticidas, permitindo a obtenção de informações estruturais baseadas na fragmentação do composto em diversos íons (LANÇAS, 1993). Este detector também tem sido utilizado para análises quantitativas de piretróides, com um limite de detecção de 0,05 a 2,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ (RAMESH & RAVI, 2004).

1.3. Técnicas de extração e purificação

Nos últimos anos, o aumento contínuo da utilização de insumos agrícolas, como fertilizantes e pesticidas, tem se tornado um motivo de preocupação devido principalmente à poluição dos solos, das águas e dos alimentos. Este tipo de poluição apresenta um caráter particular, pois pode contaminar tanto os alimentos como extensas áreas agrícolas e também as águas superficiais e subterrâneas. Dessa forma, o uso indiscriminado de pesticidas, como os piretróides podem afetar drasticamente o equilíbrio do meio, requerendo seu monitoramento, através de análises de seus resíduos em diversas fontes.

Análises multirresíduo de pesticidas em amostras ambientais, de alimentos e humanas têm sido realizadas em diversos laboratórios em todo o mundo por aproximadamente 40 anos. Entretanto, a maioria dos métodos utilizados estão longe do ideal. Alguns laboratórios de monitoramento de resíduos ainda utilizam métodos desenvolvidos há 30 anos, quando não tinham uma demanda tão grande de análise e as tecnologias não estavam tão desenvolvidas como nos dias atuais (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004).

Segundo ANASTASSIADES e colaboradores (2003), o primeiro método multirresíduo para extração e análise de inseticidas foi desenvolvido por Mills em 1963. Com este método, inseticidas organoclorados foram extraídos de amostras de alimentos utilizando os solventes acetonitrila e água, e partição pela adição de solventes apolares, como o éter de petróleo. Entretanto, a baixa extração de inseticidas de polaridade intermediária, como os piretróides, pode ser citada como uma das desvantagens da etapa de partição por adição de solventes.

Os métodos desenvolvidos nos anos seguintes ainda utilizavam solventes apolares, principalmente diclorometano e éter de petróleo. A partir da década de 80, as preocupações relacionadas com a saúde humana e o ambiente, levaram ao desenvolvimento de novas técnicas, nas quais o consumo de solventes foi reduzido, sendo os solventes clorados evitados (ANASTASSIADES et al., 2003).

Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas de extração e purificação de resíduos com uma demanda menor de solventes como a extração em fase sólida (HENGEL et al., 1997; ŠTAJNBAHER & KRALJ, 2003; PINHEIRO & DÓREA, 2004) e a microextração em fase sólida (KOMATSU & VAZ, 2004).

Também são encontradas na literatura várias referências com aplicação da técnica de extração em fase sólida (ANGERER & RITTER, 1997; PINHEIRO & DÓREA, 2004) e microextração em fase sólida na extração de resíduos de piretróides (BARRIONUEVO & LANÇAS, 2001).

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, pois não exige instrumentação sofisticada, e de fácil execução. Assim, nos últimos anos vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de otimizar e minimizar o consumo de solventes utilizados nesta técnica.

Em 1998, GUPTA e colaboradores, estudaram os piretróides deltametrina, ciflutrina, λ -cialotrina e fluvalinato em amostras fortificadas de repolho, couve-flor e tomates utilizando acetona e hexano para extração líquido-líquido e posterior identificação por cromatografia em camada delgada.

A extração de piretróides pela extração líquido-líquido em amostras de óleo de oliva (RIZOS et al., 2001), de águas (VIÑAS et al., 2002) e multirresíduo de pesticidas em frutas e vegetais (ANASTASSIADES et al., 2003), também demonstram a eficiência dessa técnica.

Em 2004, GOULART desenvolveu uma metodologia simples e de baixo custo, para análise de deltametrina e cipermetrina em leite. No método chamado: extração e purificação por precipitação a baixa temperatura, os piretróides foram extraídos de 20,0 mL de leite fortificado, com 40,0 mL de acetonitrila, seguido de agitação e congelamento a -20 °C por 12 horas. A análise foi feita por cromatografia gasosa utilizando o detector por captura de elétrons. Segundo GOULART (2004), a taxa de recuperação do método foi de 93 % para cipermetrina e 84 % para deltametrina, comprovando que essa técnica mostrou-se simples e eficiente, com um menor consumo de solvente.

MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, em 2004, avaliaram a conveniência de seis solventes orgânicos: acetonitrila, acetato de etila e acetona para extração de

pesticidas, e hexano, tolueno e isooctano para análise por CG. Segundo esses pesquisadores, um solvente ideal a ser empregado numa metodologia de determinação multirresíduo de pesticidas deve ser compatível com analitos, a preparação da amostra e a análise cromatográfica.

Basicamente, esses três pré-requisitos significam que todos os analitos de interesse devem ser suficientemente solúveis e estáveis nesse solvente. Esse mesmo solvente deve ser usado nas etapas de extração e purificação, evitando troca de solventes. Em relação à análise cromatográfica, as propriedades físico-químicas do solvente não devem interferir na separação e permitir a detecção dos picos. Outras características relevantes dos solventes são: baixa toxicidade e inflamabilidade, baixo custo e pequeno risco ambiental.

ANASTASSIADES e colaboradores (2003) afirmam que na escolha do solvente mais adequado para a extração líquido-líquido em fase única, devem ser considerados aspectos como a miscibilidade em água e a seletividade do solvente. A miscibilidade em água está diretamente relacionada com a maior habilidade de formação de fase única e posterior formação de duas fases, seja pela adição de sais, solventes apolares, ou por abaixamento de temperatura. A seletividade está relacionada com a maior afinidade dos componentes de interesse pela fase orgânica em relação à fase aquosa e à habilidade de evitar componentes interferentes da matriz no extrato final.

Os solventes mais utilizados na extração multirresíduo são: acetonitrila, acetato de etila e acetona, (Tabela 01) cada um com suas vantagens e desvantagens. Em comparação com acetato de etila e acetona, a acetonitrila extrai menor quantidade de gorduras e pigmentos e também possui compatibilidade com a CG (ANASTASSIADES et al., 2003). Acetonitrila e acetona apresentam como vantagem a miscibilidade em água, permitindo a formação de fase única, enquanto o acetato de etila é parcialmente miscível (OBANA et al., 2001).

Além da adição de solventes apolares (CHEN & WANG, 1996) ou de adição de sais (ANASTASSIADES et al., 2003; MATKOVICH & CHRISTIAN, 1973) para induzir à separação das fases orgânica e aquosa, o abaixamento de temperatura pode ser utilizado. Para ser utilizado na extração por partição em baixa temperatura, o solvente deve apresentar algumas características, como: miscibilidade em água, densidade inferior a da água e apresentar-se líquido à

temperatura de -20 °C. Assim, tanto acetonitrila como a acetona podem ser usadas. Entretanto, o uso da acetona durante a extração requer a troca por outro solvente, compatível com a análise cromatográfica. Logo, a acetonitrila é o solvente mais adequado, permitindo a formação de uma fase única durante a extração. Na etapa de partição a -20 °C, a água torna-se sólida na parte inferior do recipiente utilizado e a acetonitrila contendo os resíduos de pesticidas extraídos permanecem na parte superior, necessitando apenas da retirada da fase orgânica líquida.

Tabela 01. Propriedades físico-químicas de alguns solventes.

	Acetato de etila	Acetona	Acetonitrila
Densidade (kg L ⁻¹)	0,90	0,79	0,78
Temperatura de fusão (°C)	-83	-95	-46
Temperatura de ebulição (°C)	77	56	81
Miscibilidade em água (g L ⁻¹)	80	Sem limite	Sem limite

Métodos de extração em fase única que utilizam acetonitrila e partição pela adição de solventes apolares são encontrados na literatura (CHEN & WANG, 1996; LEGGETT et al., 1990). Entretanto, a partição em baixa temperatura, além da vantagem de menor consumo de solventes, não aumenta o volume dos extratos reduzindo ou evitando etapas de evaporação e troca de solventes.

MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY (2004) ordenaram estes solventes de acordo com a conveniência, sendo: acetonitrila > acetato de etila > acetona. Em termos de custo, a acetonitrila é 1,4 e 1,7 vezes mais cara que a acetona e o acetato de etila em graus similares, respectivamente.

Nesse trabalho, foram otimizados e validados dois métodos utilizando as técnicas de extração líquido-líquido e extração sólido-líquido, por partição em baixa temperatura (ELL-PBT e ESL-PBT, respectivamente) para determinar simultaneamente os piretróides cipermetrina, deltametrina, λ-cialotrina e permetrina em água e solo. As técnicas otimizadas e validadas foram aplicadas para avaliar a persistência dos pesticidas na água e no solo durante 80 dias e ainda determinar o efeito de matriz na ELL-PBT.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparo de soluções e amostras

Com o objetivo de desenvolver, otimizar e validar uma nova técnica de extração multirresíduo de quatro piretróides sintéticos: λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina, em água e solo, foram preparadas amostras de água e solo fortificadas pela adição de quantidades conhecidas de padrões destes compostos.

2.1.1. Soluções padrão de piretróides

As soluções empregadas neste trabalho foram preparadas a partir de padrões de λ -cialotrina (86,5 % m/m – Syngenta), permetrina (92,2 % m/m – Syngenta), cipermetrina (92,4 % m/m – Chem Service) e deltametrina (99,0 % m/m – Chem Service), utilizando como solvente acetonitrila (Mallinckrodt/HPLC). Uma solução estoque de 500,0 mg L⁻¹ foi preparada para cada padrão. A partir da diluição das soluções estoque, foi preparada uma solução padrão contendo os quatro piretróides na concentração de 100,0 mg L⁻¹. A solução de trabalho desses piretróides na concentração de 20,0 mg L⁻¹ foi preparada pela diluição da solução anterior.

A solução de trabalho contendo 20,0 mg L⁻¹ de bifentrina (92,2 % m/m – FMC do Brasil), utilizada como padrão interno, foi preparada da mesma maneira pela qual foi preparada a solução de trabalho de 20,0 mg L⁻¹ contendo os quatro piretróides.

2.1.2. Preparo de amostras de água fortificadas

Fortificar uma amostra significa contaminar a mesma com uma quantidade conhecida de um determinado padrão. Neste estudo, amostras de 4,00 mL de água destilada foram fortificadas com 200 μL da solução de trabalho contendo os quatro piretróides na concentração de 20,0 mg L^{-1} para obter uma solução de concentração igual a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.1.3. Amostra de solo

O solo utilizado neste estudo foi coletado na estação experimental do viveiro de café da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG. A área foi escolhida por não ter histórico de aplicação de piretróides em suas lavouras.

Após a retirada da cobertura vegetal, a amostra de solo, um Latossolo Vermelho-amarelo, foi coletada entre 0 e 5 cm de profundidade. A amostra de solo foi seca ao ar e passada numa peneira de 2 mm de abertura.

2.1.3.1. Caracterização da amostra de solo

Para um melhor conhecimento das características do solo, a amostra coletada foi submetida a análises físico-químicas (pH, matéria orgânica e CTC) e texturais (silte, areia fina, areia grossa e argila) nos Laboratórios de Rotina e de Física do Solo do Departamento de Solos da UFV, seguindo as técnicas propostas pela EMBRAPA (1979).

2.1.3.2. Preparo de amostras de solo fortificadas

O solo foi triturado em gral de ágata e passado em peneira com malha de 1 mm de abertura. Amostras de 1,000 g de solo foram fortificadas com 200 μL da solução de trabalho contendo os quatro piretróides na concentração de 20,0 mg L^{-1} , a fim de se obter no solo uma concentração de 4,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cada piretróide. A mistura foi seca ao ar e posteriormente foi submetida aos processos de extração.

2.2. Otimização das técnicas de extração ELL-PBT e ESL-PBT

As técnicas ELL-PBT e ESL-PBT foram otimizadas para extração dos piretróides λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina em água e solo, sendo realizados alguns testes utilizando amostra de água e solo fortificadas pela adição de quantidades conhecidas destes compostos. Após extração dos piretróides, as concentrações desses analitos foram determinadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC – 17A). Os testes realizados na otimização são descritos nos itens a seguir.

2.2.1. Planejamento fatorial

O planejamento fatorial é uma das formas mais eficientes para avaliar a influência de vários fatores nas respostas estudadas utilizando poucos experimentos (BARROS NETO et al., 2001).

Para a ELL-PBT dos quatro piretróides em água, foi feito um experimento obedecendo a um planejamento fatorial completo 2^3 para estudar o comportamento simultâneo de três fatores: (1) a proporção entre o volume de água e acetonitrila, (2) força iônica da solução aquosa e (3) tempo de extração. Os três fatores foram estudados em dois níveis (Tabela 02).

Tabela 02. Planejamento fatorial 2^3 para as amostras de água fortificadas.

Ensaio	Fatores codificados			Fatores originais		
	F(1)	F(2)	F(3)	(1) Proporção H ₂ O:CH ₃ CN	(2) Força iônica Na ⁺ (mol 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

Como o experimento em questão envolve 3 fatores com dois níveis cada um, ele é do tipo 2^3 e requer 8 ensaios. Em cada ensaio foram feitas duas repetições totalizando 16 ensaios.

Os sinais empregados (-) e (+) indicam os níveis mínimos e máximos dos fatores em cada ensaio. As respostas usadas para avaliar os efeitos dos fatores neste experimento foram as porcentagens de recuperação obtidas para cada um dos piretróides após extração nas amostras de água e solo.

2.2.1.1. Extração dos piretróides em água

Os ensaios foram realizados da seguinte maneira:

Em frasco de vidro transparente com tampa e septo de teflon, de 22 mL de capacidade foram adicionados 4,00 mL de água fortificada (concentração $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, item 2.1.2) com força iônica obedecendo aos níveis de concentração do planejamento (Tabela 02). Foram adicionados volumes de 4,00 mL ou 8,00 mL de acetonitrila, correspondentes aos níveis (-) e (+), respectivamente (Tabela 02). Essa solução foi mantida sob agitação mecânica, em mesa agitadora (Tecnal TE – 420), por 15 ou 30 minutos correspondentes aos níveis (-) e (+), respectivamente (Tabela 02), a 28°C e a 175 oscilações por minuto (opm).

