

A LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD FOR DETERMINATION OF PYRETHROIDS INSECTICIDES RESIDUES IN BEANS.

Sérgio Henrique Monteiro⁽¹⁾, Cláudia Helena Pastor Ciscato⁽¹⁾, Amir Bertoni Gebara⁽¹⁾ e Jorge Cesar Masini⁽²⁾

⁽¹⁾Laboratório de Resíduos de Pesticidas, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, Vila Mariana, 04014-002 São Paulo – SP, Brasil. E-mail: monteiro@biologico.sp.gov.br, ciscato@biologico.sp.gov.br, gebara@biologico.sp.gov.br

⁽²⁾Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, Butantã, 05508-000, São Paulo – SP, Brasil. E-mail: jcmasini@iq.usp.br

A rapid liquid chromatographic (LC) method was developed for simultaneous determination of 7 pyrethroid insecticides in beans. Residues were extracted from beans with acetone, followed by partition with ethyl acetate/cyclohexane (1+1) and clean up by gel-permeation chromatography. LC separation was performed on a LiChrospher 100 RP-18 column using acetonitrile/water (8+2) as mobile phase. The pesticides were detected by molecular absorption spectrophotometry at 212 nm. Recoveries of 7 pyrethroids fortified at 0.010; 0.10; 1.0 mg kg⁻¹ levels were within the range 71-105 %. Advantageous features of this method are: the quantification limits, which were between 0.004 and 0.011 mg kg⁻¹, and the simplicity in the sample treatment, which requires less clean-up if compared with the GC-ECD determination. No residues of pyrethroids were detected in 48 bean samples commercialized in São Paulo City during 2008.

Key words: pesticide residue determination, high performance liquid chromatography, method development, method validation

Introdução

De acordo com Head, citado por Hirata [1], as piretrinas são extraídas de flores da *Chrysanthemum Cinerariaefolium*, muito semelhante a margarida comum; as propriedades destas plantas são conhecidas pelo menos desde o primeiro século da nossa era, como testemunhado pelos chineses, mas foram os comerciantes armênios que a trouxeram do Cáucaso e de regiões vizinhas, para a Europa Ocidental [2]. O piretro utilizado há aproximadamente 400 anos no controle de insetos, era conhecido como o “Pó da Pérsia”. Em 1880 o piretro foi introduzido no Japão, que passou a exportá-lo em 1886, tendo sido, até a Primeira Guerra Mundial, o principal produtor [3].

Os resultados levantados nas avaliações de resíduos de pesticidas servem para dar suporte aos serviços governamentais de extensão agrícola, para aperfeiçoar o uso de pesticidas e práticas de aplicação por agricultores, bem como para minimizar os riscos ao

consumidor [4].

Para dar suporte ao monitoramento de resíduos de pesticidas, novas técnicas e métodos são necessários para melhorar a qualidade da análise e também facilitar o trabalho dos analistas.

Hoje em dia muitos métodos modernos são propostos para esta finalidade, como os métodos descritos na revisão da literatura feita por Prestes et al. [5], porém, na maioria das vezes os laboratórios não possuem estrutura e tecnologia para utilizar esses métodos.

A cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é uma técnica alternativa para a detecção e quantificação de alguns pesticidas, em especial os piretróides que possuem alta massa molecular em comparação com a maioria dos pesticidas.

Usualmente os resíduos de inseticidas piretróides são determinados por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (CG-ECD) ou detector de espectrometria de massa (CG-MS), como citado por Vieira et al. [6], porém a determinação de piretróides por cromatografia a gás, principalmente quando colunas

capilares são utilizadas, identificam vários isômeros que muitas vezes não são separados de forma satisfatória, apresentando baixa resolução cromatográfica. Na determinação por CLAE, utilizando colunas de fase reversa, esta dificuldade é descartada devido a observação de apenas um pico para cada piretróide, salvo para permetrina que apresenta seus isômeros cis e trans com ótima resolução.

Para uma otimização no emprego de CLAE e CG em análise de resíduos de pesticidas em alimentos (origem vegetal e animal) e amostras ambientais, é necessário que ocorra um preparo adequado da matriz a ser analisada utilizando técnicas apropriadas, como também, na extração, purificação, identificação e quantificação dos pesticidas. A CLAE permite a determinação de compostos não voláteis e termo-lábeis e, além disso, o método não requer a perfeita limpeza (clean-up) das amostras, como acontece no emprego do CG-ECD [7].

