

DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM CARNE BOVINA

Natália Cecília Sartarelli^{1,2*} (IC), Sílvia Helena Govoni Brondi² (O), Ana Rita de Araujo Nogueira² (PQ)

¹Centro Universitário Central Paulista, ² Embrapa Pecuária Sudeste

1. RESUMO

A utilização de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos é um fator de risco que pode comprometer a saúde humana, devido à presença de resíduos na carne, leite, gordura, ovos etc, acima dos limites máximos permitidos pela legislação. Os medicamentos veterinários são empregados na pecuária como promotores de crescimento, na profilaxia e terapia de doenças e no combate a parasitas, muitas vezes, transmissores de doenças, como é o caso do carrapato (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) – responsável pela queda na produção de leite e carne, danos ao couro e transmissor de doenças como babesiose bovina e anaplasmose, doenças de importância econômico-sanitária. Portanto, se não observadas as Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários, resíduos poderão ser encontrados em alimentos de origem animal, comprometendo a segurança alimentar, podendo provocar sérios problemas comerciais, econômicos, ambientais e de saúde pública.

No presente estudo, empregou-se o método QuEChERS modificado na extração dos medicamentos veterinários (carrapaticidas) clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina da matriz carne e *clean up* da amostra, e a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS), na separação, identificação e quantificação dos analitos.

Aplicando a metodologia proposta, método QuEChERS-GC/MS, na análise dos carrapaticidas em carne bovina, avaliando as concentrações 0,025; 0,05 e 0,10 mg kg⁻¹, valores aceitáveis de recuperação foram obtidos, variando de 98 a 130 %, estando dentro da faixa de aceite estabelecida pelo EPA (Environmental Protection Agency), que varia entre 70 e 130%. O método QuEChERS-GC/MS mostrou-se apropriado para análise de resíduos de clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, apresentando vantagens como rapidez, consumo de pequeno volume de solventes e geração de poucos resíduos.

2. INTRODUÇÃO

A segurança alimentar pode ser entendida, qualitativamente, como a aquisição pelo consumidor de alimentos com boa qualidade, livres de contaminantes de natureza química, biológica e física, ou seja, qualquer substância que possa acarretar problemas à saúde (TAMISO, 2005).

Existem diversos tipos de contaminações na qual os alimentos podem estar sujeitos e que representam um risco efetivo para a saúde pública. Dentre os diversos tipos, salienta-se a contaminação química decorrente das práticas de agricultura intensiva (PEREIRA, 2007), bem como, da utilização de medicamentos veterinários na pecuária, como os utilizados no combate a parasitas transmissores de doenças, que devido a não observância das Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários, geram resíduos nos produtos de origem animal, resultantes do armazenamento nos tecidos e gordura ou secretados no leite, comprometendo sua segurança e qualidade (MIDIO; MARTINS, 2002).

No Brasil, o Ministério da Saúde através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA define normas relativas ao estabelecimento do Limite Máximo de Resíduo (LMR) de agrotóxicos, medicamentos veterinários, contaminantes e aditivos em

alimentos. No entanto, para medicamentos veterinários, os níveis nacionais ainda não foram definidos e, portanto, vem-se utilizando no Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal (Instrução Normativa/MAPA Nº42, de 20 de dezembro de 1999), os níveis obtidos de referências internacionais (MERCOSUL, Codex Alimentarius, FDA/USA e União Européia) (ANVISA, 2000).

O emprego de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos, cujos resíduos poderiam gerar riscos à saúde pública, fez com que no ano de 2002 a ANVISA criasse o PAMVet (Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal), o qual prevê o controle dos resíduos em alimentos de origem animal expostos ao consumo humano. A meta global do PAMVet é avaliar, gradualmente, resíduos de medicamentos veterinários em leite bovino, carne de frango, carne bovina, carne suína, pescado, ovo de galinha e mel de abelha, iniciando o programa com a matriz leite bovino (ANVISA, 2002).