Essas amostras foram deixadas em freezer a aproximadamente -20°C por 12 horas. 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 5,00 mL de 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.

A força iônica da solução aquosa, fortificada com os piretróides, nos níveis estabelecidos foi obtida por solubilização de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Nuclear – P.A.) em quantidades adequadas.

2.2.1.2. Extração dos piretróides em solo

Para a ESL-PBT dos quatro piretróides em solo, foi realizado um experimento obedecendo a um planejamento fatorial completo 2^3 semelhante

ao planejamento realizado para as amostras de água (Tabela 02), sendo estudados os mesmos fatores. Entretanto, o estudo do tempo de agitação foi realizado em níveis diferentes, de 30 e 60 minutos, correspondendo aos níveis (-) e (+), respectivamente.

Em amostra de solo previamente fortificada com os piretróides (item 2.1.3.2), de massa igual a 1,000 g, foram adicionados 4,00 mL de água (contendo íon sódio) e 4,00 ou 8,00 mL de acetonitrila, obedecendo aos níveis da Tabela 02. Em seguida as amostras foram agitadas durante 30 ou 60 minutos, a 175 rpm e 28 °C. As etapas seguintes, como o congelamento e a passagem por um papel de filtro com sulfato de sódio anidro, foram as mesmas utilizadas para as amostras de água, item 2.2.1.1.

2.2.2. Avaliação da razão água:acetonitrila na eficiência de extração de piretróides no solo

A partir dos resultados obtidos do experimento, foi estudada a influência de outras proporções de água e acetonitrila (Tabela 03) na taxa de recuperação dos piretróides em solo. Foram realizados testes para obtenção da proporção ideal entre o volume de água e o volume do solvente acetonitrila, que proporcionasse melhor porcentagem de extração dos princípios ativos.

Tabela 03. Proporções de volumes entre água e acetonitrila na mistura de solventes usada como extratora dos piretróides em solo.

Proporção	Volume de água (mL)	Volume de acetonitrila (mL)
1:8	1,33	10,67
2:8	2,40	9,60
3:8	3,27	8,73
4:8	4,00	8,00
5:8	4,61	7,39
6:8	5,14	6,86

As amostras de solo utilizadas nos testes foram previamente fortificadas com os piretróides de acordo com o item 2.1.3.2, sendo utilizado tempo de agitação de 30 minutos e força iônica da solução aquosa de $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ em sódio. As proporções volume:volume estudadas entre água e acetonitrila encontram-se dispostas na Tabela 03.

Após a adição da mistura extratora às amostras de solo, o conjunto foi agitado por 30 minutos. As etapas seguintes, como o congelamento e a passagem por um papel de filtro com sulfato de sódio anidro, foram as mesmas utilizadas para as amostras de água, item 2.2.1.1.

2.2.3. Efeito da adição de metanol na porcentagem de extração dos piretróides em água pela técnica ELL-PBT

Durante os estudos de otimização da técnica ELL-PBT, a eficiência da extração dos piretróides na água também foi avaliada pela adição de metanol na mistura extratora.

Este experimento foi realizado com 4,00 mL de água fortificada com piretróides, como descrito no item 2.1.2. A força iônica da solução foi ajustada com adição de $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ de forma a obter uma solução com força iônica de $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ do íon sódio. Estas amostras foram extraídas com 8,00 mL da mistura de acetonitrila e metanol (Mallinckrodt – grau pesticida) de acordo com a Tabela 04.

Tabela 04. Volumes adicionados de metanol e acetonitrila na extração de piretróides na água.

Metanol (mL)	Acetonitrila (mL)
0,20	7,80
0,50	7,50

As amostras foram mantidas sob agitação por 15 minutos a 175 opm e colocadas em freezer a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas. Posteriormente, os extratos foram tratados seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras de água no item 2.2.1.1.

2.2.4. Efeito da adição de acetato de etila na porcentagem de extração dos piretróides em água e solo pelas técnicas ELL-PBT e ESL-PBT

Para ELL-PBT dos quatro piretróides na água, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 2.2.3, entretanto, ao invés de metanol, foi utilizado acetato de etila (Nuclear – P.A.) nos volumes apresentados na Tabela 05.

Para ESL-PBT dos piretróides no solo foram utilizados os mesmos volumes da mistura de acetato de etila e acetonitrila da água (Tabela 05), sendo realizado o mesmo procedimento de preparo de amostra, agitação, congelamento, passagem por um papel de filtro com sulfato de sódio anidro e armazenamento, descrito no item 2.2.2.

Tabela 05. Volumes adicionados de acetato de etila e acetonitrila na extração de piretróides na água e no solo.

Acetato de etila (mL)	Acetonitrila (mL)
0,20	7,80
0,50	7,50
1,00	7,00
1,50	6,50

2.2.5. Efeito do tempo de congelamento na eficiência da ELL-PBT e da ESL-PBT

Nas técnicas de extração por partição em baixa temperatura, o tempo de congelamento da amostra pode influenciar de maneira significativa a porcentagem de extração dos compostos de interesse. Por isso neste trabalho, avaliou-se este parâmetro realizando-se extrações dos piretróides de amostras de água e solo.

Um volume de 4,00 mL de água fortificada ($1000,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada piretróide e contendo $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ de íon sódio), foi extraído com 6,50 mL de acetonitrila e 1,50 mL de acetato de etila, seguido de agitação por 15 minutos.

As amostras de solo fortificadas com $4,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada piretróide, foram extraídas com 7,80 mL de acetonitrila, 0,20 mL de acetato de etila e 4,00 mL de água (contendo $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ de íon sódio), e agitadas por 30 minutos.

Em ambas extrações, as amostras foram deixadas em freezer durante 6, 12 e 24 horas, a aproximadamente $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o prazo estabelecido, as amostras foram passadas por um papel de filtro com sulfato de sódio anidro, sendo o papel de filtro previamente lavado com 5,00 mL de acetonitrila. Os extratos foram recuperados em frascos de 8,00 mL de capacidade e armazenados em freezer até o momento da determinação por cromatografia gasosa.

2.3. Análise cromatográfica

A identificação e quantificação dos extratos de piretróides foram realizadas em um cromatógrafo a gás com um detector por captura de elétrons. O estabelecimento das condições ideais de análise como temperatura da coluna, do injetor e do detector, vazão dos gases e escolha do tipo de coluna cromatográfica, foi realizado visando boa separação entre os picos dos compostos de interesse e menor tempo de análise.

As condições analíticas determinadas foram as seguintes:

- Coluna capilar Agilent Technologies HP-5 com fase estacionária composta de 5 % de fenil e 95 % de dimetilpolisiloxano, 30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e $0,1 \mu\text{m}$ de espessura de filme.
- Programação da coluna: $220 \text{ }^\circ\text{C} \xrightarrow{10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}} 280 \text{ }^\circ\text{C}$ (2 min)
- Tempo total de análise: 8 minutos
- Temperatura do injetor: $280 \text{ }^\circ\text{C}$
- Temperatura do detector: $300 \text{ }^\circ\text{C}$
- Volume injetado: $1,0 \mu\text{L}$
- Gás de arraste: Nitrogênio
- Vazão do gás de arraste: $1,2 \text{ mL min}^{-1}$
- Divisão de fluxo: 1:5

2.3.1. Curva analítica (método da padronização interna)

As concentrações dos piretróides λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina nos extratos foram determinadas pelo método do padrão interno.

Foram preparadas soluções padrão de concentrações crescentes dos analitos (10; 25; 50; 125; 250; 375; 500; 625 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$), às quais foi adicionada a mesma quantidade conhecida de bifentrina (500 $\mu\text{g L}^{-1}$), utilizada como padrão interno (PI). Após análise dessas soluções, foi construído um gráfico relacionando a razão de áreas (área do analito / área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração (variada) dos analitos. Foram obtidas por regressão linear, as equações das retas que permitiram calcular as concentrações dos analitos nas amostras.

As amostras também foram analisadas após a adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno. Através da razão de áreas obtidas no cromatograma tem-se a concentração da substância na amostra.

2.4. Validação do método analítico

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento (RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros de desempenho analítico normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

Para as análises de λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina nas amostras de água (ELL-PBT) e solo (ESL-PBT) propõe-se as seguintes metodologias otimizadas:

Água: Extração de 4,00 mL de água, previamente fortificada (1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada piretróide e contendo 0,020 mol L^{-1} de íon sódio), com 6,50 mL de acetonitrila e 1,50 mL de acetato de etila, seguida de agitação por 15 minutos.

Solo: Amostras de solo fortificadas com $4,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada piretróide, foram extraídas com 7,80 mL de acetonitrila, 0,20 mL de acetato de etila e 4,00 mL de água (contendo $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ de íon sódio), e agitadas por 30 minutos.

Após agitação as amostras de água e solo são deixadas em freezer a aproximadamente $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ por 6 horas. Após o prazo estabelecido, as amostras são passadas por um papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, previamente lavado com 5,00 mL de acetonitrila. Os extratos são recuperados em frascos de 8,00 mL de capacidade e armazenados em freezer até o momento da determinação por cromatografia gasosa.

A validação dos métodos foi feita baseando-se nas recomendações da Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas (GARP, 1999), Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003), LANÇAS (2004) e RIBANI e colaboradores (2004).

2.4.1. Seletividade

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental de separação. A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas dos extratos obtidos após extração das matrizes de água e solo isentas dos piretróides λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina com os cromatogramas dos extratos de matrizes de água e solo fortificadas e analisadas conforme o procedimento otimizado descrito no item 2.4.

2.4.2. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para cada um dos piretróides foram determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004). O LD pode ser calculado como:

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

Onde:

s = estimativa do coeficiente linear da curva analítica.

S = inclinação ou coeficiente angular da curva analítica.

Para o cálculo do LQ, foram adotados critérios semelhantes ao LD, ou seja:

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

Para este cálculo, uma curva analítica foi feita utilizando soluções padrão contendo estes piretróides em concentrações decrescentes (12, 10, 8, 6, 4 e 2 $\mu\text{g L}^{-1}$) e próximas ao limite de detecção.

2.4.3. Linearidade de resposta do detector

A linearidade de resposta do detector foi determinada pela injeção dos padrões em acetonitrila dos piretróides em concentrações crescentes: 10, 25, 50, 125, 250, 375, 500, 625 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$. Após a análise cromatográfica, foram construídas curvas analíticas, relacionando as áreas dos picos dos padrões com as concentrações dos produtos estudados, conforme o procedimento descrito no item 2.3.1. A linearidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação, obtido por regressão linear.

2.4.4. Precisão

A precisão dos métodos de ELL-PBT e ESL-PBT e análise por cromatografia gasosa foi avaliada sob condições de repetitividade e precisão intermediária.

2.4.4.1. Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas por um mesmo método sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições e em um curto intervalo de tempo (LANÇAS, 2004).

As repetitividades dos métodos ELL-PBT e ESL-PBT dos quatro piretróides estudados em água e solo foram determinadas realizando-se extrações dos piretróides de amostras de água e solo fortificadas (itens 2.1.2 e 2.1.3.2, respectivamente) seguindo o procedimento descrito no item 2.4, com

sete repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV), (RIBANI et al., 2004).

2.4.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito de variações dentro do mesmo laboratório, devido a diferentes eventos como diferentes dias, equipamentos ou analistas. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004).

A precisão intermediária foi determinada pelo cálculo da porcentagem de recuperação e do coeficiente de variação. Para tal, foi realizado o mesmo procedimento descrito no item 2.4.4.1 sendo feita em triplicatas e em três dias diferentes (1^o, 7^o e 30^o dia).

2.4.5. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (LANÇAS, 2004). Entre os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método, pode-se citar: ensaios de recuperação e a comparação de métodos.

2.4.5.1. Ensaio de recuperação

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada (RIBANI et al., 2004).

Os ensaios de recuperação foram feitos extraíndo-se os compostos em estudo, presentes em matrizes de água e solo fortificadas pela adição de 8,0; 16,0 e 80,0 μL da solução de trabalho contendo os quatro piretróides na concentração de 20,0 mg L^{-1} e foram extraídas segundo o procedimento descrito no item 2.4.

2.4.5.2. Comparação de métodos

Consiste na comparação de resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados conseguidos por métodos de referência, avaliando-se o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos métodos. Os resultados obtidos através do procedimento 2.2.5 foram comparados aos resultados obtidos por métodos de extração líquido-líquido conforme descrito a seguir:

Método 1:

Essa metodologia foi utilizada por VIÑAS et al., em 2002, para extração de pesticidas na água. Foi realizada uma extração líquido-líquido de 25,0 mL de água, previamente fortificada e contendo 10% de NaCl (Isofar – P.A.), com 125,0 mL de acetato de etila, em um funil de separação, seguida de agitação por 10 minutos. Posteriormente, a fase orgânica foi separada da aquosa e o funil de separação foi lavado com 10,00 mL de acetato de etila. As fases em acetato de etila foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório (Fisatom) e recuperadas em 8,00 mL de acetonitrila.

Método 2:

VIÑAS et al., em 2002, propuseram também um outro processo para extração líquido-líquido de pesticidas na água. O procedimento realizado incluiu a extração de 100,0 mL de água, previamente fortificada e contendo 10% de NaCl, com 10,00 mL de diclorometano (Isofar – P.A.), em um funil de separação, seguida de agitação por 5 minutos. Posteriormente, a fase orgânica foi separada da aquosa e o funil de separação foi lavado com 10,00 mL de diclorometano. As fases em diclorometano foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório e recuperadas em 8,00 mL de acetonitrila.

Todas as extrações avaliadas foram realizadas em triplicatas. Os extratos foram transferidos para frascos de amostras e armazenados em freezer até o momento da análise cromatográfica.