Segundo informações recolhidas na página eletrônica da EMBRAPA, o feijão é um alimento básico para o brasileiro, chegando a ser um componente obrigatório na dieta diária da população. A média atual de consumo de feijão é de 14,9 kg/brasileiro/ano. A preferência do consumidor é regionalizada e diferenciada principalmente quanto à cor e ao tipo de grão [8].

A validação de um método estabelece, através de estudos sistemáticos de laboratório, que o método é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico [9].

Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem: Especificidade/Seletividade, Função de Resposta (curva analítica), Intervalo de Trabalho (Faixa), Linearidade, Exatidão, Precisão, Limite de Detecção e Limite de Quantificação [10].

No presente trabalho será descrito o desenvolvimento e a validação de um método de cromatografia de fase líquida, com detecção por espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta, para determinação de resíduos de piretróides em feijão.

Material e Métodos

Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados no método foram: Sulfato de sódio PA (Quimex); Cloreto de sódio PA (Quimex); Acetona RP (Tedia); Acetato de etila RP (Tedia); Ciclohexano RP (Tedia); Resina BIO-BEADS[®] SX3 (Bio-Rad); Acetonitrila HPLC (Tedia); Água grau I.

Os padrões primários dos produtos, fenvaler-

ato 99% (Riedel-de-Haën), fempropatrina 97% (Riedel-de-Haën), deltametrina 99,15% (Ultra Scientific), lambda-cialotrina 99% (Accustandard), cipermetrina 98% (Ultra Scientific), bifentrina 99,7% (Accustandard) e permetrina 99,6% (Dr. Ehrenstorfer), foram inicialmente dissolvidos em acetonitrila, preparando-se soluções estoques de concentrações 1000 ng μL^{-1} . As demais soluções foram preparadas em acetonitrila/água (8+2).

Extração

Pesar em frasco reagente de 250 mL, 20 g de amostra previamente triturada e homogeneizada. Utilizar para isso uma balança analítica com resolução até 0,1 mg. Adicionar 36,5 g de água desionizada e homogeneizar agitando manualmente. Adicionar 100 mL de acetona. Homogeneizar no Ultra Turrax[®] por 3 minutos. Adicionar 17,5 g de NaCl. Homogeneizar no Ultra Turrax[®] por mais 1 minuto.

Partição

Adicionar 50 mL de solução acetato de etila/ciclohexano (1+1). Homogeneizar no Ultra Turrax[®] por 1 minuto. Deixar em repouso para separar as fases por aproximadamente 30 minutos. Coletar 100 mL da fase orgânica (sobrenadante). Filtrar em funil analítico com algodão coberto com 50 g de sulfato de sódio anidro, recolhendo o filtrado em balão de fundo redondo de 250 mL. Lavar o sulfato de sódio duas vezes com 10 mL de solução acetato de etila/ciclohexano (1+1). Concentrar no evaporador rotativo a 40° C e 40 psi até o volume de aproximadamente 2 mL. Secar com fluxo suave de nitrogênio. Ressuspender em 10 mL da solução acetato de etila/ciclohexano (1+1).

Purificação em coluna de cromatografia de permeação a gel (GPC)

Filtrar os 10 mL obtidos anteriormente em Na_2SO_4 anidro com auxílio de funil pequeno de vidro e algodão lavado com diclorometano. Injetar 5 mL, da solução filtrada, no GPC com vazão de 5 mL min^{-1} usando a solução acetato de etila/ciclohexano (1+1) como eluente. Desprezar a solução eluída referente aos primeiros 18 minutos (90 mL). Recolher em balão de 250 mL os próximos 110 mL, onde se encontram os piretróides. Este volume corresponde a 22 minutos de tempo de eluição. Efetuar a limpeza do GPC eluindo a solução por mais 5 minutos (25 mL). Concentrar em evaporador rotativo, a 40°C e pressão de 55 psi, os 110 mL recolhidos no GPC até um volume de aproximadamente 2 mL. Secar com fluxo

suave de N₂. Lavar o balão com 5 mL de acetonitrila/água (8+2) e recolher em tubo graduado de 10 mL com rosca esmerilhada. Injetar 100 µL no cromatógrafo a líquido com detector UV-Visível.