Entre os medicamentos veterinários, encontram-se os carrapaticidas, que podem ser classificados em grupos químicos de carrapaticidas de contato (fosforados, amidínicos, piretróides, fenilpirazóis, cimiazóis, naturalyte) e em grupos químicos de carrapaticidas sistêmicos (lactonas macrocíclicas, inibidores de desenvolvimento) e, quando empregados na pecuária, no combate e prevenção de carrapatos, se não observadas as Boas Práticas de Uso de Medicamentos Veterinários, em especial as especificações de uso e posologia, resíduos acima do limite estabelecido pela legislação poderão ser encontrados em produtos de origem animal, comprometendo à saúde do consumidor (FURLONG; PRATA, 2006).

Diante do exposto destaca-se a importância do desenvolvimento de métodos para análise de resíduos de medicamentos veterinários em matrizes alimentícias, como a carne bovina, fonte de proteínas, vitaminas e minerais.

3. OBJETIVO

Desenvolver e validar uma metodologia analítica para determinação de resíduos dos carrapaticidas clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, em amostras de carne bovina, aplicando o método QuEChERS como técnica de extração e clean up da amostra e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) para separação, quantificação e identificação dos analitos.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Procedimento de extração: método QuEChERS

No processo de extração pelo método QuEChERS, 2 g de amostra (carne bovina), foi transferida para um tubo Falcon de volume 50 mL, sendo fortificada com soluções de trabalho contendo os analitos clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, na concentração desejada, procedendo-se a mistura dos analitos com a matriz com o auxílio de uma espátula, por um tempo de 2 minutos, sendo posteriormente mantida em repouso por 20 minutos para que ocorra a interação. Após decorridos os 20 minutos de interação entre os analitos e a amostra, acrescentou-se 4 mL de MeCN, agitando manualmente a mistura, seguindo de mais 20 minutos de interação. A seguir adicionou-se 1,6 g de MgSO₄ anidro (Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, USA) e 0,4 g de NaCl (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), agitando-se manualmente e centrifugando em centrífuga, marca CELM, modelo LS-TT (Brasil), a 3000 rpm por 1 minuto (partição líquido-líquido). Da fase superior formada, correspondente ao solvente orgânico MeCN, 1 mL foi transferido para um tubo eppendorf de volume 1,5 mL, contendo 80 mg de octadecilsilano (C18),

tamanho de partícula de 50 μm , adquirido da J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), 80 mg de amina primária e secundária (PSA), tamanho de partícula entre 47 e 60 μm , adquirido da Varian (Lake Forest, CA, USA) e 150 mg de MgSO_4 anidro, agitando-se manualmente e centrifugando em microcentrífuga, marca Eppendorf, modelo 5415C (Alemanha) a 6000 rpm por 1 minuto (SPE dispersiva). Da fase superior formada, 0,5 mL foi transferida para um frasco específico do amostrador automático do GC, para posterior análise por GC/MS.

4.2. Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando cromatógrafo gasoso equipado com detector de espectrometria de massas (GC/MS), marca Shimadzu (Kyoto, Japão), modelo GC/MS-QP-2010. Os padrões analíticos clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina foram inicialmente analisados no modo de aquisição SCAN (modo de varredura), sendo os espectros de massa obtidos comparados com o banco de dados NIST (National Institute of Standards and Technology), contido na biblioteca do sistema GC/MS – QP2010.

As condições cromatográficas utilizadas nas análises foram:

- Coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,1 μm)
- Gás de arraste: hélio
- Injetor automático (AOC-20i – Shimadzu)
- Modo de injeção splitless
- Temperaturas do injetor, interface e fonte de íons de 250 °C
- Programação de temperatura da coluna de 120 °C – 4 °C min^{-1} – 190 °C – 32 °C min^{-1} – 270 °C (4 min)
- Volume de injeção de 1 μL
- Modos de aquisição SCAN e SIM (Selected Ion Monitoring)
- Varredura no modo de aquisição SCAN entre m/z 45 a 450 Dalton/Coulomb

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise cromatográfica por GC/MS

Inicialmente os padrões analíticos de clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina foram injetados separadamente no GC/MS, concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, modo de aquisição SCAN, identificando o tempo de retenção de cada analito e selecionando, através da análise dos espectros de massas, os íons a serem analisados no modo de aquisição SIM. A seguir, preparou-se uma mistura dos analitos, na concentração de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, modo de aquisição SCAN, com o objetivo de otimizar as condições de análise do cromatógrafo gasoso, selecionando como melhor programação de temperatura do forno: 120 °C – 4 °C min^{-1} – 190 °C – 32 °C min^{-1} – 270 °C (4 min). A Figura 1 apresenta o cromatograma dos analitos, sob as condições otimizadas de análise cromatográfica e na Tabela 1 são apresentados os tempos de retenção (t_r) de cada analito sob as condições otimizadas de análise cromatográfica, bem como os íons selecionados para as análises no modo de aquisição SIM. Selecionou-se três íons de maior intensidade para cada composto, passando a operar o GC/MS no modo SIM (Single Ion Monitoring), avaliando as concentrações de 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 e 0,025 mg L^{-1} .