2.5. Estudo da persistência dos piretróides deltametrina, cipermetrina, permetrina e λ -cialotrina na água e no solo

No presente estudo, foi determinada a persistência dos piretróides em água e solo.

Para o estudo da persistência dos quatro piretróides estudados na água, foram preparados 500,0 mL de solução aquosa contendo 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada piretróide. Essa mistura foi mantida sob condições ambientais, 25 - 35 °C aproximadamente, durante 80 dias. Nas datas previstas (1^o, 5^o, 10^o, 15^o, 20^o, 40^o, 50^o, 60^o e 80^o dia), 4,00 mL dessa solução foram retirados e os compostos estudados foram extraídos pelo processo de ELL-PBT otimizado, conforme descrito no item 2.4 e analisados por CG-DCE.

Na determinação da persistência dos quatro piretróides estudados em solo, amostras de solo foram fortificadas com 200,0 μL da solução de trabalho contendo λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina, 20,0 mg L^{-1} , a fim de se obter no solo uma concentração de 4,0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cada piretróide. As amostras foram mantidas úmidas, ao abrigo da luz e em recipiente aberto, sob condições ambientais, aproximadamente 25 - 35 °C, durante 80 dias. Nas datas previstas (1^o, 5^o, 10^o, 15^o, 20^o, 30^o, 40^o, 50^o, 60^o e 80^o dia) os piretróides foram extraídos por ESL-PBT (procedimento 2.4) e analisados por CG-DCE.

Os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.6. Determinação dos piretróides deltametrina, cipermetrina, permetrina e λ -cialotrina em água do Ribeirão São Bartolomeu

A técnica de ELL-PBT para determinação dos piretróides deltametrina, cipermetrina, permetrina e λ -cialotrina, foi aplicada em três amostras de água coletadas em pontos diferentes.

1ª Amostra: Água do Ribeirão São Bartolomeu, coletada próximo ao Departamento de Engenharia Agrícola, no campus da Universidade Federal de Viçosa – UFV. Neste local a água é captada para tratamento na Estação de Tratamento de Água, ETA – UFV.

2ª Amostra: Água tratada coletada na Vila Gianetti, localizada no campus da UFV.

3ª Amostra: Água do Ribeirão São Bartolomeu, coletada na região da Barrinha. Neste ponto o Ribeirão já recebeu todo o esgoto descartado na região urbana de Viçosa – MG.

As amostras de água foram coletadas em frascos de borossilicato e transportadas para o laboratório. Alíquotas de 4,00 mL foram retiradas e submetidas ao processo de ELL-PBT, conforme descrito no item 2.4 e analisadas por CG-DCE, seguindo as condições descritas no item 2.3.

Os experimentos foram realizados em triplicatas.

2.6.1. Avaliação do efeito da matriz na porcentagem de recuperação de extração dos piretróides

O efeito de matriz na porcentagem de extração dos piretróides em água foi avaliado usando a técnica ELL-PBT em amostras de água coletadas, item 2.6, fortificadas. Para tal, um volume de 4,00 mL dessas amostras coletadas foi fortificado, como descrito no item 2.1.2, e submetido ao procedimento de extração conforme descrito no item 2.4.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das amostras de água e de solo

A água usada nos experimentos de otimização e validação foi destilada, não contendo nenhuma outra espécie que pudesse ser detectada na análise cromatográfica.

As amostras de água coletadas no Ribeirão São Bartolomeu apresentaram um aspecto turvo, não sendo realizado nenhum tratamento dessas amostras antes da etapa de extração. A amostra de água tratada era límpida e não apresentou nenhum material em suspensão.

A amostra de solo utilizada nesse trabalho tem características químicas e texturais semelhantes aos solos da região da Zona da Mata Mineira (Tabela 06). São solos bastante intemperizados e relativamente pobres em nutrientes.

Tabela 06. Algumas características químicas e texturais do solo.

Características	Valores
pH em H ₂ O (1:2,5)	6,20
Matéria orgânica (%)	2,10
CTC* (cmol _c dm ³)	8,02
Silte (%)	7,00
Areia fina (%)	16,00
Areia grossa (%)	29,00
Argila (%)	48,00

*CTC = Capacidade de troca catiônica

3.2. Análise cromatográfica

A quantificação por cromatografia gasosa dos quatro piretróides estudados foi realizada empregando-se as condições descritas no item 2.3. A identificação dos piretróides estudados, cromatograficamente, foi feita por comparação com o tempo de retenção (t_R) dos compostos na solução padrão. Na Figura 02 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 corresponde ao padrão interno, bifentrina. Os demais picos, com t_R iguais a: 4,2; 4,8; 5,5 e 6,8 minutos correspondem λ -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 (MAŠTOVSKÁ & LEHOTAY, 2004). Dessa forma, o valor de área atribuído a cada piretróide foi considerado como sendo o somatório das áreas dos picos dos isômeros.

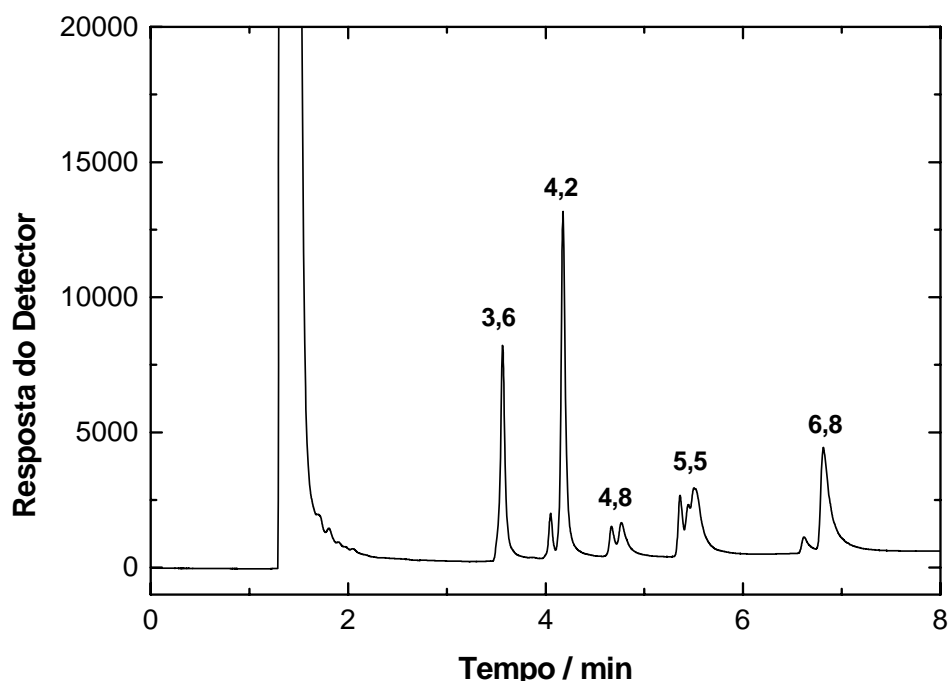


Figura 02. Cromatograma de uma solução padrão de $500 \mu\text{g L}^{-1}$ dos piretróides estudados, onde: $t_R = 3,6$ min: padrão interno, $t_R = 4,2$ min: λ -cialotrina, $t_R = 4,8$ min: permetrina, $t_R = 5,5$ min: cipermetrina e $t_R = 6,8$ min: deltametrina.

Pelas características do cromatograma, Figura 02, observa-se que as condições de análise, como a programação de temperatura, coluna utilizada e o fluxo do gás de arraste, possibilitaram uma boa separação dos compostos estudados.

3.2.1. Curvas analíticas e linearidade de resposta do detector

A quantificação dos quatro piretróides nos extratos foi feita pelo método do padrão interno. Para tal, foram construídas curvas analíticas, uma para cada um dos piretróides, relacionando os dados da razão entre a área do pico atribuído ao piretróide e a área do pico do padrão interno (A_a/A_{PI}) com a concentração do piretróide em $\mu\text{g L}^{-1}$. As curvas analíticas (Figura 03) foram construídas no intervalo entre 10 e 750 $\mu\text{g L}^{-1}$.

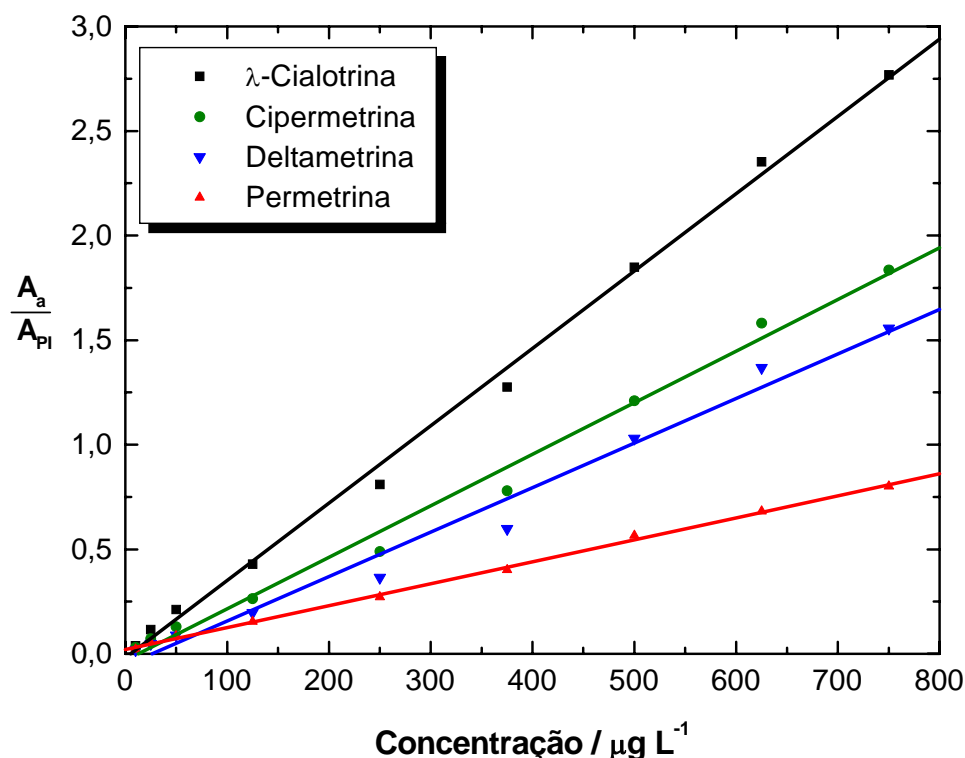


Figura 03. Curvas analíticas para os quatro piretróides λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina usando como padrão interno (PI) a bifentrina.

Os dados submetidos à análise por regressão linear resultaram em curvas analíticas com coeficientes de correlação (r) maiores que 0,990. As equações das retas e os coeficientes de correlação (r) estão na Tabela 07.

Tabela 07. Equações das retas e coeficientes de correlação (r) obtidos para os piretróides estudados.

Piretróide	Equação	r
λ -Cialotrina	$y = 0,0037x - 0,0264$	0,9984
Cipermetrina	$y = 0,0025x - 0,0448$	0,9956
Deltametrina	$y = 0,0022x - 0,0743$	0,9911
Permetrina	$y = 0,0010x + 0,0234$	0,9992

Os dados da regressão linear apresentados na Tabela 07 indicam que a resposta do detector por captura por elétrons (DCE) é linear para todos os compostos estudados, na faixa de 10 a 750 $\mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, é possível perceber pela inclinação das retas (Figura 03) e pelo coeficiente angular da curva analítica, que o detector por captura de elétrons (DCE) é mais sensível à λ -cialotrina que aos demais piretróides. Esta sensibilidade está relacionada com a presença e a quantidade na molécula, de átomos que capturam elétrons.

A bifentrina, piretróide utilizado neste procedimento como padrão interno (PI), foi escolhida por apresentar os pré-requisitos de um padrão interno, como, não reagir com as substâncias ou outros componentes da matriz e não fazer parte da amostra. Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar às substâncias a serem quantificadas, ter tempo de retenção próximo a estas substâncias, e, quando cromatografada, ficar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra (RIBANI et al., 2004). A bifentrina, por ser utilizada em grãos armazenados, dificilmente poderá ser encontrada em amostras naturais como a água e o solo.

Pelos resultados obtidos na curva analítica e na análise de todos os extratos, foi constatado que a utilização do método do padrão interno contribuiu muito para resultados mais precisos do que os resultados obtidos por padronização externa. Pelo método do padrão interno, pequenas variações no fluxo do gás de arraste, no volume da amostra injetada e na temperatura da coluna, não afetam significativamente os resultados.

3.3. Otimização das técnicas ELL-PBT e ESL-PBT

A análise de pesticidas em amostras ambientais, como água e solo por cromatografia gasosa, requer a extração dos mesmos e a purificação dos extratos. Na extração em fase única, a partição pode ser induzida pelo aumento da força iônica (ANASTASSIADES et al., 2003; MATKOVICH & CHRISTIAN, 1973) ou pelo abaixamento da temperatura (RIZOS et al., 2001; GOULART, 2004). A extração e partição pelo abaixamento da temperatura consistem em adicionar à amostra aquosa contendo o analito certa quantidade de um solvente orgânico miscível em água, formando uma fase única. Para induzir a separação das fases orgânica e aquosa, a temperatura da mistura é abaixada até -20 °C, em que a água torna-se sólida na parte inferior do recipiente utilizado e o solvente contendo os resíduos de pesticidas extraídos permanecem na parte superior. No caso da extração sólido-líquido, o solo e a água congelada ficam retidos no recipiente e a fase orgânica líquida na parte superior, não sendo necessária nenhuma etapa de purificação.

Nos processos de ELL-PBT e ESL-PBT deve-se considerar a proporção de volumes entre a fase aquosa e a fase orgânica. Outro fator importante que também deve ser considerado, principalmente na extração de piretróides do solo, é o tempo de agitação e contato entre as fases. Nesse processo de extração usou-se como terceiro fator a força iônica da solução aquosa. Com o método otimizado verificou-se a influência do tempo de congelamento e a adição de outros solventes.

