

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE
DE AMITRAZ EM MEL UTILIZANDO GC/TSD

F.S. Silva e M.R.R. Marchi

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, UNESP – Univ. Estadual
Paulista – 14800-900, Araraquara(SP), Brasil

Resumo: Este artigo descreve a validação de método analítico para determinação do acaricida amitraz em mel utilizando extração com *n*-hexano/acetona, *cleanup* em cartucho de extração em fase sólida (SPE) e análise por cromatografia a gás com detector termoiônico seletivo (GC-TSD). O método pode ser utilizado para monitorar a presença do pesticida amitraz em mel, devido aos bons parâmetros analíticos, precisão (CV<11%) e exatidão (>80%) dentro do intervalo 100-400 ng g⁻¹. O limite estabelecido na União Européia, pelo *Committee for Veterinary Medicinal Products*, para amitraz em mel (200 ng g⁻¹) está dentro deste intervalo. A resposta do sistema analítico apresentou linearidade entre 100 e 800 ng mL⁻¹ com coeficiente de correlação de 0,9996, limite de detecção (LD-7 ng g⁻¹) e de quantificação (LQ-100 ng g⁻¹). O método validado foi utilizado para avaliar a qualidade de méis comercializados na cidade de Araraquara/SP, nas quais não foram detectados resíduos de amitraz.

Palavras-chave: Amitraz, validação analítica, mel, GC-TSD.

Introdução

O mel, obtido a partir do néctar das flores, é uma mistura de substâncias a qual o torna viscoso, aromático e açucarado [1]. Devido ao seu sabor característico, aroma agradável, valor nutritivo, propriedades medicinais e sensoriais têm atraído milhares de consumidores [1]. Segundo os dados da Confederação Brasileira de Apicultura (CBA), a produção de mel em 2008 no Brasil foi de aproximadamente 18 mil toneladas, gerando um faturamento de R\$80,1 milhões. [2]. Esta produção pode ser afetada por ácaros que causam seriíssimos danos econômicos para a apicultura de muitos países e que representa atualmente alta preocupação dos produtores ao redor do mundo [3].

Uma das pragas que afetam as colméias é o ácaro *Varroa jacobsoni*, também denominado *Varroa destructor* [3]. Foi detectado no Brasil desde 1978, e

atualmente pode ser encontrado em praticamente em todo o país [4]. Trata-se de um ácaro de coloração marrom, que infesta tanto crias como abelhas adultas, ficando aderidos principalmente na região torácica, sugando a hemolinfa das abelhas, podendo causar redução do peso, longevidade e deformações nas asas e patas da abelha [3]. O controle de ácaros como este se faz através da pulverização do acaricida amitraz (Figura 1) [5], conhecido comercialmente como Apivar e Mitac.

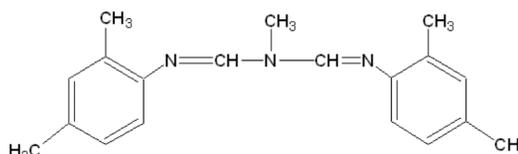


Figura 1. Fórmula estrutural do amitraz.

O Comitê para Produtos Medicinais Veterinários na Europa (*Committee for Veterinary Medicinal Products*) recomenda como limite máximo de resíduo (LMR) de amitraz em mel, a quantidade de 200 ng g⁻¹ [6]. No Brasil, este pesticida é proibido pela Lei Federal de Agrotóxicos [7], número 7802, aprovada em 1989, que proíbe o registro de produtos que possam provocar câncer (carcinogênese), defeitos na criança em gestação (teratogênese) e nas células (mutagênese). Porém este pesticida continua sendo comercializado ilegalmente [7].

Diante deste mercado tão ativo e da problemática educacional com o uso adequado de acaricidas, impõe-se a necessidade do controle de qualidade e monitoramento de méis, para que a população e o ambiente não se tornem vítimas desta substância.