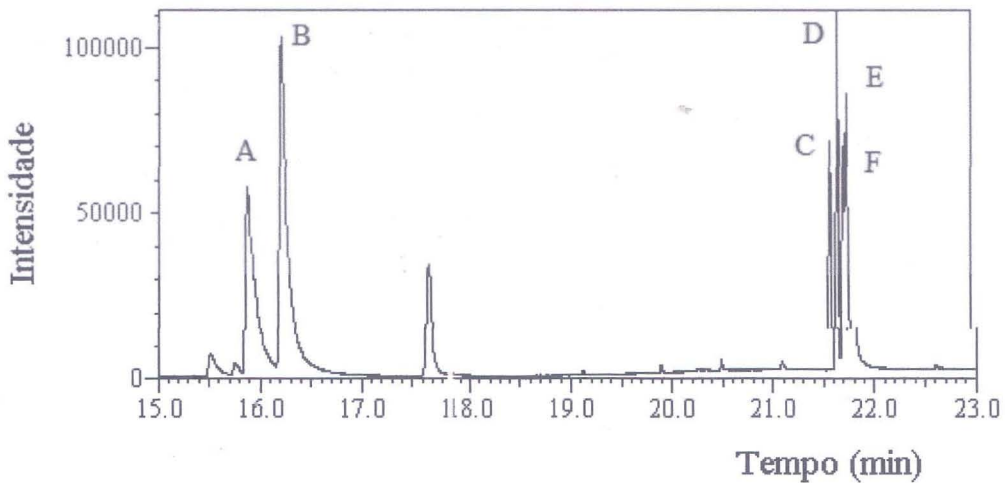


Figura 1: Cromatograma dos padrões analíticos clorfenvinfos (A), fipronil (B) e cipermetrina (isômeros C, D, E e F), na concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, modo de aquisição SCAN. Programação de temperatura do forno: $120 \text{ }^\circ\text{C} - 4 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1} - 190 \text{ }^\circ\text{C} - 32 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1} - 270 \text{ }^\circ\text{C} (4 \text{ min})$.

Tabela 1: Tempos de retenção (tr) e íons selecionados para monitoramento dos analitos clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, nas análises no modo de aquisição SIM.

Analitos	Tempo de retenção (min)	Fragmentos selecionados
Clorfenvinfos	15,301	267; 295; 323
Fipronil	15,686	255; 367; 369
Cipermetrina	21,368; 21,442; 21,492; 21,520	163; 165; 181

5.2. Validação do equipamento GC/MS utilizando os padrões analíticos dos analitos em estudo

Para assegurar a confiabilidade dos dados obtidos nas análises no GC/MS, realizou-se a validação do equipamento, para em etapa posterior validar a metodologia analítica, sendo considerados os parâmetros: linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação (LEITE, 1996; CHASIN et al., 1994; CHASIN et al., 1998).

5.3. Linearidade

Para avaliar a linearidade do equipamento, construiu-se uma curva analítica com cinco pontos para cada analito nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 mg L^{-1} , injetando três vezes a mistura de padrões analíticos para cada concentração, aplicando o método da regressão linear (Figura 4). A equação da reta para os compostos estudados ($y = a + b \cdot x$, onde $y = \text{área do pico}$ e $x = \text{concentração em } \text{mg L}^{-1}$), bem como o

coeficiente de correlação r , são apresentados na Tabela 2. Os valores de coeficientes de correlação obtidos foram próximos de um, indicando que o detector de massas responde bem às concentrações injetadas, sendo linear na faixa de interesse.

Tabela 2: Equações das curvas analíticas e coeficientes de correlação (r) para o equipamento GC/MS, na análise dos clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina.