Devido aos ótimos resultados obtidos por GOULART (2004) na extração de piretróides de amostras de leite com o uso de acetonitrila e as demais vantagens oferecidas por este solvente para a técnica de extração por partição em baixa temperatura, tais como miscibilidade em água, densidade inferior à da água e apresentar-se líquida à temperatura de -20 °C, o estudo das técnicas ELL-PBT e ESL-PBT iniciaram-se com a utilização deste solvente.

Nesse trabalho, foram desenvolvidos e otimizados os métodos ELL-PBT e ESL-PBT para determinar os piretróides cipermetrina, deltametrina, λ -cialotrina e permetrina em água e solo.

3.3.1. Planejamento fatorial

O planejamento fatorial completo, 2^3 , foi escolhido por permitir, com um número mínimo de ensaios, avaliar quantitativamente a influência dos fatores sobre a porcentagem de recuperação dos compostos, bem como suas possíveis interações.

A condução dos experimentos dentro do planejamento fatorial consistiu em realizar ensaios e registrar as respostas observadas em todas as possíveis combinações dos níveis, conforme descrito no item 2.2.1. Foi estudado o comportamento simultâneo de três fatores: (1) a proporção entre o volume de água e acetonitrila, (2) a força iônica da solução aquosa e (3) o tempo de agitação e contato da mistura, tendo como resposta as porcentagens de recuperação nas extrações para cada um dos piretróides. Os ensaios foram realizados em duplicatas, produzindo 16 respostas no total, permitindo a obtenção da estimativa do erro experimental associado à determinação de cada resposta média. Tais repetições permitiram ainda calcular a estimativa do erro associado a cada efeito e o teste t de "student" para $\alpha = 0,05$ e $\nu = 8$. Os resultados médios obtidos em cada ensaio e as estimativas do erro experimental para as amostras de água são mostrados na Tabela 08.

Tabela 08. Porcentagens de recuperação média e estimativa do erro experimental, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de água.

Ensaio	Fatores codificados			Recuperação (%) \pm erro experimental			
	F(1)	F(2)	F(3)	λ -Cialotrina	Permetrina	Cipermetrina	Deltametrina
1 e 2	-	-	-	55,5 \pm 2,1	72,5 \pm 0,7	64,5 \pm 7,7	67,5 \pm 3,5
3 e 4	+	-	-	65,0 \pm 1,4	83,0 \pm 5,6	69,5 \pm 2,1	73,0 \pm 1,4
5 e 6	-	+	-	52,0 \pm 1,4	77,5 \pm 0,7	63,0 \pm 2,8	66,5 \pm 2,1
7 e 8	+	+	-	58,5 \pm 0,7	78,5 \pm 6,4	70,0 \pm 1,4	66,0 \pm 1,4
9 e 10	-	-	+	57,0 \pm 1,4	90,5 \pm 3,5	64,5 \pm 0,7	68,0 \pm 1,4
11 e 12	+	-	+	65,5 \pm 4,9	81,0 \pm 2,8	67,5 \pm 6,3	69,5 \pm 2,8
13 e 14	-	+	+	40,5 \pm 3,5	80,0 \pm 4,2	51,5 \pm 4,9	55,0 \pm 7,7
15 e 16	+	+	+	60,5 \pm 0,7	82,0 \pm 4,2	66,5 \pm 0,7	66,0 \pm 1,4

Com auxílio do programa Statistica 6.0 (StatSoft) e os resultados obtidos nos ensaios, foi possível calcular as porcentagens de recuperação média, os efeitos de cada fator e as interações entre os fatores na extração de cada um dos piretróides obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de água (Tabela 09).

Tabela 09. Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos piretróides, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de água.

	λ -Cialotrina	Permetrina	Cipermetrina	Deltametrina
Recuperação média	56,81 \pm 0,81	80,63 \pm 1,29	64,69 \pm 1,08	66,44 \pm 1,02
(1) Volume	11,13 \pm 1,63*	1,00 \pm 2,58	7,38 \pm 2,15*	4,38 \pm 2,04
(2) Força iônica	-7,88 \pm 1,63*	-2,25 \pm 2,58	-3,88 \pm 2,15	-6,13 \pm 2,04*
(3) Tempo	-1,88 \pm 1,63	5,50 \pm 2,58	-4,13 \pm 2,15	-3,63 \pm 2,04
(1) e (2)	2,13 \pm 1,63	0,50 \pm 2,58	3,63 \pm 2,15	0,88 \pm 2,04
(1) e (3)	3,13 \pm 1,63	-4,75 \pm 2,58	1,38 \pm 2,15	1,88 \pm 2,04
(2) e (3)	-2,88 \pm 1,63	-2,50 \pm 2,58	-3,38 \pm 2,15	-2,13 \pm 2,04

*(Em negrito) Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste t ($t_{\text{tab}} = t_{0,05; 8} = 2,306$).

A Tabela 09 contém, simplificada, alguns resultados da análise estatística obtida com os dados da porcentagem de extração dos experimentos do planejamento fatorial para as amostras de água.

Como não foi observado efeito de interação entre os fatores, estatisticamente significativo ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste t, os efeitos principais devem ser interpretados separadamente. O aumento da proporção do volume do solvente extrator, acetonitrila, em relação ao volume de água, de 1:1 para 1:2, aumentou o rendimento de extração de 11,13 % para λ -cialotrina e 7,38 % para cipermetrina em água. Para os demais piretróides: permetrina e deltametrina, o aumento de 1,00 % e 4,38 % respectivamente, não foi significativo. Isto significa que, isoladamente, o aumento da proporção de acetonitrila, contribui para o aumento da extração dos piretróides para a amostra de água.

Pode-se notar, também, o efeito negativo do aumento da força iônica. O rendimento da extração cai de 7,88 % em média para λ -cialotrina e de 6,13 % para a deltametrina. Permetrina e cipermetrina também apresentaram efeito negativo: 2,25 % e 3,88 % respectivamente, não significativos. Com o aumento da força iônica da solução aquosa esperava-se um efeito positivo devido a solvatação dos íons sódio pelas moléculas de água, facilitando a migração dos piretróides para a fase orgânica. Porém neste trabalho, foi comprovado que o aumento na adição de sais pode dificultar a formação de uma fase única, diminuindo a porcentagem de extração dos compostos.

O aumento do tempo de contato e de agitação dos piretróides na água não proporcionou aumento significativo na porcentagem de recuperação de extração desses compostos.

Todos os resultados obtidos nos 16 experimentos de extração dos piretróides em amostras de água são apresentados na forma de uma superfície de resposta (Figura 04).

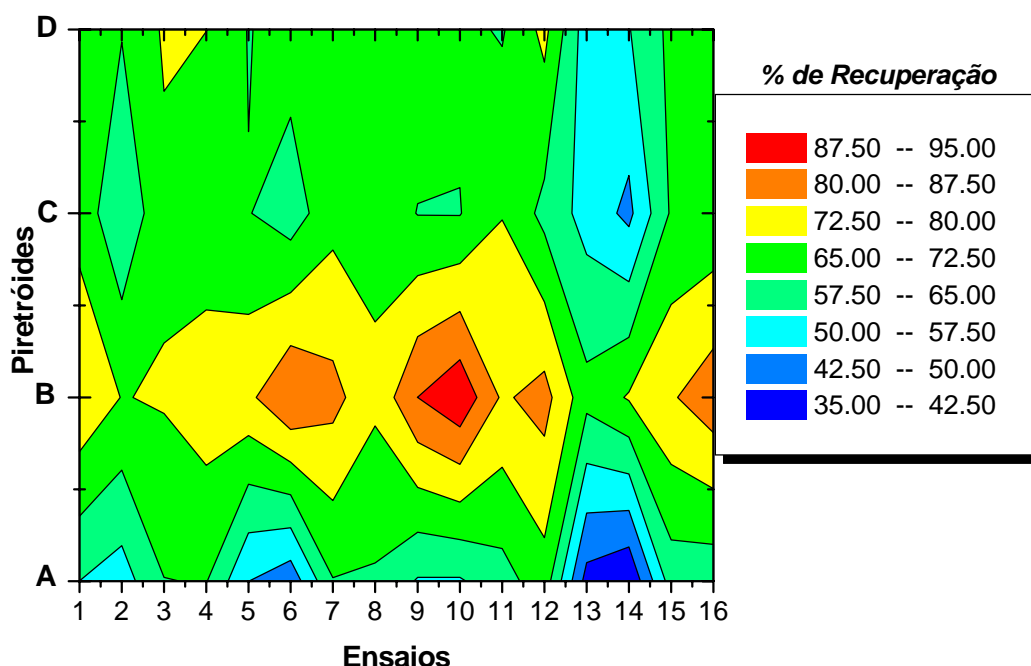


Figura 04. Representação gráfica do conjunto dos resultados das porcentagens de recuperação obtidas pelo planejamento fatorial na extração dos piretróides na água, onde: A = λ -cialotrina, B = permetrina, C = cipermetrina e D = deltametrina.

Embora sejam constituídas de valores discretos, as vantagens da representação gráfica são evidentes. A melhor eficiência na extração pode ser percebida imediatamente. Na extração dos piretróides da água, os ensaios 3 e 4 proporcionaram melhor porcentagem de extração para λ -cialotrina, cipermetrina e deltametrina. Para extração de permetrina todos os ensaios foram satisfatórios (% de recuperação entre 70 e 90 %).

Portanto, pelos resultados obtidos na análise estatística, Tabela 09, e pela análise qualitativa da superfície de resposta, Figura 04, os ensaios 3 e 4 que correspondem aos fatores: proporção água:acetonitrila 1:2, concentração $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ do íon sódio e tempo de extração de 15 minutos, foram os escolhidos para dar continuidade no desenvolvimento e otimização da técnica de ELL-PBT para determinar os piretróides cipermetrina, deltametrina, λ -cialotrina e permetrina em água.

A análise do planejamento fatorial para as amostras de solo foi realizada de forma semelhante às amostras de água. A Tabela 10 mostra as respostas médias em cada ensaio com os respectivos erros experimentais para cada piretróide.

Tabela 10. Porcentagens de recuperação média e estimativa do erro experimental, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de solo.

Ensaio	Fatores codificados			Recuperação (%) \pm erro experimental			
	F(1)	F(2)	F(3)	λ -Cialotrina	Permetrina	Cipermetrina	Deltametrina
1 e 2	-	-	-	65,5 \pm 6,4	71,0 \pm 5,6	65,5 \pm 4,9	73,5 \pm 4,9
3 e 4	+	-	-	81,0 \pm 4,2	93,5 \pm 2,1	82,0 \pm 4,2	86,5 \pm 4,9
5 e 6	-	+	-	64,0 \pm 2,8	81,0 \pm 5,6	67,0 \pm 5,6	74,0 \pm 8,4
7 e 8	+	+	-	70,5 \pm 0,7	92,5 \pm 0,7	70,5 \pm 6,4	78,5 \pm 4,9
9 e 10	-	-	+	78,0 \pm 4,2	93,0 \pm 0,7	81,5 \pm 3,5	84,5 \pm 4,9
11 e 12	+	-	+	71,0 \pm 5,6	91,5 \pm 0,7	74,0 \pm 5,6	73,0 \pm 7,1
13 e 14	-	+	+	29,5 \pm 3,5	69,5 \pm 0,7	41,0 \pm 4,2	44,5 \pm 3,5
15 e 16	+	+	+	70,0 \pm 1,4	93,5 \pm 6,3	79,0 \pm 4,2	78,0 \pm 2,8

As porcentagens de recuperação de extração para cada um dos piretróides em amostras de solo pelo planejamento fatorial foram analisadas estatisticamente. Os rendimentos de extração médios e os efeitos de cada fator e da interação destes fatores para as amostras de solo são listadas na Tabela 11.

Tabela 11. Porcentagens de recuperação média, efeitos de cada fator e interações entre os fatores (\pm estimativa do erro experimental) de extração de cada um dos piretróides, obtidos nos experimentos do planejamento fatorial para amostras de solo.

	λ -Cialotrina	Permetrina	Cipermetrina	Deltametrina
Recuperação média	66,19 \pm 2,54	85,69 \pm 1,76	70,06 \pm 2,70	74,06 \pm 2,58
(1) Volume	13,88 \pm 5,08*	14,13 \pm 3,51*	12,63 \pm 5,40*	9,88 \pm 5,15
(2) Força iônica	-15,38 \pm 5,08*	-3,13 \pm 3,51	-11,38 \pm 5,40	-10,63 \pm 5,15
(3) Tempo	-8,13 \pm 5,08	2,38 \pm 3,51	-2,38 \pm 5,40	-8,13 \pm 5,15
(1) e (2)	9,63 \pm 5,08	3,63 \pm 3,51	8,13 \pm 5,40	9,13 \pm 5,15
(1) e (3)	2,88 \pm 5,08	-2,88 \pm 3,51	2,63 \pm 5,40	1,13 \pm 5,15
(2) e (3)	-9,38 \pm 5,08	-7,63 \pm 3,51	-6,38 \pm 5,40	-6,88 \pm 5,15

*(Em negrito) Efeito estatisticamente significativo ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste t ($t_{\text{tab}} = t_{0,05; 8} = 2,306$).

Na extração dos piretróides das amostras de solo não foi observado efeito de interação estatisticamente significativo ao nível de 95 % de probabilidade pelo teste t, dessa forma os efeitos principais foram interpretados separadamente. O aumento da proporção do volume de acetone nitrila em relação ao volume de água na mistura extratora aumentou o rendimento de extração de 13,88 % para λ -cialotrina, 14,13 % para permetrina e 12,63 % para cipermetrina em solo. Para a deltametrina, o aumento de 9,88 % não foi significativo.

Pode-se notar que o aumento da força iônica para λ -cialotrina diminuiu a porcentagem de extração, com uma queda de 15,38 % em média. A extração dos piretróides permetrina, cipermetrina e deltametrina apresentou efeito negativo não significativo: 3,13 %, 11,38 % e 10,63 %, respectivamente. O

aumento do tempo de extração dos piretróides também não proporcionou aumento significativo na porcentagem de recuperação desses compostos.