Este contaminante tem sido determinado por muitas técnicas cromatográficas, seja por cromatografia líquida [8] ou cromatografia a gás [9]. Pela técnica de HPLC são utilizados os detectores de ultravioleta (UV) [10], arranjo de diodos (DAD) [11] ou espectrometria de massas (MS) [12] para a determinação de amitraz. Dos detectores para cromatografia a gás, o mais utilizado devido a sua seletividade e baixos limites de detecção é o detector termoiônico seletivo (TSD). Este detector é seletivo para compostos orgânicos contendo N e P na estrutura química. A cromatografia a gás com detecção de espectrometria de massas (GC/MS) também tem sido reportada [13,14], utilizando-se o modo de monitoramento seletivo de íons (SIM) para alcançar menores limites de detecção (6 ng g⁻¹) [15,16].

Neste trabalho buscou-se otimizar e validar um método que permitisse a análise de amitraz em mel e que ao mesmo tempo fosse simples (poucas etapas), de baixo custo e apresentasse seletividade, precisão e exatidão adequadas. Os parâmetros envolvidos na validação foram: seletividade, intervalo de trabalho, linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). Após a validação analítica, méis comercializados na cidade de Araraquara (SP) foram analisados.

Materiais e método

O padrão de amitraz utilizado foi obtido da Sigma-Aldrich (Riedel-de-Haën, Alemanha) com 99,4% de pureza. Os solventes foram: *n*-hexano,

acetona e acetato de etila grau P.A. (JT Baker, Xalostoc, México); cartuchos SPE (C-18, 500 mg) da marca J.T.Baker (Bakerbond, USA). Os equipamentos utilizados foram: cromatógrafo a gás Varian (Walnut Creek, CA, USA), modelo 3800, acoplado a workstation Star Chromatographic, injetor split/splitless, coluna capilar Supelco (30mx0,25mmx0,25µm) SPB-5 (5% fenil/95% dimetilpolisiloxano), com detector termoiônico seletivo (TSD), banho termostatizado (Tecnal TE-210); banho de ultrassom (Thornton-T50220, 40 KHz), balança analítica (Mettler Toledo AG 245), agitador de tubos (Phoenix Model AP56) e centrífuga (Excelsa Baby I® 206).

O método aqui otimizado e validado foi adaptado da proposta de Jimenez e colaboradores [17], que consistiu em aquecimento de 2 g de mel a temperatura 35µC, extração com 3 x 15 mL de hexano:acetona (80:20, v/v) durante 10 minutos em agitador de tubos com rotação de 700 rpm. A fase orgânica foi coletada e o extrato foi concentrado até 5 mL sob fluxo brando de nitrogênio. Realizou-se a eliminação dos interferentes do extrato em cartucho de SPE (C-18), eluição com 5 mL de hexano:acetona 80:20 (v/v), secagem com fluxo brando de N₂, solubilização em 1 mL de hexano:acetona 80:20, e análise por GC-TSD.

Condições cromatográficas

As condições cromatográficas do GC-TSD foram: modo de injeção: split/splitless (5:1); Injetor: 250°C; Detector: 300°C e corrente da pérola de 3,0 A. A temperatura inicial da coluna (70°C) foi mantida por 1 min, a seguir utilizou-se taxa de aquecimento de 20°C/min até 220°C, sendo a temperatura mantida neste valor por 7 min. Uma nova rampa de aquecimento (10°C/min) foi utilizada para atingir 280°C, mantendo-se esta última temperatura por 5 min. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1 mL min⁻¹. A vazão dos gases da chama, hidrogênio e ar sintético, foram 4 mL min⁻¹ e 80 mL min⁻¹, respectivamente, enquanto que o gás auxiliar (make-up) (N₂) foi utilizado a 30 mL min⁻¹. O volume de injeção foi 1 µL.

Amostras fortificadas

Para todas as etapas do estudo de otimização e validação do método foram utilizadas amostras

fortificadas, pois não há material de referência certificado que seja constituído por mel contendo amitraz. Para obtenção das amostras fortificadas utilizou-se mel adquirido no comércio varejista de Araraquara, ao qual foram adicionadas concentrações adequadas de amitraz, através de soluções-padrão, após a homogeneização por cerca de 2 min em agitador de tubos (700 rpm) as amostras foram deixadas em repouso por 24 horas em frasco de vidro âmbar, fechado e sob refrigeração. Depois deste período as amostras fortificadas foram submetidas à análise.