Análitos	Equação	r
Clorfenvinfos	$y = 659,84x - 14859$	0,9907
Fipronil	$y = 153,91x - 2623,2$	0,9914
Cipermetrina	$y = 51,615x - 203,84$	0,991

5.4. Precisão

A precisão é o grau de concordância entre resultados de testes independentes, repetidos, de uma mesma amostra ou padrões, submetidos a determinadas condições. É expressa, geralmente, em termos de resultados de desvio padrão (DP) ou desvio padrão relativo (DPR) (RIBANI et al., 2004).

Segundo o EPA (Environmental Protection Agency), valores aceitáveis de desvio padrão relativo devem ser inferiores a 30% (TOLOSA et al., 1996).

A precisão é um parâmetro que frequentemente varia de acordo com a concentração do analito, de modo que é importante avaliá-lo em pelo menos três concentrações diferentes (THOMPSON et al., 2002). Na Tabela 3 são apresentados os valores de DPR para soluções em solvente orgânico de várias concentrações. Assim, o método analítico GC/MS demonstrou boa precisão na quantificação dos analitos clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina.

Tabela 3: Valores de desvio padrão relativo para os analitos em estudo, nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,1 e 0,2 mg L⁻¹.

Concentração (mg L ⁻¹)	DPR (%)		
	Clorfenvinfos	Fipronil	Cipermetrina
0,01	13,3	24,0	8,7
0,02	3,4	18,6	17,1
0,05	16,1	15,4	18,6
0,1	11,7	11,9	6,8
0,2	13,8	16,1	8,7

5.5. Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)

O limite de detecção corresponde à menor concentração de um analito que se pode ser identificada pelo método analítico, porém, não necessariamente quantificada (LANÇAS, 2004). Seu cálculo foi feito pela comparação do sinal (altura do pico cromatográfico) de soluções dos padrões analíticos, em baixas concentrações, com o sinal médio do ruído na região do tempo de retenção do analito. O limite de detecção é a concentração do analito na qual a relação sinal-ruído é igual a três.

O limite de quantificação é a menor concentração do analito possível de ser quantificada, ou seja, medida com precisão e exatidão aceitáveis (RIBANI et al., 2004;

CASS; DEGANI, 2001). Os limites de detecção e de quantificação dos analitos clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina analisados por GC/MS, são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para soluções dos analitos clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, em solvente orgânico.

Analitos	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Clorfenvinfos	0,005	0,0165
Fipronil	0,01	0,033
Cipermetrina	0,005	0,0165

5.6. Aplicação do método QuEChERS modificado na extração dos carrapaticidas clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina da matriz carne bovina

No início do desenvolvimento da técnica de extração, amostras de carne bovina foram fortificadas com os padrões analíticos de clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina na concentração de 100 µg kg⁻¹, procedendo-se testes de extração, utilizando diferentes quantidades de amostras e reagentes, bem como a extração em fase sólida (SPE) em cartucho e a dispersiva, segundo procedimentos descritos em Lehotay et al. (2005) e Anastassiades et al. (2003). Os resultados foram avaliados em termos de seus valores de recuperação e desvio padrão relativo. O cálculo da recuperação é realizado de acordo com a equação abaixo, onde o valor obtido é a área do pico cromatográfico do extrato e, o valor adicionado é a área do pico cromatográfico do branco acrescido dos padrões analíticos após a extração.

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Valor obtido}}{\text{Valor adicionado}} \times 100\%$$

Em análises por cromatografia gasosa, componentes da matriz extraídos juntamente com os analitos podem causar diversos problemas nas análises, tais como alterações na exatidão, diminuição na robustez do método, baixa detectabilidade dos analitos e resultados falsos positivos ou negativos. Trata-se do chamado efeito matriz. No caso dos resultados falsos positivos, quando uma amostra é injetada, componentes da matriz que permaneceram no extrato podem se ligar a sítios ativos, como grupos silanóis, presentes no liner e na coluna cromatográfica, o que reduz a perda de analitos causada por sua adsorção ou degradação nesses sítios. Como resultados, são obtidos valores de área muito maiores para analitos injetados juntamente com componentes da matriz (extratos) do que para analitos injetados em solvente orgânico (MAŠTOVSKÁ et al., 2005). Para minimizar esses efeitos, o cálculo das recuperações dos extratos é feito considerando a área do pico cromatográfico do branco acrescido do padrão após o processo de extração.