De forma semelhante, pela análise qualitativa da superfície de resposta (Figura 05) pode-se inferir que os resultados obtidos nos ensaios 3 e 4 e nos ensaios 9 e 10 são os melhores. No entanto, pela análise estatística as variações nos resultados dos ensaios 9 e 10 não são significativas. Os ensaios 3 e 4 correspondem aos fatores proporção água:acetoneitrila 1:2, concentração 0,020 mol L⁻¹ do íon sódio e tempo de extração de 30 minutos, que foram os melhores para extração de piretróides no solo.

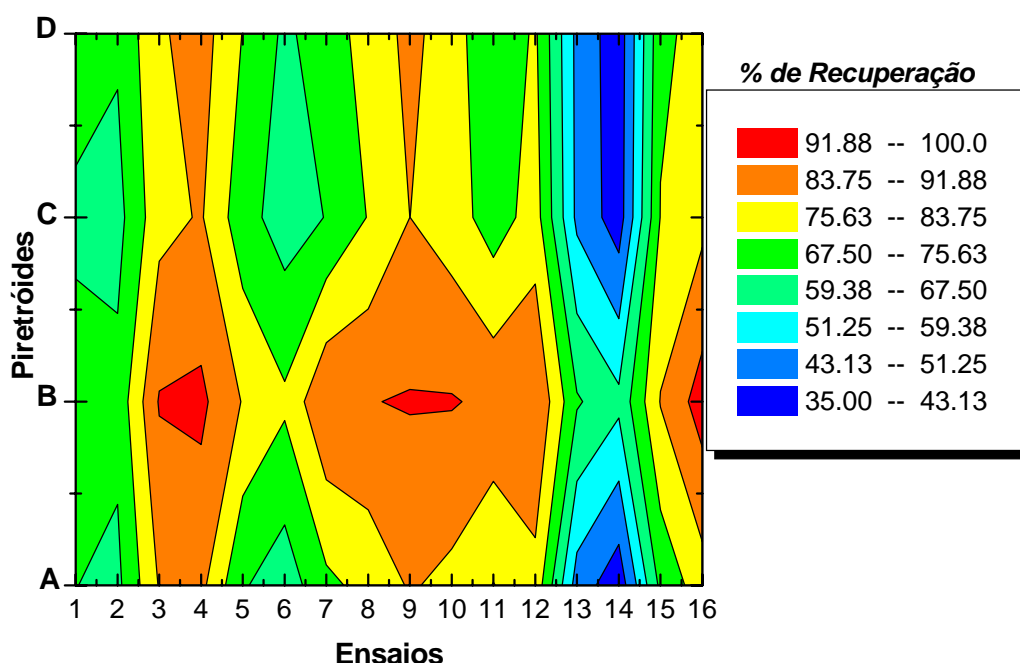


Figura 05. Representação gráfica do conjunto dos resultados das porcentagens de recuperação obtidas pelo planejamento fatorial na extração dos piretróides no solo, onde: A = λ -cialotrina, B = permetrina, C = cipermetrina e D = deltametrina.

Portanto, os ensaios 3 e 4 foram escolhidos para dar continuidade no desenvolvimento e otimização da técnica de extração sólido-líquido por partição em baixa temperatura para determinar os piretróides cipermetrina, deltametrina, λ -cialotrina e permetrina em solo.

Os ensaios 3 e 4 para as amostras de solo e água apresentaram recuperação entre 70 e 100 %, e estão dentro do intervalo de 70 a 120 %,

sugerido pelo GARP (1999). Com o objetivo de obter porcentagens de recuperação ainda melhores para o método, verificou-se a influência do tempo de congelamento das amostras e a adição de outros solventes.

No estudo da extração ESL-PBT para as amostras de solo, o aumento do volume da mistura água e acetonitrila, de 4 e 4 mL para 4 e 8 mL respectivamente, aumentou o rendimento de extração de 9,8 a 14,13 % para os piretróides estudados. Na próxima etapa, foram avaliadas outras proporções da mistura água e acetonitrila dentro do total de 12 mL, otimizado pelo planejamento fatorial.

3.3.2. Avaliação da razão água:acetonitrila na eficiência de extração de piretróides no solo

Nesse estudo foram realizados testes para estabelecer a proporção ideal entre o volume de água e o volume do solvente acetonitrila, que proporcionasse melhor porcentagem de extração dos piretróides em solo.

As amostras fortificadas de solo utilizadas nos testes foram preparadas de acordo com o item 2.2.2. Na Tabela 12 estão apresentadas as proporções volume:volume estudadas entre água e acetonitrila e os resultados obtidos.

Tabela 12. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação, CV (%), obtidos após o estudo de diferentes proporções entre água e acetonitrila estudadas para extração dos piretróides no solo.

Proporção água:acetonitrila	λ -Cialotrina		Permetrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
1:8	77,0	6,4	82,6	8,8	73,9	9,9	67,9	9,9
2:8	80,5	9,8	93,6	4,8	74,0	8,3	64,5	11,2
3:8	76,5	9,6	97,4	4,3	74,8	9,2	62,7	4,7
4:8	78,6	4,4	97,0	1,3	81,3	1,5	66,2	3,0
5:8	65,0	1,4	94,7	2,4	66,6	8,8	58,7	6,9
6:8	61,6	9,2	100,5	14,2	60,2	12,5	58,3	9,3

De acordo com os resultados obtidos na Tabela 12 pode-se afirmar que não houve diferenças significativas entre as proporções estudadas para os quatro piretróides, ao nível de 95 % de probabilidade. A λ -cialotrina apresentou uma porcentagem de recuperação média de aproximadamente 70 % e permetrina 94 %. Para cipermetrina a proporção 1:2 apresentou uma melhor eficiência de extração, entretanto pode ser considerada estatisticamente igual às três primeiras proporções estudadas. Para a deltametrina os resultados da extração ficaram em torno de 60 %, aproximadamente.

Para os quatro compostos estudados a razão água:solvente 1:2 foi a que apresentou menor dispersão na média dos resultados obtidos, sendo portanto, escolhida para os testes seguintes.

3.3.3. Efeito da adição de metanol e acetato de etila na ELL-PBT de piretróides na água

Apesar dos resultados obtidos no item 3.3.1 estarem de acordo com o recomendado pelo GARP (1999), procurou-se melhorar os rendimentos de extração, fazendo uma análise com todos os fatores já otimizados fixos e mantendo-se a mesma proporção água:solvente orgânico verificou-se o efeito da adição de pequenos volumes de metanol e acetato de etila na porcentagem de extração, conforme o procedimento descrito no item 2.2.3 e 2.2.4.

Na Figura 06 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 água: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 apresentou o melhor rendimento na extração dos piretróides na água, apresentando resultados que variaram de 82 a 90 % para a λ -cialotrina, 87 a 98 % para permetrina, 88 a 97 % para cipermetrina e 80 a 86 % para deltametrina. Os demais valores adicionados apresentaram uma maior dispersão dos resultados obtidos, seguidos de uma menor eficiência de extração.

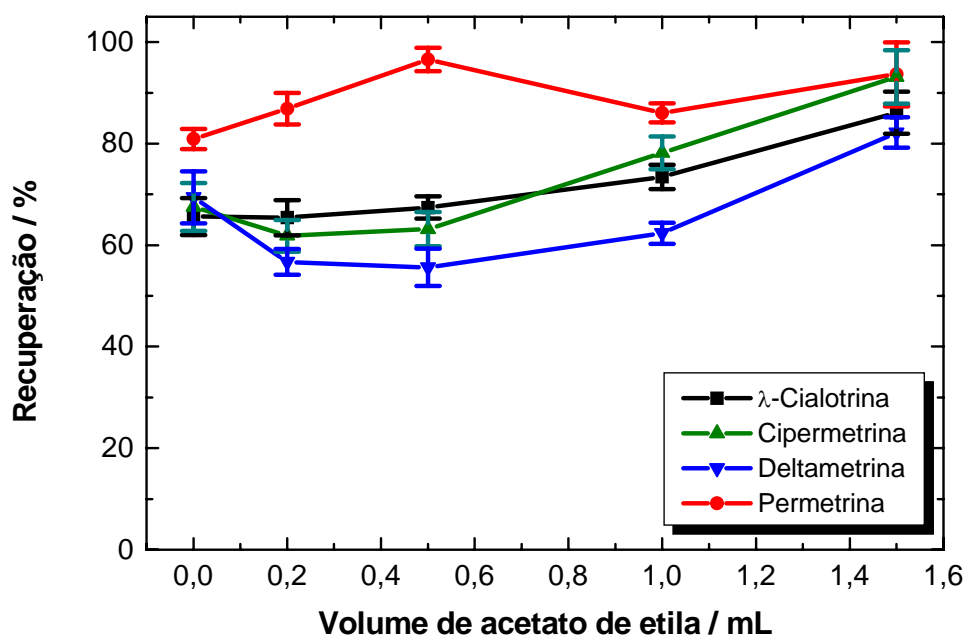


Figura 06. Porcentagens de recuperação de λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água, em condições otimizadas e com adição de 0,00; 0,20; 0,50; 1,00 e 1,50 mL de acetato de etila.

Na Figura 07 estão apresentados os resultados da eficiência de extração obtidos para os testes: (1) planejamento fatorial, ou seja, ausência de modificadores de polaridade, (2) adição de 0,20 mL de metanol e (3) adição de 1,50 mL de acetato de etila.

Os resultados obtidos pela adição de 0,50 mL de metanol à acetoneitrila 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 acetoneitrila somente apresentou resultados satisfatórios para a extração de permetrina em água. O uso de metanol como modificador da polaridade da mistura extratora não foi eficiente devido a maior polaridade do mesmo em relação a acetoneitrila.

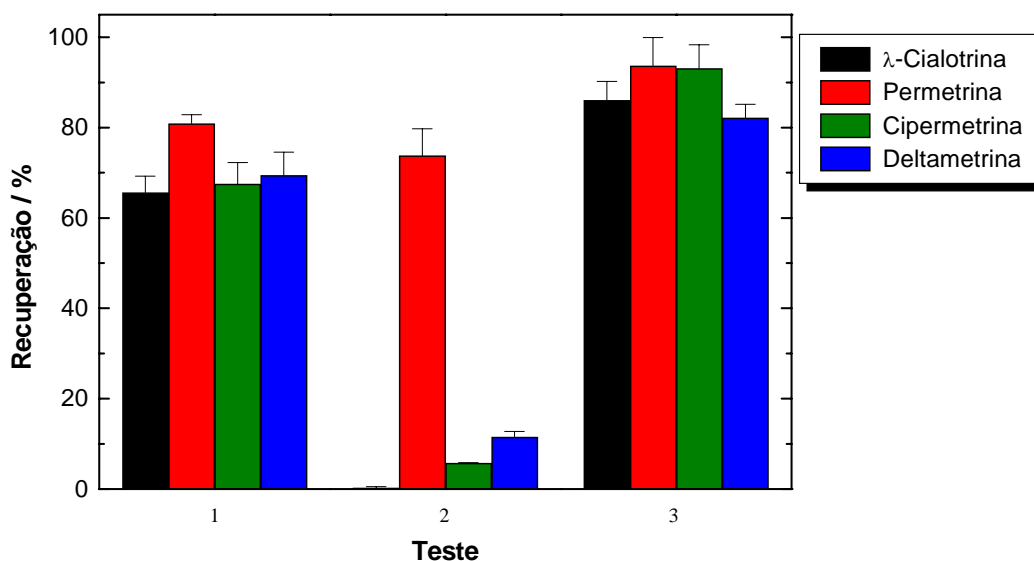


Figura 07. Porcentagens de recuperação de λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina, após a realização de três testes, onde: 1 = planejamento fatorial, 2 = adição de 0,20 mL de metanol e 3 = adição de 1,50 mL de acetato de etila.

Dos métodos avaliados, a mistura extratora formada por 1,50 mL de acetato de etila e 6,50 mL de acetonitrila foi o que apresentou melhores resultados.

3.3.4. Efeito da adição de acetato de etila na técnica ESL-PBT de piretróides no solo

Quatro volumes de acetato de etila foram testados para extração dos piretróides em estudo no solo, a fim de se verificar qual apresentaria a máxima porcentagem de extração. As recuperações dos quatro piretróides nas amostras de solo foram verificadas com amostras fortificadas desse composto, a fim de se obter no solo uma concentração de $4,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada piretróide e uma concentração nos extratos finais $500 \mu\text{g L}^{-1}$ do princípio ativo, segundo o procedimento descrito no item 2.2.4. Para os quatro compostos estudados a razão água:solvente extrator foi mantida em 1:2.

O valor máximo de acetato de etila que foi adicionado à mistura extratora sem romper a fase única foi de 1,50 mL. Na Figura 08 estão apresentadas as porcentagens de recuperação dos compostos estudados, após extração com acetonitrila e 0,00; 0,20; 0,50; 1,00 e 1,50 mL de acetato de etila.

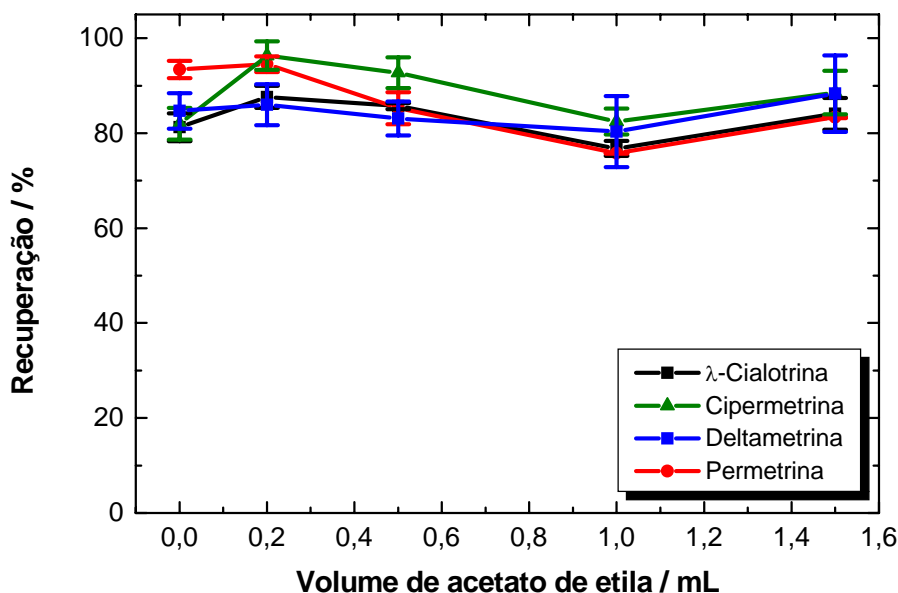


Figura 08. Porcentagens de recuperação de λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina no solo, em condições otimizadas e com adição de 0,0; 0,2; 0,5; 1,0 e 1,5 mL de acetato de etila.