Condições cromatográficas

Cromatógrafo de fase líquida Varian®: Bomba 9012, Detector UV-Visível 9050; Coluna: Merck® LiChrospher® RP 18 5 µm x 15 cm x 0,46 mm; Vazão: 0,8 mL min⁻¹; Tempo de corrida: 30 minutos; Tempo de estabilização: 2 minutos; Comprimento de onda: 212 nm; Volume de injeção: 100 µL; Fase móvel: acetonitrila/água (8+2); Integrador 4400 Varian®; Atenuação: 16; Velocidade do papel: 0,5 cm min⁻¹; Inibição de integração: integrar após 11 min; Tipo de integração: Valley-to-Valley Baselines.

Validação

Os parâmetros de validação estudados foram: Especificidade/Seletividade, Função de Resposta (curva analítica), Intervalo de Trabalho (Faixa), Linearidade, Exatidão, Precisão (Repetitividade e Reprodutibilidade), Limite de Detecção e Limite de Quantificação.

Para avaliação da Função de Resposta/Intervalo de Trabalho/Linearidade foram construídas curvas analíticas de calibração para cada piretróide com concentrações entre 0,02 a 2,00 ng mL⁻¹, cobrindo toda a faixa de resposta obtida nos três níveis de fortificação estudados, obtidas a partir de 3 injeções consecutivas de 8 concentrações de soluções-padrão injetadas em ordem crescente de suas concentrações.

Limite de Detecção/Limite de Quantificação: O limite de detecção foi calculado como a razão sinal/ruído com valores de 2:1 e o limite de quantificação foi estabelecido pela razão sinal/ruído 10:1, obtida por meio da comparação dos sinais medidos da amostra com baixas concentrações conhecidas do analito, com as do branco [11, 12, 13, 14].

Seletividade: Foram analisadas 7 repetições do branco (amostras testemunhas de feijão adquiridas com produtores orgânicos) para observar a não interferência de picos na região cromatográfica de interesse.

Além disso, uma amostra fortificada foi injetada em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons, comparando-se os tempos de retenção com os tempos característicos dos padrões de piretróides injetados nas mesmas condições.

Exatidão/Precisão: As amostras testemunhas de feijão foram fortificadas em 3 níveis: 0,010; 0,10 e 1,0 mg kg⁻¹ e realizadas 7 repetições para cada nível. Os

valores de recuperação e coeficiente de variação foram comparados com os intervalos propostos por diferentes órgãos como Codex Alimentarius, SANCO, EPA e AOAC/FAO/IAEA/IUPAC.

Amostras analisadas

Foram analisadas 48 amostras de feijão adquiridas no comércio varejista da cidade de São Paulo durante o ano de 2008 e coletadas aleatoriamente. As amostras foram analisadas no mesmo dia em que deram entrada no laboratório.

Resultados e Discussão

Cultura Estudada

Os critérios para a escolha da cultura estudada seguiram dois princípios: as culturas mais sujeitas à aplicação de pesticidas piretróides e a maior porcentagem de comercialização destas culturas no país.

Desta forma foi escolhido o feijão para ser estudado, pois, além do grande consumo deste produto pelos brasileiros, ele também apresenta registro para a maioria dos piretróides estudados, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Limites máximos de resíduo permitido dos piretróides estudados, na cultura de feijão [15].

Piretróides	Modalidade de emprego	LMR* (mg kg ⁻¹)	Intervalo de segurança
Permetrina		Sem registro	
Cipermetrina	foliar	0,05	14 dias
Fenvalerato		Sem registro	
Fenpropatrina	foliar	0,01	14 dias
Deltametrina	foliar	0,2	16 dias
	armazenado	0,2	30 dias
Lambda-cialotrina	foliar	0,05	15 dias
Bifentrina	foliar	0,02	20 dias

*Limite Máximo de Resíduo

Condições cromatográficas

Foram realizados estudos para a verificação das melhores condições de análise, variando-se os seguintes parâmetros: fase estacionária, fase móvel, vazão da fase móvel e comprimento de onda.