A faixa de valores aceitáveis proposto pelo EPA (Environmental Protection Agency) de recuperação em métodos cromatográficos é de 70 a 130 %, com desvio padrão menor ou igual a 30 % (TOLOSA et al., 1996).

Os testes realizados foram:

- Teste 1: Partição líquido-líquido: 10 g de amostra, 10 mL de MeCN, 4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl, centrifugação (ANASTASSIADES et al., 2003). SPE dispersiva: 1 mL da fase superior, 50 mg PSA, 50 mg C18 e 150 mg MgSO₄ (LEHOTAY et al., 2005);

Seguindo a metodologia proposta por Lehotay et al. (2005) e Anastassiades et al. (2003), obteve-se valores de recuperação variando de 66 - 82 % , com DPR elevados para os três analitos, sugerindo interferência de componentes da matriz. Buscando valores aceitáveis de DPR, através de um clean up mais efetivo da amostra, modificações ao método original foram propostas.

- Teste 2: Partição líquido-líquido: 10 g de amostra, 10 mL de MeCN, 4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl, centrifugação (ANASTASSIADES et al., 2003). SPE dispersiva: 1 mL da fase superior, 50 mg PSA, 50 mg C18 e 150 mg MgSO₄ (LEHOTAY et al., 2005). Extração líquido-líquido: uma alíquota de 0,7 mL da fase superior formada na SPE dispersiva foi homogeneizada com 0,7 mL de éter de petróleo, a seguir transferiu-se 0,5 mL da fase inferior (MeCN) para frasco específico de amostrador automático;

Utilizando éter de petróleo, obtiveram-se valores de recuperação acima de 200%, variando de 247 – 926%, não mostrando eficácia no clean up da amostra.

- Teste 3: Partição líquido-líquido: 10 g de amostra, 10 mL de MeCN, 4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl, centrifugação (ANASTASSIADES et al., 2003). SPE em coluna: 1 mL da fase superior, 100 mg PSA, 100 mg C18 e 150 mg MgSO₄, pré-condicionamento do cartucho com 1 mL de MeCN;

Utilizando SPE em coluna, obteve-se valores de recuperação inferiores a 50%, podendo indicar retenção dos analitos nos adsorventes.

Devido à complexidade da matriz em estudo, reduziu-se a massa da amostra, mantendo o volume do solvente e aumentando os adsorventes responsáveis pelo clean up da amostra, C18 e PSA, passando de 50 mg para 80 mg (Teste 4).

- Teste 4: Partição líquido-líquido: 5 g de amostra, fortificação, 20 minutos de interação; adição de 10 mL de MeCN, 20 minutos de interação; adição de 4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl, centrifugação. SPE dispersiva: 1 mL da fase superior formada na partição líquido-líquido, 80 mg PSA, 80 mg de C18 e 150 mg MgSO₄.

As recuperações e os DPR não se mostraram constantes, havendo corridas sem detecção dos analitos e outras com DPR e recuperação elevados, 35 e 295%, respectivamente.

Reduzir-se ainda mais a massa de carne amostrada, passando de 5 g para 2 g, mantendo a mesma proporção de acetonitrila proposta no método desenvolvido por Anastassiades et. al, 2003 (Teste 5).

- Teste 5: Partição líquido-líquido: 2 g de amostra, fortificação, 20 minutos de interação; adição de 4 mL de MeCN, 20 minutos de interação; adição de 4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl, centrifugação. SPE dispersiva: 1 mL da fase superior formada na partição líquido-líquido, 80 mg PSA, 80 mg de C18 e 150 mg MgSO₄.