Comparando-se os resultados de extração obtidos usando somente a acetonitrila com os resultados obtidos pela adição de 0,20 mL de acetato de etila pode-se perceber o aumento na porcentagem de extração para o piretróide cipermetrina, de 80 para 96 %. Para os demais piretróides, os resultados obtidos pela adição de 0,20 mL de acetato de etila variaram entre 86 e 90 % para a λ -cialotrina, entre 92 e 95 % para permetrina, e entre 80 e 89 % para deltametrina. A adição de volumes maiores de acetato de etila não modificou a eficiência de extração.

Os extratos obtidos por ESL-PBT para extração dos piretróides no solo, apresentaram um aspecto limpo, não necessitando de uma segunda etapa de purificação para análise cromatográfica. Isso representa uma grande vantagem em se tratando de uma matriz complexa como o solo, uma vez que elimina as perdas causadas pelas etapas de limpeza dos extratos.

3.3.5. Efeito do tempo de congelamento na eficiência da ELL-PBT e da ESL-PBT

Na otimização do tempo de congelamento na extração simultânea dos piretróides por ELL-PBT e ESL-PBT, as amostras foram congeladas (-20 °C): por 6, 12 e 24 horas (procedimento 2.2.5). Os resultados encontrados estão dispostos na Tabela 13.

Tabela 13. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação, CV (%), obtidos para ELL-PBT e ESL-PBT em função dos tempos de congelamento.

Tempo (horas)	λ -Cialotrina		Permetrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
6	87,0	4,6	93,4	4,6	93,1	4,4	82,1	3,0
<i>Água</i> 12	86,1	3,4	90,9	4,8	88,8	4,7	82,8	3,9
24	87,3	4,1	94,5	3,8	93,1	3,0	82,2	3,4
6	87,5	3,9	94,5	3,9	96,3	4,0	86,7	4,7
<i>Solo</i> 12	86,7	4,6	90,7	3,5	93,9	3,6	84,7	3,4
24	84,6	2,7	94,8	2,9	92,6	3,2	82,3	1,7

Nas condições de trabalho em que as misturas são colocadas em um freezer para separação das fases, observou-se que em um tempo menor que 6 horas o congelamento da água não ocorre totalmente. A partir de 6 horas não houve diferenças significativas nas porcentagens de recuperações de λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina nas amostras de água e solo.

3.4. Metodologia otimizada

A metodologia otimizada de ELL-PBT e análise simultânea dos piretróides λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina em amostras de água, estabelecida pelos resultados dos experimentos realizados, foi usada nas demais análises de amostras de água.

De forma semelhante, a metodologia otimizada de ESL-PBT e análise simultânea dos quatro piretróides nas amostras em solo, foi utilizada para as demais análises de solo.

Para análise dos quatro piretróides nas amostras de água (ELL-PBT) e solo (ESL-PBT) propõe-se as seguintes metodologias otimizadas:

Água: Extração de 4,00 mL de água, previamente fortificada ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada piretróide e contendo $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ de íon sódio), com 6,50 mL de acetonitrila e 1,50 mL de acetato de etila, seguida de agitação por 15 minutos.

Solo: Amostras de solo fortificadas com $4,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada piretróide, foram extraídas com 7,80 mL de acetonitrila, 0,20 mL de acetato de etila e 4,00 mL de água (contendo $0,020 \text{ mol L}^{-1}$ de íon sódio), e agitadas por 30 minutos.

Após agitação as amostras de água e solo são deixadas em freezer a aproximadamente $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ por 6 horas. Após o prazo estabelecido, as amostras são passadas por um papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro, previamente lavado com 5,00 mL de acetonitrila. Os extratos são recuperados em frascos de 8,00 mL de capacidade e armazenados em freezer até o momento da determinação por cromatografia gasosa.

Os métodos de ELL-PBT e ESL-PBT otimizados, além da vantagem de menor consumo de solventes, não aumenta o volume dos extratos, reduzindo ou evitando etapas de evaporação e troca de solvente, reduzindo os riscos de contaminação e perdas de amostras, proporcionando níveis mais altos de recuperação.

3.5. Validação do método analítico

Segundo o INMETRO (2003), os parâmetros de desempenho analítico normalmente utilizados para validação de métodos de separação e análise são: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão.

3.5.1. Seletividade

A seletividade de um método de extração e análise é sua capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação numa amostra complexa (RIBANI et al., 2004).

A seletividade é um parâmetro de grande importância na análise de amostras complexas, como resíduos de pesticidas em amostras ambientais. A seletividade do método de análise dos piretróides em água e em solo foi avaliada comparando-se os cromatogramas de extratos de uma matriz de água e solo isentas dos piretróides λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina com extratos de duas matrizes fortificadas com os mesmos.

Nas figuras 09 e 10, que mostram a comparação dos cromatogramas, não foi observado nenhum interferente com resposta próxima ao tempo de retenção dos compostos estudados.

Nos processos de extração, os extratos orgânicos obtidos de amostras aquosas são límpidos, permitindo a análise direta por CG. Os extratos obtidos após extração de amostras de solo também são transparentes e os cromatogramas (Figura 10) não apresentam nenhum interferente. A característica do detector por captura de elétrons (DCE), de detectar somente átomos que capturam elétrons, contribuiu muito para a seletividade.

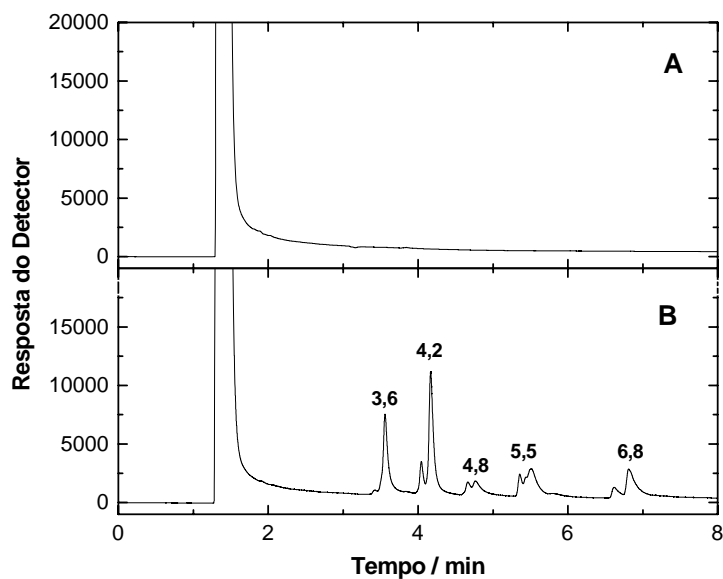


Figura 09. A = Cromatograma de um extrato obtido de uma matriz de água isenta dos piretróides e B = cromatograma de um extrato obtido de uma matriz de água fortificada ($500 \mu\text{g L}^{-1}$) com piretróides, onde: $t_R = 3,6$ min: padrão interno, $t_R = 4,2$ min: λ -cialotrina, $t_R = 4,8$ min: permetrina, $t_R = 5,5$ min: cipermetrina e $t_R = 6,8$ min: deltametrina.

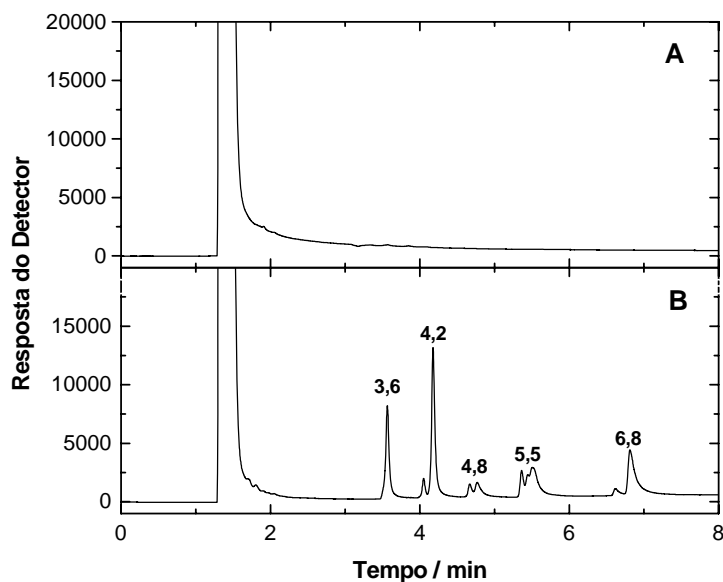


Figura 10. A = Cromatograma de um extrato obtido de uma matriz de solo isenta dos piretróides e B = cromatograma de um extrato obtido de uma matriz de solo fortificada ($4,0 \mu\text{g g}^{-1}$) com piretróides, onde: $t_R = 3,6$ min: padrão interno, $t_R = 4,2$ min: λ -cialotrina, $t_R = 4,8$ min: permetrina, $t_R = 5,5$ min: cipermetrina e $t_R = 6,8$ min: deltametrina.

3.5.2. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) para os métodos cromatográficos representa a menor concentração do analito em exame que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança, mas não necessariamente quantificada. O limite de quantificação corresponde à menor quantidade do analito que pode ser quantificada com exatidão (INMETRO, 2003).

Uma das maneiras de estimar os LD e LQ é através dos 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 (RIBANI et al., 2004). Os coeficientes linear e angular da curva analítica, bem como os valores de LD e LQ obtidos para os piretróides são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Estimativas dos coeficientes linear (s) e angular (S) das curvas analíticas, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) e coeficiente de variação, CV (%), calculados para os quatro piretróides estudados.

<i>Piretróide</i>	s	S	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CV(%)
λ -cialotrina	0,00142	0,00419	1,1	3,3	7,6
Permetrina	0,00200	0,00207	3,2	9,6	9,5
Cipermetrina	0,00163	0,00289	1,9	5,7	2,7
Deltametrina	0,00171	0,00197	2,9	8,7	5,5

Verificou-se que os valores do LD obtidos para análise dos piretróides λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina utilizando CG-DCE estão entre 1,1 e 3,2 $\mu\text{g L}^{-1}$. GOULART (2004) analisando cipermetrina e deltametrina em leite por CG-DCE obteve LD de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Os LQ 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 %. Segundo LANÇAS (2004) o CV deve ser considerado na determinação da exatidão do LQ, e deve ser menor que 10%. Todos os compostos apresentaram um CV adequado.

Além disso, pode-se observar que a λ -cialotrina apresentou um menor LD e LQ (Tabela 14) no CG-DCE que os piretróides cipermetrina, deltametrina e permetrina, respectivamente.

Observou-se também que os parâmetros das curvas analíticas da Tabela 14 diferem dos parâmetros obtidos nas curvas analíticas estabelecidas para os piretróides, Tabela 07. Os dados das curvas analíticas, Tabela 07, foram obtidos na faixa de linearidade de resposta do detector. Na determinação dos LD e LQ, os resultados foram obtidos para soluções de concentrações baixas e próximas ao limite de detecção do equipamento, dentro de uma certa faixa de concentração que difere da situação ideal.

3.5.3. Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra sob condições definidas (INMETRO, 2003). Em validação, a precisão pode ser considerada em níveis de repetitividade e precisão intermediária.

3.5.3.1. Repetitividade

A precisão dos métodos de ELL-PBT e ESL-PBT dos quatro piretróides estudados em amostras de água e solo, sob condições de repetitividade foi avaliada pelo cálculo da estimativa do desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (CV) de sete repetições do procedimento analítico otimizado (item 2.4.4.1). As porcentagens de recuperação obtidas (%R) e os coeficientes de variação (CV) estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação, CV (%), obtidos após sete extrações dos piretróides em amostras de água e solo.

	λ -Cialotrina		Permetrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
<i>Água</i>	87,2	3,7	93,4	4,6	92,2	4,9	82,3	4,5
<i>Solo</i>	84,7	1,7	97,1	2,6	87,7	4,3	80,6	4,3

Como pode ser observado, os resultados do coeficiente de variação obtidos para a amostra de água variaram entre 3,7 e 4,9 % e os resultados obtidos para a amostra de solo variaram entre 1,7 e 4,3 %. Segundo RIBANI et al., (2004), são aceitáveis CV de até 20 % dependendo da complexidade da amostra, a amostra de solo mesmo sendo de maior complexidade apresentou baixos CV, havendo uma boa repetitividade da técnica de extração estudada.

3.5.3.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária refere-se às variações ocorridas dentro de um mesmo laboratório, quando um ou mais fatores são alterados. Neste trabalho, procurou-se determinar a variação na porcentagem de recuperação (%R) de λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina extraídas de amostras de água e solo por ELL-PBT e ESL-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 após a análise executada em uma semana e um mês após o primeiro teste, pelo mesmo analista, nas mesmas condições.

Os resultados obtidos para extração dos compostos estudados na água e no solo, bem como os respectivos coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação, CV (%), obtidos após a análise executada em três dias diferentes, pelo mesmo analista.