Os comprimentos de onda utilizados para a

determinação dos piretróides foram selecionados a partir dos espectros de absorção molecular na região do UV-Vis obtidos entre 190 e 400 nm. O comprimento de onda de 212 nm apresentou melhor resultado, onde os piretróides apresentaram maior absorvidade, com menor variação da linha de base cromatográfica.

Com injeções nas condições cromatográficas apresentadas em “Material e Métodos”, observa-se as resoluções cromatográficas apresentadas na Tabela 2. A resolução foi maior que 1,5 para todos os picos e desta forma é possível a determinação quantitativa para todos os piretróides na mesma amostra.

Tabela 2 – Valores de resolução dos picos para solução padrão 0,02 ng μ L⁻¹.

Piretróides	Resolução
Fenpropratrina/Lambda-cialotrina	1,6
Lambda-cialotrina/Fenvalerato	1,5
Fenvalerato/Bifentrina	8,5
Cipermetrina/Deltametrina	2,0
Deltametrina/Cis-permetrina	3,7
Cis-permetrina/Trans-permetrina	3,3

Metodologia de extração e purificação da amostra:

A técnica de extração utilizada foi a mesma descrita no método DFG-S19 [16, 17], com modificações [18], sendo utilizados apenas 100 mL de acetona em 20 g de amostra. Foi realizada uma partição utilizando apenas 50 mL de acetato de etila/ciclohexano (1+1), seguindo-se a purificação por cromatografia de permeação em gel (GPC), também utilizada no método DFG-S19, com modificações.

Validação do método

Os piretróides apresentam vários isômeros, muitas vezes de difícil separação. A cromatografia líquida de fase reversa de modo geral não separa os isômeros, com exceção da permetrina, que apresentou os picos referentes a suas formas cis e trans. Essa característica facilita a interpretação dos cromatogramas, sem prejudicar a informação sobre presença ou não de

um dado piretróide.

Observa-se na Tabela 3 que todos os piretróides apresentaram coeficientes de correlação $> 0,997$, indicando uma linearidade de resposta nas condições cromatográficas especificadas, o que demonstra a habilidade do método em obter os resultados de teste proporcionais a concentração dos piretróides estudados, na faixa de trabalho pretendida.

Tabela 3 - Dados da equação linear e coeficiente de correlação das curvas analíticas de calibração.

Piretróide	a 10^{-4}	δ de a 10^{-4}	b 10^{-4}	δ de b 10^{-4}	r ²
Bifentrina	-3	3	116	3	0,997
Fenpropratrina	-2	1	57	1	0,997
Fenvalerato	-2	1	74	1	0,998
Cipermetrina	-2	1,7	96	2	0,998
Deltametrina	0,6	1	88	1	0,999
Trans-Permetrina	0,6	0,9	93	1	0,999
Cis-Permetrina	-0,6	0,9	94	1	0,999
Lambda-Cialotrina	0,7	2	88	2	0,999

Nota: $y = a + bx$, a = coeficiente linear, b = coeficiente angular, δ = desvio padrão, r² = coeficiente de correlação.

Como substâncias diferentes podem apresentar respostas similares em dadas condições deve-se proceder à verificação da especificidade, seguida por outras técnicas comprobatórias.

A seletividade foi verificada pela observação dos cromatogramas das amostras em branco, que não apresentaram nenhum pico na região cromatográfica de interesse. E para se ter certeza de que os picos encontrados nos estudos de fortificação são realmente os picos característicos dos piretróides, uma amostra em estudo foi injetada em cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons, comparando-se os tempos de retenção com os tempos característicos dos padrões de piretróides injetados nas mesmas condições. Isto confirmou a identificação qualitativa dos piretróides feitas por CLAE, comprovando sua seletividade.

Observa-se na Tabela 4, que todos os piretróides apresentaram recuperações dentro do intervalo de 70 a 120%, proposto pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América [19] e pelo Codex Alimentarius, [20]. Os valores estão também de acordo com a Comissão Européia para monitoramento de resíduos de pesticidas, que propõe um intervalo de 70 a 120% [21]. Todas as recuperações variaram entre 70 - 106% (Tabela 4), de acordo com os intervalos aceitos

para as concentrações estudadas; o método proposto mostra-se, assim, exato.

Tabela 4 – Recuperações, Limites de Detecção e Limites de Quantificação.

Tabela 4 – Recuperações, Limites de Detecção e Limites de Quantificação.