Resultados e discussão

Otimização da resposta do sistema cromatográfico

Utilizando-se as condições cromatográficas reportadas na literatura [17] e uma solução padrão de amitraz de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ não foi possível obter nenhuma resposta no sistema GC/TSD. Desta maneira, foram otimizados os parâmetros: modo de injeção, proporção entre os gases da chama e corrente da pérola. As Figuras 2, 3 e 4 apresentam cromatogramas que ilustram o ganho de resposta obtido com a otimização efetuada.

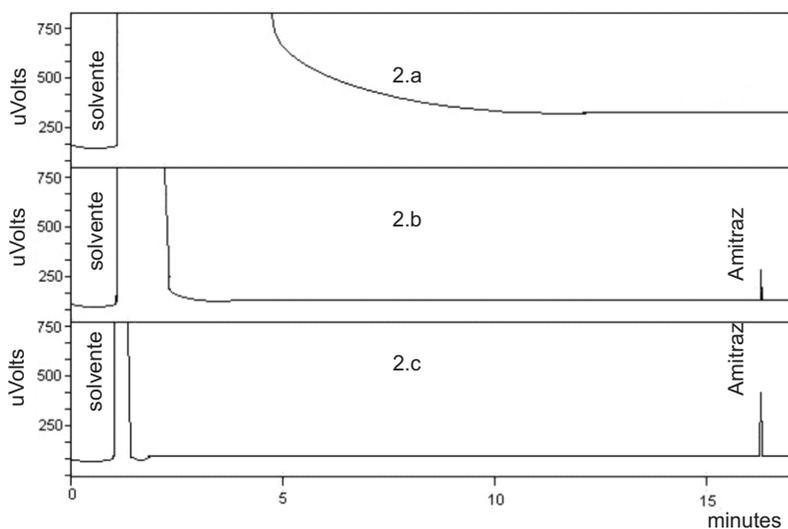


Figura 2. Cromatogramas com diferentes injeções - 2.a: injeção no modo splitless., 2.b: injeção split: 5 e 2.c: injeção split/splitless (split:5).

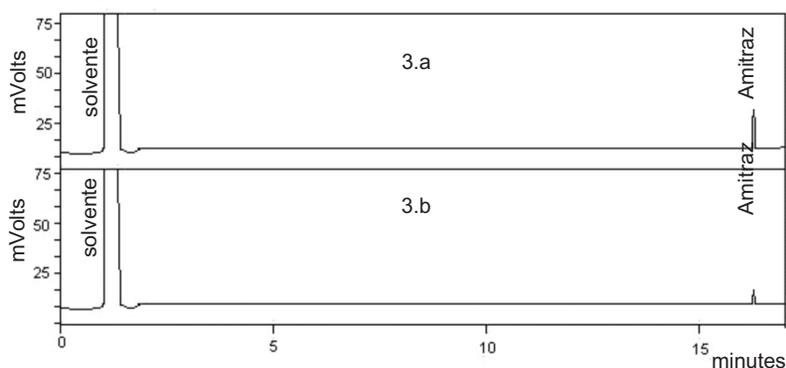


Figura 3. Cromatogramas com diferentes relações entre os gases da chama Ar sintético/H₂ - 3.a: Mais Oxidante: Relação Ar/H₂: 20/1, 3.b: Menos oxidante: Relação Ar/H₂: 5/1.