Valores aceitáveis de recuperação foram obtidos avaliando as concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1mg kg⁻¹, variando entre 98 e 130% (Tabela 5), com DPR entre 0,4 e 25%, estando dentro da faixa de aceite estabelecida pelo EPA (70 - 130 ± 30%), selecionando o Teste 5 para extração dos analitos clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina da matriz carne bovina e na validação do método proposto. A Figura 2 apresenta o cromatograma do extrato na concentração de 0,025 mg kg⁻¹

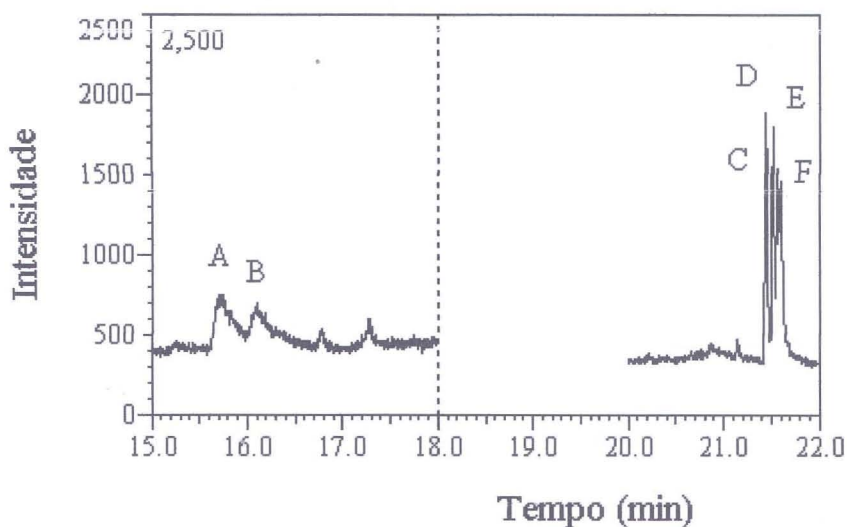


Figura 2: Cromatograma do extrato na concentração de 0,025 mg kg⁻¹. Modo de aquisição SIM. Programação de temperatura do forno: 120 °C – 4 °C/min – 190 °C – 32 °C/min – 270°C (4 min).

Tabela 5: Valores de recuperação e DPR para extratos de clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, nas concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1 mg kg⁻¹, aplicando o teste 5.

Concentração (mg kg ⁻¹)	Recuperação (%) ± DPR (%)		
	Clorfenvinfos	Fipronil	Cipermetrina
0,025	130 ± 5	98 ± 25	106 ± 13
0,05	117 ± 0,9	112 ± 4,5	111 ± 0,4
0,10	129 ± 5	112 ± 6	102 ± 3

6. CONCLUSÃO

O método desenvolvido, método QuEChERS-GC/MS, aplicado no teste 5, com redução da massa de carne amostrada e de reagentes, mostrou-se apropriado na extração e análise de traços dos carrapaticidas clorfenvinfos, fipronil e cipermetrina, na matriz carne bovina. Avaliando as concentrações de 0,025; 0,05 e 0,1 mg kg⁻¹, obteve-se valores de recuperação que variaram de 98 a 130%, com DPR entre 0,4 e 25%, valores estes dentro da faixa de aceite estabelecida pelo EPA (70 - 130 ± 30%). O método proposto

apresenta vantagens sobre os métodos clássicos de extração, tais como, rapidez, consumo de pequeno volume de solventes orgânicos e geração de poucos resíduos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **J. AOAC Int.**, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **PAMVet – Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo** (2002). Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/index.htm>>. Acesso em: 27 ago. 2007.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Grupo de Trabalho sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos** (2000). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/residuos.htm>. Acesso em: 04 ago. 2009.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: Fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: EdUFSCar, 2001. 77p.

CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M.; SALVADOR, M. C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. de Farmácia e Bioquímica**, Universidade de São Paulo, v. 30, n. 2, p. 49-53, 1994.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Brasileira de Toxicologia**, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.

COLLINS, C.H. Princípios Básicos de Cromatografia. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006. 453p.

FURLONG, J.; PRATA, M. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas – Instrução Técnica para o produtor de leite – ISSN N°1518-3254 – EMBRAPA Gado de Leite** (2006). Disponível em: <[http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/pastprod/textos/34 Instrucao.pdf](http://www.cnp.gl.embrapa.br/nova/informacoes/pastprod/textos/34_Instrucao.pdf)>. Acesso em: 27 jul. 2009.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: RiMa, 2004. 62p.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. **J. AOAC Int.**, v. 88, p. 630-638, 2005.

LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Átomo, 1996. 64p.