<u>Piretróides</u>	Limite de Detecção (mg kg ⁻¹)	Limite de Quantificação (mg kg ⁻¹)	Nível de Fortificação (mg kg ⁻¹)	Recup. Média (%)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
<u>Fempropatrina</u>	0,001	0,006	0,010	105	12,6	12,0
			0,10	80	2,9	3,7
			1,0	91	12,1	13,2
<u>Fenvalerato</u>	0,002	0,010	0,010	97	11,4	11,8
			0,10	79	3,7	4,7
			1,0	100	6,1	6,1
<u>Cipermetrina</u>	0,001	0,004	0,010	99	8,1	8,2
			0,10	78	1,8	2,3
			1,0	99	1,9	1,9
<u>Deltametrina</u>	0,002	0,008	0,010	96	12,2	12,8
			0,10	72	2,5	3,5
			1,0	93	3,5	3,8
<u>Trans-permetrina</u>	0,002	0,008	0,010	105	13,5	12,8
			0,10	70	6,5	9,3
			1,0	98	1,5	1,5
<u>Cis-permetrina</u>	0,002	0,010	0,010	101	14,5	14,4
			0,10	80	10,5	13,1
			1,0	99	1,7	1,7
<u>Lambda-cialotrina</u>	0,001	0,008	0,010	104	11,9	11,5
			0,10	71	2,2	3,2
			1,0	94	2,6	2,8
<u>Bifentrina</u>	0,002	0,010	0,010	106	11,0	10,4
			0,10	85	5,9	7,0
			1,0	96	0,9	0,9

Os valores de coeficientes de variação percentual estão de acordo com os índices propostos de até 20%, segundo a comissão formada por membros das organizações: Association of Analytical Communities (AOAC), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), International Atomic Energy Agency (IAEA) e International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) [22]

Os limites de detecção e quantificação do método estão apresentados na Tabela 4.

Para concentrações baixas, como em análise de resíduos de pesticidas, os valores de recuperação e coeficientes de variação são geralmente semelhantes aos propostos pela comissão de especialistas de reconhecidas organizações tais como, AOAC, FAO, IAEA, EPA, IUPAC [9, 21, 22, 23]. Os CV% apresentados na Tabelas 3 variaram entre 0,9 - 14,4% e estão dentro do que é comumente aceito para análise de resíduos de pesticidas, mostrando que o método possui repetitividade adequada e é preciso nas concentrações estudadas.

A reprodutibilidade foi verificada através da realização das análises por diferentes analistas e em diferentes datas. Assim, as 7 amostras fortificadas foram separadas em dois grupos de 3 e 4 amostras. Um dos grupos foi analisado em um dia por uma equipe de analistas e o outro grupo, 5 dias depois, por outra equipe de analistas. Os valores de recuperação se mantiveram sem grandes variações nos dois grupos de amostras analisadas separadamente, com CV% menores que 20%, portanto estatisticamente não significativos.

Resultado das análises de amostras de feijão

Nenhuma das 48 amostras de feijão analisadas apresentou resíduos de pesticidas piretróides, resultado perfeitamente aceito visto a baixa persistência desses no meio ambiente e, também, à sua alta atividade inseticida, possibilitando sua aplicação em pequenas dosagens.

Nakagawa e Andréa [24] observaram que plântulas de feijão plantado em solo com resíduos ligados de ^{14}C -atrazina, não absorveram estes resíduos. O mesmo talvez possa ocorrer com os piretróides.

Em um estudo realizado por Lopes e Dóres [25], na cidade de Aracaju, Estado de Sergipe, foi encontrado $1,83 \text{ mg kg}^{-1}$ de deltametrina em uma amostra de feijão, juntamente com o inseticida diazinona e propanil. Nenhuma outra referência da literatura nacional descreve a presença de resíduo de piretróides em amostras de feijão. A presença destes inseticidas em amostras de feijão se dá pelo uso desses no processo de armazenamento de grãos. A aplicação de pesticidas durante o armazenamento é recomendado como a técnica com melhor custo/benefício para controle de insetos.

Os inseticidas mais recomendados para esta finalidade são os piretróides e organofosforados. Como nas amostras estudadas não se detectou a presença de piretróides, pode-se inferir a possibilidade de ocorrência de outros inseticidas, sendo que os organofosforados seriam a primeira classe a ser estudada.