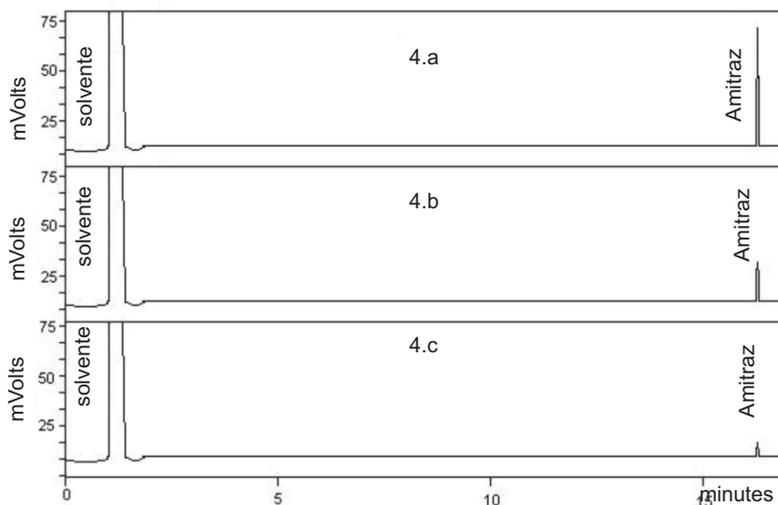


Figura 4. Cromatogramas com diferentes correntes da pérola - 4.a: 3,5 Amperes, 4.b: 3,0 Amperes e 4.c: 2,6 Amperes.

Apesar da melhor resposta analítica na Figura 4.a (3,5 A), não foi utilizada esta condição devido ao menor tempo de vida da pérola, portanto utilizou-se a corrente de 3,0 A.

Intervalo de linearidade da resposta do sistema GC/TSD

Foram injetadas, em triplicata, soluções padrão de amitraz em hexano:acetona (80:20, v/v), no intervalo de 100 a 800 ng mL⁻¹, perfazendo um total de 8 concentrações. Para avaliação da região

linear, foi utilizado o teste de Huber para excluir pontos anômalos [18], como mostra a Figura 5. Os pontos que estavam incluídos na região linear foram utilizados para a construção da curva analítica, apresentada na mesma Figura. Os parâmetros obtidos para esta curva denotam a ótima correlação linear ($r^2 = 0,996$) e a sensibilidade da resposta, dada pelo coeficiente angular da curva de 5,40. Utilizando os parâmetros da curva é possível determinar o limite de detecção e de quantificação do sistema GC/TSD para amitraz [19], que foram 16 e 48 ng mL⁻¹, respectivamente.

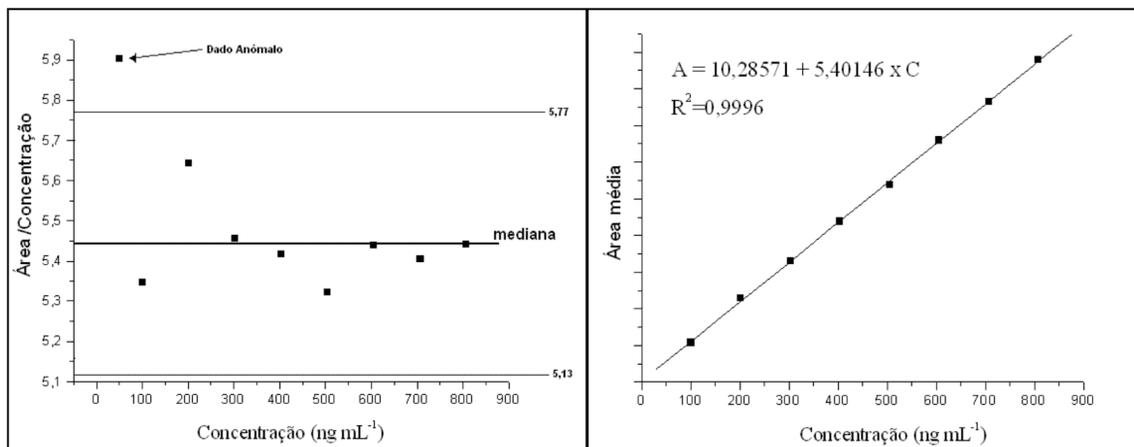


Figura 5. Determinação gráfica das curvas de linearidade através da: a) gráfico de linearidade; b) curva analítica.