		λ -Cialotrina		Permetrina		Cipermetrina		Deltametrina	
		%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
	Dia 1	87,0	4,6	93,4	4,6	93,1	4,4	82,1	3,0
<i>Água</i>	1 semana	86,0	4,8	93,6	4,6	93,1	3,5	85,5	3,9
	1 mês	86,1	2,9	91,9	4,9	88,4	4,5	81,5	3,3
	Dia 1	87,5	3,9	94,5	3,9	96,3	4,0	86,7	4,7
<i>Solo</i>	1 semana	84,1	1,6	96,4	4,1	89,3	4,9	80,1	4,8
	1 mês	83,6	1,7	95,8	2,9	91,6	3,6	77,5	4,4

De acordo com os resultados dispostos na Tabela 16, pode-se afirmar que as técnicas de extração e análise em estudo apresentaram porcentagens de recuperação estatisticamente iguais (ao nível de 95 % de probabilidade) nos diferentes dias, para cada um dos piretróides extraídos na água ou no solo.

Foi verificado que no mesmo laboratório os métodos de ELL-PBT e ESL-PBT em amostras de água e solo forneceram resultados que não diferem significativamente, para cada um dos piretróides estudados.

3.5.4. Exatidão

A exatidão expressa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (INMETRO, 2003).

Neste estudo, foram utilizadas duas metodologias para avaliar a exatidão dos métodos ELL-PBT e ESL-PBT. Na extração de piretróides de água e solo foram realizados ensaios de recuperação. Para a amostra de água foi também utilizada a comparação de métodos.

3.5.4.1. Ensaio de recuperação

A porcentagem de recuperação foi calculada segundo as recomendações do GARP (1999). As substâncias de interesse foram adicionadas em concentrações próximas a 1, 2 e 10 vezes o limite de quantificação (LQ). Assim, os ensaios de recuperação foram feitos extraíndo-se os compostos em estudo, presentes em matrizes de água e solo segundo o procedimento descrito no item 2.4.5.1, obtendo-se no extrato final 10, 20 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos quatro piretróides estudados.

Os resultados obtidos para extração dos piretróides λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água e no solo, bem como os respectivos coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação (%CV) obtidos após extração das amostras de água e solo, fortificadas pelos piretróides em três concentrações diferentes.

Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	λ -Cialotrina		Permetrina		Cipermetrina		Deltametrina		
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	
Água	20	89,3	6,1	91,5	12,6	92,1	5,2	86,9	4,5
	40	86,7	4,3	89,6	6,6	88,8	5,0	83,1	9,4
	200	87,4	6,8	89,5	4,1	87,0	5,8	83,4	4,7
Solo	20	85,5	8,4	93,5	10,9	93,3	12,4	89,2	7,7
	40	82,0	1,9	93,1	7,0	94,0	8,2	84,0	5,2
	200	86,1	5,0	96,7	7,5	94,0	5,2	80,3	9,5

Os resultados dispostos na Tabela 17, para extração dos piretróides na água e no solo em concentrações próximas à 1, 2 e 10 vezes do limite de quantificação (LQ) não diferem entre si (ao nível de 95 % de probabilidade), mostrando a exatidão do método.

Os resultados obtidos nos ensaios de recuperação (Tabela 17) são equivalentes aos resultados obtidos no cálculo da precisão intermediária (Tabela 16), comprovando a exatidão e precisão do método.

3.5.4.2. Comparação de métodos

A exatidão de um método de análise pode ser avaliada pela comparação de métodos. Neste trabalho os resultados obtidos empregando-se a ELL-PBT foram comparados com os resultados obtidos por dois métodos de referência, utilizados por VIÑAS et al., em 2002, para extração de pesticidas λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água.

Neste estudo, os resultados obtidos usando a técnica otimizada descrita no procedimento 2.4 foram comparados aos resultados obtidos pelos métodos 1 e 2, conforme descrito no item 2.4.5.2. Os resultados encontrados estão dispostos na Tabela 18.

Tabela 18. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação, CV (%), obtidos após a extração dos quatro piretróides por ELL-PBT e dois métodos de referência.

	λ -Cialotrina		Permetrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
<i>Método 1</i>	81,8	3,0	83,1	9,2	76,5	3,2	82,3	1,8
<i>Método 2</i>	89,8	15,7	80,3	14,1	87,6	19,2	75,5	11,2
<i>ELL-PBT</i>	87,2	3,7	93,4	4,6	92,2	4,9	82,3	4,5

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 λ -cialotrina, permetrina e deltametrina foram estatisticamente iguais nos três métodos estudados, com exceção da cipermetrina que foi melhor extraída por ELL-PBT (92,2 %) do que pelo método 1.

Os métodos 1 e 2 apresentaram como vantagem o fator de pré-concentração das amostras de água, igual a aproximadamente 3 e 12 vezes, respectivamente. Entretanto a ELL-PBT apresenta um menor consumo de solvente (8 mL) em relação aos métodos 1 e 2 (135 e 20 mL) e ainda não necessita de uma etapa de evaporação e troca de solvente, reduzindo os riscos de contaminação e perdas de amostras, proporcionando uma recuperação de forma mais reprodutiva, que pode ser percebida pela comparação dos 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.

3.6. Estudo da persistência dos piretróides deltametrina, cipermetrina, permetrina e λ -cialotrina na água e no solo

No presente estudo, para determinação da persistência dos piretróides deltametrina, cipermetrina, permetrina e λ -cialotrina em amostras de água e solo, foi utilizado o procedimento analítico conforme descrito no item 2.5. As amostras de água e solo foram mantidas sob condições ambientais, aproximadamente 25 - 35 °C, durante 80 dias.

Nas datas previstas, os compostos estudados foram extraídos utilizando os métodos analíticos otimizados para ELL-PBT e ESL-PBT, conforme descrito no item 2.5 e analisados por CG-DCE conforme descrito nos itens 2.3 e 2.3.1.

As Figuras 11 e 12 mostram os resultados obtidos para os quatro piretróides remanescentes nas amostras de água e solo durante o período estudado.

A persistência dos piretróides foi avaliada pela porcentagem dos mesmos que permaneceram nas amostras de água e solo, durante 80 dias.

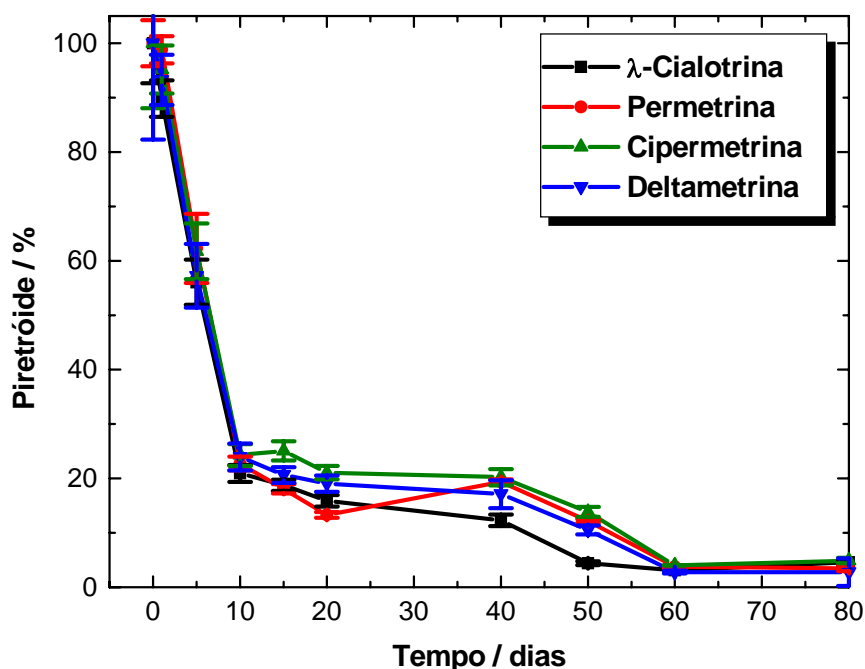


Figura 11. Persistência dos piretróides λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina na água pelo período de 80 dias.

Na figura 11 estão representados os dados relacionados com a taxa de persistência dos piretróides na água ao longo de 80 dias. A estabilidade dos piretróides sob condições ambientais, 25 - 35 °C é relativamente pequena. Os piretróides permaneceram na água durante o período avaliado, sendo observadas duas fases: nos primeiros 10 dias ocorre uma rápida degradação dos piretróides, aproximadamente 80 %. Na segunda fase ocorre um declínio lento, permanecendo em média 3 % de permetrina, cipermetrina, deltametrina e λ -cialotrina, após 80 dias.

Nesse estudo não foi avaliado o efeito do pH da água na taxa de persistência dos piretróides. Os piretróides foram colocados em solução aquosa, em pH igual a 6,5 e a taxa de persistência avaliada. Pelos resultados, foi observado que os piretróides têm uma meia-vida de aproximadamente 5 dias. Para a λ -cialotrina, esse resultado é bastante diferente do encontrado por WHO (1990c), que foi de 30 dias em solução aquosa de pH igual a 5. Segundo WHO (1990a), a meia-vida da permetrina foi de 4 dias e para deltametrina exposta à luz solar a meia-vida foi de 47,7 dias (WHO, 1990b). A meia-vida da cipermetrina obtida por WHO (1989) em águas naturais foi de 14 dias. Essa diferença nos resultados pode estar relacionada com as condições em que foram avaliadas.

A adsorção de pesticidas em uma matriz sólida como o solo é dependente das propriedades químicas da molécula orgânica e também da mineralogia do solo, dentre outros fatores. Em razão das interações pesticida-solo, os processos de extração de pesticidas em matrizes sólidas têm um grau maior de dificuldade. Amostra de um solo argiloso, típico da região da Zona da Mata Mineira, retirada do horizonte superficial, foi contaminada com quantidades conhecidas de 4 piretróides: deltametrina, cipermetrina, λ -cialotrina e permetrina. A técnica ESL-PBT otimizada e validada foi usada na avaliação da taxa de permanência desses piretróides nesse solo, pelo período de 80 dias.

Na figura 12 estão representados os dados relacionados com a taxa de degradação dos piretróides no solo ao longo de 80 dias. Em condições de umidade sem a incidência direta de luz sobre as amostras, a estabilidade dos piretróides é relativamente pequena. Os piretróides permaneceram no solo durante o período avaliado, sendo observada uma meia-vida de 20 dias para

permetrina, 30 dias para cipermetrina e deltametrina e 80 dias para λ -cialotrina, aproximadamente.

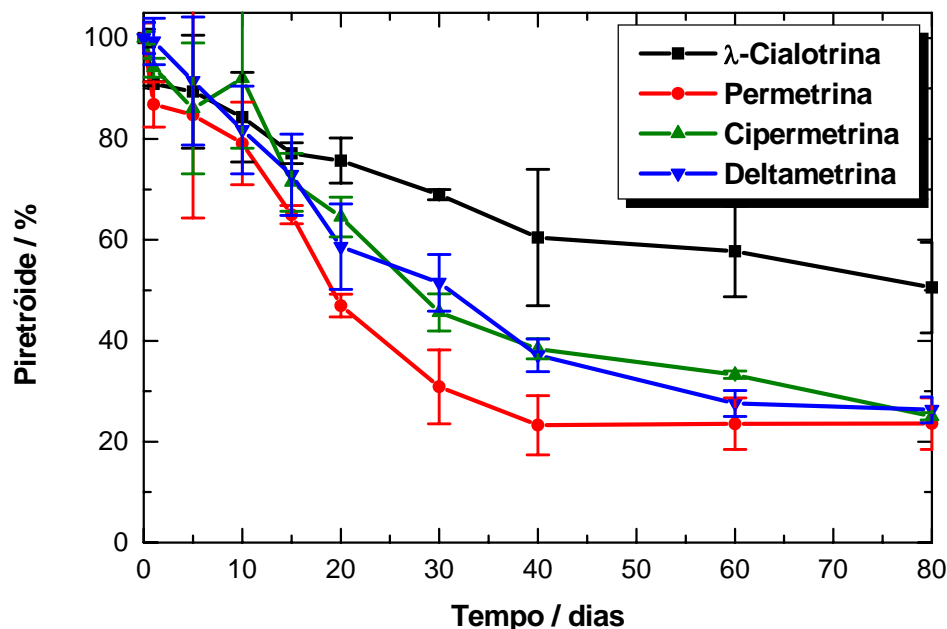


Figura 12. Persistência dos piretróides λ -cialotrina, permetrina, cipermetrina e deltametrina em solo argiloso pelo período de 80 dias.

Os resultados obtidos de meia-vida para a λ -cialotrina, 80 dias, e para cipermetrina, 30 dias, em solo argiloso, são concordantes com os resultados obtidos por WHO (1990c e 1989). Segundo esse mesmo autor (WHO, 1990c), a meia-vida da λ -cialotrina no solo pode variar de 22 a 82 dias, dependendo das características do solo. Em solos arenosos, inundados e argilosos a meia-vida da λ -cialotrina foi de 22, 74 e 82 dias, respectivamente. De forma semelhante, para a cipermetrina foi obtida uma meia-vida no solo em torno de 28 dias (WHO, 1989).

Os resultados obtidos para a deltametrina e a permetrina (30 e 20 dias, respectivamente) foram diferentes dos obtidos por WHO (1990a,b). No solo a meia-vida da deltametrina variou de 11 a 19 dias, dependendo também das características do solo (WHO, 1990b) e para a permetrina foi obtida uma meia-vida de 14 dias (WHO, 1990a).

3.7. Determinação dos piretróides deltametrina, cipermetrina, permetrina e λ -cialotrina em água do Ribeirão São Bartolomeu e avaliação do efeito de matriz

A técnica de ELL-PBT otimizada (item 2.4) foi aplicada em amostras de água coletadas em pontos diferentes da cidade de Viçosa – MG, conforme o procedimento descrito no item 2.6.

Nos três pontos estudados, não foi constatada a presença de resíduos de nenhum dos piretróides deltametrina, cipermetrina, λ -cialotrina e permetrina nas amostras de água coletada.