Conclusão

O método desenvolvido mostrou-se eficiente para análise de feijão. Isto foi demonstrado nos resultados de validação, os quais estão de acordo com as diretrizes requisitadas para validação de métodos analíticos pelos principais órgãos nacionais e internacionais regulamentadores e normativos.

O diferencial deste método é o baixo limite de quantificação que se conseguiu em relação aos outros métodos descritos na literatura; a simplificação na determinação, devido não ter apresentado os picos dos isômeros; a necessidade de menos clean-up, quando comparado a determinação com CG-ECD.

A ausência de resíduos de piretróides nas amostras analisadas sugere a boa qualidade, em relação aos compostos analisados, do feijão consumido na cidade de São Paulo, o que atende à legislação brasileira neste setor, como ainda, indica que as normas de boas práticas agrícolas estão sendo obedecidas e seguidas. Entretanto, para que esta conclusão seja confirmada, a presença de inseticidas de outras classes, especialmente os organofosforados, precisa ser investigada.

Referências

- [1] R. Hirata, Química Nova, 18(4) (1995) 368.
- [2] J. Tessier, Deltametrin, Roussel-Uclaf, Paris, 1983, 25-36.
- [3] J. Lhoste, Les Presses Faculte, Médecine Pharmacie de Marseille, Marseille, 1966, 65p.
- [4] A. B. Gebara, C. H. P. Ciscato, M. DA S. Ferreira, S. H. Monteiro, Bulletin Enviromental of Contamination and Toxicology, 75 (2005) 163.
- [5] O. D. Prestes, C. A. Friggi, M. B. Adaime, R. Zanella, Química Nova, 32(6) (2009) 1620.
- [6] H. P. Vieira, A. A. Neves, M. E. L. R. Queiroz, Química Nova, 30(3) (2007) 535.
- [7] Z. Chen, Y. Wang, Journal of Chromatography, A, 754 (1995) 367.
- [8] H. Magalhães, Banco de Notícias, EMBRAPA – Arroz e feijão, Disponível em: http://www21.sede.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2005/janeiro/noticia.2005-01-19.6737902350/mostra_noticia, Acesso em: 05 fev. 2008.
- [9] A. Ambrus, Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement, 9(6) (2004) 288.
- [10] N. M. Brito, J. O. P. Amarante, L. Polese, M. L. Ribeiro, Pesticidas: Resíduos - Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 13 (2003) 129.
- [11] L. Huber, LC/GC International, 11 (1998) 96.
- [12] ICH - Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: methodology, CPMP/ICH/281/95, London, 1996, 9p.
- [13] I. Kuselman, A. Shenhar, Analytica Chimica Acta,

306 (1995) 301.

[14] M. E. Swartz, I. S. Krull, *Pharmaceutical Technology*, 2(3) (1998) 12.

[15] ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Monografia de Produtos Agrotóxicos, Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/monografias.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2011.

[16] H. P. Thier, J. Kirchhoff, *Manual of Pesticide Residue Analysis*, Wiley: VCH, 2, 1992, 482p.

[17] H. P. Thier, H. Zeumer, *Manual of Pesticide Residue Analysis*, Weinheim: VCH, 1, 1987, 432p

[18] W. Specht, S. Pelz, W. Gilsbach, *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, 353 (1995) 183.

[19] EPA - Environmental Protection Agency. Residue Chemistry Test Guidelines. Office of Presentation, Pesticides and Toxic Substances 860.1340: Residue Analytical Method, Washington, 1996, 12p.

[20] CODEX ALIMENTARIUS. Guidelines on good laboratory practice in residue analysis, CAG/GL 40-1993, rev.1-2003, 36p.

[21] SANCO/10684/2009 - Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Disponível em: www.ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Acesso em 06 nov. 2010.

[22] AOAC/FAO/IAEA/IUPAC - Expert Consultation; Guidelines for Single-laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-level Conc. Of Organic Chemicals. Miskolc. Hungary, 1999.

[23] J.M. Green, *Analytical Chemistry News & Features*, 68(9) (1996) 305A.

[24] L. E. Nakagawa, M. M. Andréa, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35(8) (2000) 1517.

[25] W.G. Lopes, H. G. Dóres, *Pesticidas: Resíduos Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13 (2003) 13.