Seletividade do método

Na Figura 6, são comparados os cromatogramas da amostra fortificada com amitraz e da amostra testemunha (amostra isenta de contaminação pelo

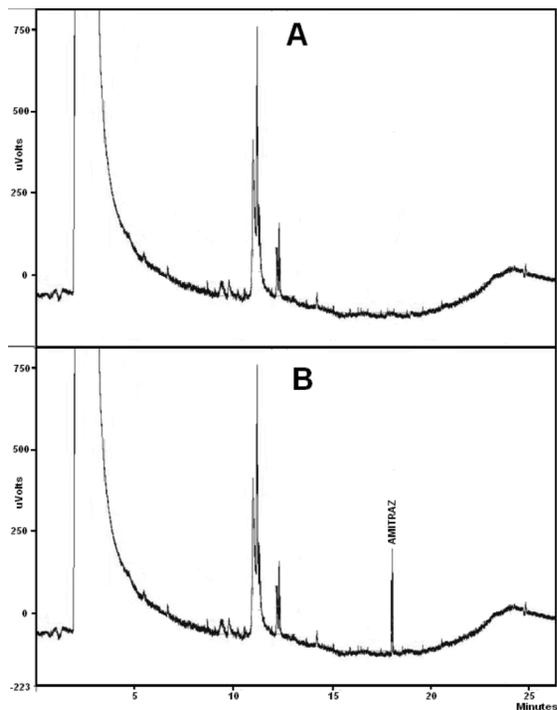


Figura 6. Cromatogramas referentes à amostra testemunha, amostra in natura (A) e a amostra fortificada (B).

analito). Observa-se que não ocorrem interferentes da amostra testemunha no tempo de retenção do amitraz (18,3 min). Não pôde ser efetuada a análise em menor tempo devido à observação de compostos presentes na matriz no intervalo de 6 a 13,5 min.

É importante notar que a seletividade desempenha importante função na validação analítica, pois se esta não for assegurada, a linearidade, a precisão e a exatidão estarão seriamente comprometidas [19].

Exatidão e precisão

A exatidão do método foi estimada pelo fator de recuperação, R, que é definido como a quantidade do analito adicionado à amostra, que é extraída e quantificada [14]. A recuperação é calculada da seguinte maneira:

$$Recuperação(\%) = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100$$

onde, C₁ = Concentração determinada na matriz fortificada; C₂=Concentração determinada na matriz isenta de fortificação; C₃= Concentração adicionada à matriz fortificada.

Tabela 1. Modo de injeção split/splitless.

Tempo (min)	Split	Razão Split
Inicial	Ligado	5
0,01	Desligado	Desligado
1	Ligado	5

Tabela 2. Exatidão (recuperação) e precisão (CV) do método, utilizando amostras enriquecidas com o analito.

Amitraz adicionado (ng g ⁻¹)	Concentração obtida (ng g ⁻¹)	Recuperação (%) ^a	CV ^b
100	82	80	2,5
	77		
	80		
200	182	88	5,5
	176		
	171		
400	367	92	11
	379		
	357		

a – Recuperação média (n=3);

b – CV – Coeficiente de variação médio (n=3).

A exatidão foi determinada utilizando 9 determinações, sendo estas com 3 níveis de concentração em triplicata [20]. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

A amostra foi fortificada no início (100 ng g⁻¹), meio (200 ng g⁻¹) e fim (400 ng g⁻¹) da curva de calibração, obtendo recuperações médias de 80, 88 e 92%, respectivamente.

Os resultados se encontram dentro do intervalo de 70 a 120%, e isto mostra que o método é exato, conforme preconizado pela literatura para a análise de resíduos de pesticidas [20]. A precisão do método foi estimada pela dispersão dos resultados expressa pelo coeficiente de variação e mostra que o método é preciso, pois os valores encontrados foram menor que 20% [20].

Teste t para avaliação da recuperação

Uma outra maneira de avaliar a exatidão do método é a utilização do teste t de Student [21]. Para isto foram utilizadas as médias dos três níveis de fortificação aplicando o teste de hipótese. Estabeleceu-se como hipótese nula (H₀): $\mu = 100\%$ de recuperação e como segunda hipótese (H1) $\mu \neq 100\%$ de recuperação. O valor de t experimental foi calculado de acordo com a seguinte equação [22]:

$$t_{\text{exp}} = \frac{(\bar{X}_{\text{rec}} - \mu)\sqrt{n}}{S_{\text{Rec}}}$$

onde: \bar{X}_{rec} é a média de recuperação do método, μ é o valor esperado para a recuperação (100%), n é o tamanho da amostra, igual a 3, e S_{Rec} o desvio padrão das médias de recuperação de cada nível fortificado (Tabela 3).