As amostras de água coletadas foram também submetidas à avaliação do efeito de matriz. Para tal, um volume de 4,00 mL dessas amostras coletadas foi fortificado, como descrito no item 2.1.2, e submetido ao procedimento de extração conforme descrito no item 2.4. A Tabela 18 mostra os resultados obtidos para a porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação (CV), após extrações dos piretróides nas diferentes matrizes de água fortificada.

Tabela 18. Porcentagem de recuperação (%R) e coeficiente de variação, CV (%), obtidos após extrações dos piretróides em diferentes matrizes de água.

	λ -Cialotrina		Permetrina		Cipermetrina		Deltametrina	
	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)	%R	CV(%)
<i>Água destilada</i>	87,2	3,7	93,4	4,6	92,2	4,9	82,3	4,5
<i>Amostra 1</i>	87,4	2,1	95,3	7,9	85,0	5,7	83,4	5,8
<i>Amostra 2</i>	87,2	1,6	87,2	0,8	84,0	3,2	85,3	2,0
<i>Amostra 3</i>	85,9	2,9	90,2	7,1	85,6	3,4	86,0	2,7

Os resultados obtidos na porcentagem de recuperação dos piretróides nas amostras 1, 2 e 3 são estatisticamente semelhantes aos obtidos em água destilada, demonstrando que não existe efeito de matriz na análise, comprovando a eficiência do método de ELL-PBT.

4. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foram otimizadas e validadas as técnicas de ELL-PBT e ESL-PBT. Essas técnicas foram utilizadas na extração simultânea dos piretróides deltametrina, cipermetrina, λ -cialotrina e permetrina em água e em um solo argiloso, típico da região da Zona da Mata Mineira.

Durante a otimização foram estudados simultaneamente os efeitos da proporção entre o volume de água e acetonitrila, força iônica da solução aquosa e tempo de agitação e contato da mistura. As técnicas de ELL-PBT e ESL-PBT foram eficientes na extração simultânea dos quatro piretróides estudados, com porcentagens de recuperação acima de 80% e baixo consumo de solventes. Os extratos obtidos por ESL-PBT para extração dos piretróides no solo, apresentaram um aspecto limpo, não necessitando de nenhuma outra etapa de purificação para análise cromatográfica.

Os resultados obtidos nos parâmetros de validação, como seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão e exatidão indicam que os métodos ELL-PBT e ESL-PBT são eficientes para a extração dos piretróides na água e no solo, possibilitando as análises cromatográficas das amostras e a determinação dos resíduos destes piretróides em água com limites de quantificação menores que $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Para a ELL-PBT não foi observado efeito de matriz na porcentagem de extração dos piretróides.

As técnicas otimizadas e validadas foram usadas na avaliação da taxa de permanência desses piretróides em água e em um solo úmido, protegidos da incidência direta da luz do sol, pelo período de 80 dias. Os piretróides, nas condições avaliadas são pouco persistentes com uma meia-vida entre 10 e 80 dias aproximadamente, indicando a baixa persistência destes piretróides no ambiente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for determination of pesticides residues in produce. **Journal of AOAC International**, **86(2)**: 412-431, 2003.

ANGERER, J. & RITTER, A. Determination of metabolites of pyrethroids in human urine using solid-phase extraction and gas chromatography – mass spectroscopy. **Journal of Chromatography B**, **695**: 217-226, 1997.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/AGROSIA/asp/frm_dados_ingrediente.asp?iVarAux=1&CodIng=124> Acesso em: 3 de dezembro de 2004.

BARRIONUEVO, R. W. & LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida e microextração em fase sólida de piretróides em água. **Química Nova**, **24(2)**: 172-175, 2001.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora da Unicamp, Campinas, SP, 2001.

BISSACOT, D. Z. & VASSILIEFF, I. HPLC determination of flumethrin, deltamethrin, cypermethrin, and cyhalothrin residues in the milk and blood of lactating dairy cows. **Journal of Analytical Toxicology**, **21(5)**: 397-402, 1997a.

BISSACOT, D. Z. & VASSILIEFF, I. Pyrethroid residues in milk and blood of dairy cows following single topical applications. **Veterinary and Human Toxicology**, **39(1)**: 6-8, 1997b.

BRASIL. Portaria nº 1.469/2000, de 29 de dezembro de 2000. Aprova o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Fundação Nacional de Saúde, Brasília, DF, 2001.

CHEN, Z. M. & WANG Y. H. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **Journal of Chromatography A**, **754**: 367-395, 1996.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Editora da Unicamp, 7ª ed. Campinas, SP, 1997.

COLUMÉ, A.; CÁRDENAS, S.; GALLEGO, M.; VALCÁCCI, M. Selective enrichment of 17 pyrethroids from lyophilised agricultural samples. **Journal of Chromatography A**, **912**: 83-90, 2001.

COLY, A. & AARON, J. J. Cyclodextrin-enhanced fluorescence and photochemically-induced fluorescence determination of five aromatic pesticides in water. **Analytica Chimica Acta**, **360**: 129-141, 1998.

DORES, E. F. G. C. & FREIRE, E. M. L. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise preliminar. **Química Nova**, **24(1)**: 27-36, 2001.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa e Agropecuária. Serviço nacional de levantamento e conservação dos solos. **Manual de métodos de análise de solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Rio de Janeiro, RJ, 1979.

FAKATA, K. L.; SWANSON, S. A.; VORCE, R. L.; STEMMER, P. M. Pyrethroid insecticides as phosphatase inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, **55**: 2017-2022, 1998.

GARP - Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas. Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos (apostila), 1999.

GO, V.; GAREY, J.; WOLFF, M. S.; POGO, G. T. Estrogenic potential of certain pyrethroid compounds in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. **Environment Health Perspective**, **107**: 173-177, 1999.

GOULART, S. M. **Extração de deltametrina e cipermetrina de leite e análise por cromatografia gasosa**. 2003. 60f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2003.

GUPTA, S.; HANDA, S. K.; SHARMA, K. K. A new spray reagent for detection of pyrethroids containing a nitrile group on thin-layer plates. **Talanta**, **45**: 1111-1114, 1998.

GUTIÉRREZ, A. F.; VIDAL, J. L. M.; LIÉBANAS, F. J. A.; CASADO, A. G.; VÍLCHEZ, J. L. Determination of endosulfan and some pyrethroids in waters by micro liquid-liquid extraction and GC-MS. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, **360**: 568-572, 1998.

HENGEL, M. J.; MOWER, C. R.; SHIBAMOTO, T. New method for analysis of pyrethroid insecticides: esfenvalerate, cis-permethrin, and trans-permethrin, in surface waters using solid-phase extraction and gas chromatography. **Environmental Contamination Toxicology**, **59**: 171-178, 1997.

HIRATA, R. Piretróides: estrutura química - atividade biológica. **Química Nova**, **18(4)**: 368-374, 1995.

HOUSE, W. A. & OU, Z. Determination of pesticides on suspended solids and sediments: Investigations on the handling and separation. **Chemosphere**, **24(7)**: 819-832, 1992.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

IPCS - International Programme on Chemical Safety. The World Health Organization recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2000 – 2002. Genebra, Suíça, 2000. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/pds/pdsother/class.pdf>> Acesso em: 19 de julho de 2004.

KOMATSU, E. & VAZ, J. M. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multirresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. **Química Nova**, **27(5)**: 720-724, 2004.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise – Métodos Cromatográficos de Análise 6**. Editora Rima, São Carlos, SP, 2004.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. Editora Acta, 1ª ed. São Carlos, SP, 1993.

LAUFER, J.; ROCHE, M.; PELHATE, M.; ELLIOTT, M.; JANES, N. F.; SATTELLE, D. B. Pyrethroid insecticides: actions of deltamethrin and related compounds on insect axonal sodium channels. **Journal of Insect Physiology**, **30(5)**: 341-349, 1984.

LEE, S.; GAN, J. & KABASHIMA, J. Recovery of synthetic pyrethroids in water samples during storage and extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **50**: 7194-7198, 2002.

LEGGETT, D. C.; JENKINS, T. F.; MIYARES, P. Salting-out solvent extraction for preconcentration of neutral polar organic solutes from water. **Analytical Chemistry**, **62**: 1355-1356, 1990.

MAŠTOVSKÁ, K. & LEHOTAY, S. J. Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticides residues. **Journal of Chromatography A**, **1040**: 259-272, 2004.

MATKOVICH, C. E. & CHRISTIAN, G. D. Salting-out of acetone from water basis of a new solvent extraction system. **Analytical Chemistry**, **45**: 1915-1921, 1973.

MIYAMOTO, J.; KANEKO, H.; TSUJI, R.; OKUMO, Y. Pyrethroids, nerve poisons: how their risks should be assessed to human health. **Toxicology Letters**, **82/83**: 933-940, 1995.

MOHNSEN, M. & HAHN, K. A new method for early detection of neurotoxic diseases (exemplified by pyrethroid poisoning). **Gesundheitswesen**, **57(4)**: 214-222, 1995.

MUCCIO, A. D.; PELOSI, P.; BARBINI, D. A.; GENERALI, T.; AUSILI, A.; VERGORI, F. Selective extraction of pyrethroid pesticide residues from milk by solid-matrix dispersion. **Journal of Chromatography A**, **765**: 51-60, 1997.

OBANA, H.; AKUTSU, K.; OKIHASHI, M.; HORI, S.; Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits using two-layered column with graphitized carbon and water absorbent polymer. **Analyst**, **126**: 1529-1534, 2001.

PERES, T. B.; PAPINI, S.; MARCHETTI, M.; NAKAGAWA, L. E.; MARCONDES, M. A.; ANDRÉA, M. M.; LUCHINI, L. C. Métodos de extração de agrotóxicos de diversas matrizes. **Arquivos do Instituto Biológico - São Paulo**, **69(4)**: 87-94, 2002.

PINHEIRO, A. S. & DÓREA, H. S. Determinação de monocrotofós, paration metílico e deltametrina em água por SPE e análise por GC/MS. In: 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latino-Americano de Química, 2004, Salvador, BA. Livro de Resumos. QA 007, 2004. Disponível em: <<http://143.107.52.76/sbq/repositorio/T22651E1.pdf>> Acesso em: 19 de julho de 2004.

RAMESH, A. & RAVI, P. E. Electron ionization gas chromatography–mass spectrometric determination of residues of thirteen pyrethroid insecticides in whole blood. **Journal of Chromatography B**, **802**: 371-376, 2004.

REICHENBERGER, S.; AMELUNG, W.; LAABS, V.; PINTO, A. TOTSCHKE, K. U.; ZECH, W. Pesticide displacement along preferential flow pathways in a Brazilian Oxisol. **Geoderma**, **110**: 63-86, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, **27(5)**: 771-780, 2004.

RITTER, W. F. Pesticide contamination of ground water in United States: a review. **Journal of Environmental Science and Health**, **25(1)**: 1-29, 1990.

RIZOS, C. L., AVRAMIDES, E. J., VISI, E. Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection. **Journal of Chromatography A**, **921**: 297-304, 2001.

SHAN, G.; HUANG, H.; STOUTAMIRE, D. W.; GEE, S. J.; LENG, G.; HAMMOCK, B. D. A sensitive class specific immunoassay for the detection of pyrethroid metabolites in human urine. **Chemical Research in Toxicology**, **17**: 218-225, 2004.

ŠTAJNBAHER, D. & KRALJ, A. Z. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography, A 1015:** 185-198, 2003.

TAUBE, J.; VORKAMP, K.; FORSTER, M.; HERRMANN, R. Pesticide residues in biological waste, **Chemosphere, 49:** 1357-1365, 2002.

TREVIZAN, L. R. P. **Resíduos de deltametrina em grãos de trigo, milho e milho de pipoca e em seus produtos processados, determinados por cromatografia em fase gasosa.** 1998. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Entomologia). Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1998.

TREVIZAN, L. R. P. & BAPTISTA, G. C. Resíduos de deltametrina em grãos de trigo e em seus produtos processados, determinados por cromatografia gasosa. **Scientia Agricola, 57(2):** 199-203, 2000.

TSUMURA, Y.; WADS, I.; FUJIWARA, Y.; NAKAMURA, Y.; TONOGAI, Y.; ITO, Y. Simultaneous determination of 13 synthetic pyrethroids and their metabolite, 3-phenoxybenzoic acid, in tea by gas chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42:** 2922-2925, 1994.

VENANT, A.; NESTE, E. V.; BORREL, S.; MALLET, J. Determination of residues of deltamethrin in milk and butter. **Food Additive and Contaminants, 7(1):** 117-123, 1990.

VINÃS, P.; CAMPILLO, N.; GÁRCIA, L. L.; AGUINAGA, N.; CÓRDOBA, M. H. Determination of pesticides in waters by capillary gas chromatography with atomic emission detection. **Journal of Chromatography A, 978:** 249-256, 2002.

YÁÑEZ, L.; PÉREZ, D. O.; BATRES, L. E.; ABURTO, V. H. B.; BARRIGA, F. D. Levels of dichlorodiphenyltrichloroethane and deltamethrin in humans and environmental samples in malarious areas of Mexico. **Environmental Research Section A, 88**: 74-181, 2002.

WHO - World Health Organization. Environmental Health Criteria 82, Cipermetrin. Genebra, 1989. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc82.htm>> Acesso em: 19 de julho de 2004.

WHO - World Health Organization. Environmental Health Criteria 94, Permetrin. Genebra, 1990a. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc94.htm>> Acesso em: 19 de julho de 2004.

WHO - World Health Organization. Environmental Health Criteria 97, Deltamethrin. Genebra, 1990b. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc97.htm>> Acesso em: 19 de julho de 2004.

WHO - World Health Organization. Environmental Health Criteria 99, Cyhalothrin. Genebra, 1990c. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc99.htm>> Acesso em: 19 de julho de 2004.

ZROSTLÍKOVÁ, J.; HAJŠLOVÁ, J.; ČAJKA, T. Evaluation of two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the determination of multiple pesticide residues in fruit. **Journal of Chromatography A, 1019**: 173-186, 2003.