O valor de t tabelado (t_{tab}) com 95% de confiança e n-1 graus de liberdade é 4,3, valor maior que o calculado ($t_{\text{cal}} = 3,7$), portanto aceita-se a hipótese nula (H₀), ou seja, não há diferença significativa entre o valor quantificado e o valor adicionado na amostra. Portanto o método tem exatidão para avaliação de amitraz em amostras de mel.

Limite de Detecção e Quantificação

Segundo Thier (23), nenhum sinal deveria ser obtido para a amostra controle. Entretanto, sinais de "resíduos aparentes" podem ocorrer e são chamados sinais do branco. Eles podem ser devido a algumas causas que podem simular a presença dos resíduos como: co-extrativos não removidos, impurezas de solventes ou reagentes ou ruídos do instrumento.

O LD pode ser estimado a partir dos resultados de um estudo de recuperação, utilizando as equações apresentadas abaixo:

sendo:

$$LD = \frac{2 \times t_{f,95} \times \sigma_{\text{com}}}{S} \quad \sigma_{\text{com}} = \sqrt{\frac{(m-1)\sigma_A^2 + (n-1)\sigma_B^2}{m+n-2}}$$

σ_A -desvio padrão estimado a partir do estudo de recuperação com o menor nível de fortificação.

σ_B -desvio padrão obtido com a aplicação do método à amostra controle.

m -número de repetições da aplicação do método à amostra com menor nível de fortificação.

n -número de repetições da aplicação do método à amostra controle.

f -número de graus de liberdade, estimado por $m+n-2$.

S -sensibilidade do sistema analítico.

Tabela 3. Recuperações médias para cada nível de fortificação, recuperação obtida, desvio padrão e valor de t calculado.

Nível fortificado	Recuperação obtida*	X_{REC} (%) ^a	S_{REC} ^b	t_{exp} ^c
100	80			
200	88	86,5	6,3	3,7
400	92			

*Médias de recuperação para cada nível fortificado;

a - Média de recuperação do método (n=3), obtida através da quantificação das amostras fortificadas

b - Desvio padrão das médias das recuperações dos níveis estudados;

c - t de Student calculado.

O limite de detecção do método foi de 7 ng g^{-1} enquanto o limite de quantificação foi de 100 ng g^{-1} . O limite de quantificação foi adequado, pois foi inferior ao limite máximo de resíduos (LMR) estabelecido pela União Européia (200 ng g^{-1}), o que possibilita a aplicação deste método na averiguação do nível de contaminação neste tipo de alimento.

O método aqui validado apresentou semelhança com outros trabalhos na literatura [15, 24] quanto aos parâmetros de exatidão (recuperação > 70%) e precisão (<11%). Entretanto, a comparação

dos limites de detecção e quantificação do método, com o que é apresentado na literatura, não é possível, uma vez que os artigos não explicitam se os limites apresentados referem-se ao sistema analítico (limite instrumental) ou ao método, conforme a Tabela 4.

Análise de amostras de mel comercializadas em Araraquara.

O método proposto e validado, foi utilizado para avaliar a ocorrência de amitraz em amostras de

Tabela 4. Comparação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) com outros trabalhos descritos na literatura.

Referência	LD ^a (ng g^{-1})	LQ ^b (ng g^{-1})	Tipo de Extração	Deteção
Este trabalho*	7	100	Líquido-sólido com agitação	GC/TSD ^c
Rial-Otero et al. [15]	6	15	Micro-extração em fase sólida	GC/MS ^d (modo SIM ^e)
Shamsipur [24]	10	30	Headspace	GC/TSD ^c
Jiménez et al.[25]	2	-	Extração em fase sólida	GC/ECD ^f
Korta et al. [26]	0,2	0,6	Extração em fase sólida	HPLC/MS/MS ^g

^aLD - Limite de detecção;

^bLQ - Limite de quantificação;

^cGC/TSD – Cromatografia Gasosa com Detector termoiônico;

^dGC/MS – Cromatografia Gasosa com Detector de Espectrometria de Massas;

^eSIM – Monitoramento Seletivo de Íons;

^fGC/MS – Cromatografia Gasosa com Detector de Captura de Elétrons;

^gHPLC/MS/MS – Cromatografia Líquida de Alta Performance com Detector de Espectrometria de Massas/Espectrometria de Massas.

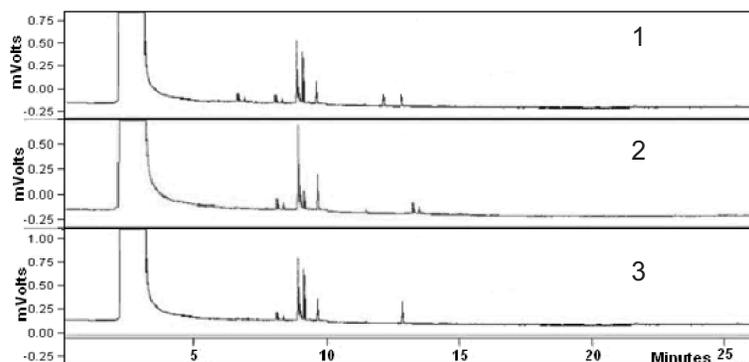


Figura 7. Cromatogramas obtidos no GC-TSD de méis obtidos no comércio de Araraquara: Mel 1 – In natura; Mel 2 e 3: Industrializados.

méis obtidas do comércio varejista e diretamente com coletores de mel silvestre na cidade de Araraquara-SP.

As análises para a determinação de amitraz foram realizadas em triplicata, não sendo detectados resíduos de amitraz nos méis obtidos, dentro dos limites estabelecidos ($< 100 \text{ ng g}^{-1}$), conforme os cromatogramas da Figura 7.

Há muitos métodos para a determinação de amitraz em mel na literatura [12,24,11,25] porém são poucos os trabalhos que apresentam aplicações em amostras disponíveis para a população através do comércio local. O único trabalho encontrado na literatura e que analisou mel comercializado para a população foi o efetuado por Rial-Otero et al. [15], no qual foram avaliados 11 méis em provenientes de diferentes localidades em Portugal [15] e que também não observaram resíduos de amitraz em nenhuma amostra.

Conclusão

Estabeleceu-se um método seletivo, sensível, preciso e exato, para análise de amitraz em mel de

abelhas. Este método é semelhante aos descritos na literatura, tendo como vantagem de ser simples e rápido. Cabe salientar que este trabalho apresenta dados de limites de detecção e quantificação para o método proposto, o que não ocorre com nenhum trabalho existente na literatura sobre este mesmo tema.

O valor do limite de quantificação para determinação de amitraz em mel (100 ng g^{-1}) foi menor do que o limite máximo de resíduos (LMR) estabelecido pela União Européia (200 ng g^{-1}). O método foi aplicado na análise de mel comercializado na cidade de Araraquara-SP, demonstrando que estas estavam isentas de resíduos de amitraz.

Considerando que a legislação brasileira não avalia a qualidade do mel quanto à presença de amitraz e compostos orgânicos tóxicos, o método validado pode ser utilizado em estudos de monitoramento para avaliar a qualidade de mel quanto à presença deste contaminante.

Agradecimentos

Agradecimentos a FAPESP processo (2004-03/13906-6) pelo suporte financeiro.

F.S.Silva, M.R.R de Marchi. Validation of the analytical method for analysis of the amitraz in honey using GC-TSD.

Abstract: This paper describes the validation of method for analysis of the acaricide amitraz in honey using *n*-hexane/acetone extraction, cleanup in cartridge of solid phase extraction (SPE) and analysis by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detector (GC -TSD). The method can be used to monitor the presence of the pesticide amitraz in honey because of its good analytical parameters, precision (CV $< 11\%$) and accuracy ($> 80\%$) in the range of $100\text{-}400 \text{ ng g}^{-1}$. The limit set in the European Union, by Committee for Veterinary Medicinal Products, for amitraz in honey (200 ng g^{-1}) is within this range. The response of the analytical system was linear between 100 and 800 ng mL^{-1} with correlation coefficient of 0.9996 , limit of detection (LD -7 ng g^{-1}) and quantification (LQ -100 ng g^{-1}). The sample was fortified at three concentrations 100 ng g^{-1} , 200 ng g^{-1} and 400 ng g^{-1} , giving an average recovery of 80 , 88 and 92% respectively. The validated method was used to assess the quality of honey sold in the city of Araraquara/SP, in which there were no residues of amitraz.

Keywords: Amitraz, validation method, honey, GC-TSD

Referências Bibliográficas

- [1] E. Crane, O livro do mel, São Paulo, 2ª ed., 1996, Nobel, p. 226.
- [2] Estatísticas. Disponível em: <www.brasilapicola.com.br/?q=node/100>. Acesso em: 01 Fev. 2010.
- [3] G. L. B. Junior, A. S. Felipe-Silva, P. L. L. Pereira, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61 (6) (2009) 1471.
- [4] F. M. Pereira, M. T. R. Lopes, R. C. R. Camargo, S. L. O. Paula, Doenças e Inimigos Naturais das Abelhas. Disponível em <<http://www.apis.sebrae.com.br/outras.htm>>. Acesso em: 01 Fev. 2010.
- [5] M. E. Sato, A. Raga, L. C. Cerávolo, A. C. Cezário, A. C. Rossi, Sci. agric. 52 (2) (1995), 282.
- [6] Committee for Veterinary Medicinal Products, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA/MRL/077/96-Final. Disponível em <www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/087203en.pdf>. Acesso em 30 Jan. 2010.
- [7] G. Lucchese, Agotóxicos – Construção da legislação. Disponível em <<http://www.sindipetro.org.br/extra/cartilha-cut/11agrototoxicos.htm>>. Acesso em 09 Dez. 2009.
- [8] A. Jones, C. MacCoy, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 2143.
- [9] S. Rossi, A. P. Dalpero, S. Ghini, R. Colombo, A. G. Sabatini, S. Girotti, J. Chromatogr. A. 905 (2001) 223.
- [10] E. Korta, A. Bakkali, L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, V. Kilchenmann, S. J. Bogdanov, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 5835.
- [11] A. C. Martel, S. Zeggane, J. Chromatogr. A. 954 (2002) 173.
- [12] D. Debayle, G. Dessalces, M. F. Grenier-Loustalot, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 1011.
- [13] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J. L. Tadeo, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 5828.
- [14] M. A. Fernández Muiño, J. Simal, Analyst. 118 (1993) 1519.
- [15] R. Rial-Otero, E. M. Gaspar, I. Moura, J. L. Capelo, Talanta. 71 (2007) 1906.
- [16] E. Korta, A. Bakkali, L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, S. Bogdanov, Anal. Chim. Acta. 475 (2003) 97.
- [17] J. J. Jiménez, J. L. Bernal, J. Atienza, Chromatographia. 42 (3) (1996) 130.
- [18] L. P. V. Valente, C. R. F. Riedo, F. Augusto, Análise quantitativa por cromatografia. 10p. (2003). Disponível em <<http://chemkeys.com/br>>. Acesso em 03 Fev. 2010.
- [19] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, Quim. Nova. 27 (5) (2004) 771.
- [20] Validation of analytical procedures: Text and methodology. Q2 (R1). Disponível em: <<http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>>. Acesso em Janeiro de 2010.
- [21] N. M. Brito, M. L. Ribeiro, O. P. Amarante Junior, L. Polese, Pesticidas: R. Ecotox. e Meio Ambiente. 13 (2003) 129.
- [22] P. C. Méier, R. E. Zund, Statistical Methods in Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Canada, 2nd edn., 2000, cap. 2.
- [23] H. P. Thier, H. Zeumer, Manual of pesticides analysis, Verlag Chemie, New York, 1987, pag. 433.
- [24] M. Shamsipur, J. Hassan, J. Salar-Amoli, Y. Yamini, J. Food Compos. Anal. 21 (2008) 264–270.
- [25] J. J. Jiménez, M. J. Nozal, J. L. Bernal, M. Santos, Anal. Bioanal. Chem. 374 (2002) 300.
- [26] E. Korta, A. Bakkali, L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, J. Chromatogr. A. 930 (2001) 21.

