

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO QuEChERS NA DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM LEITE E CARNE DE BÚFALO

Silvia H. G. Brondi*, Gilberto B. de Souza e Ana R. A. Nogueira

Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234, 13560-970 São Carlos – SP, Brasil

Laís A. de Camargo e Rafaela F. Majaron

Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luiz, km 235, 13565-905 São Carlos – SP, Brasil

Recebido em 26/1/12; aceito em 21/7/12; publicado na web em 26/11/12

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE QuEChERS METHOD FOR THE DETERMINATION OF VETERINARY DRUG RESIDUES IN BUFFALO MILK AND MEAT. Analytical methods were developed and validated to determine residues of veterinary drugs in buffalo milk and meat, using the QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry. Both milk and meat, at 2 g of sample, 4 mL of acetonitrile, 0.8 g of MgSO₄ and 0.2 g of NaCl, were used in the liquid-liquid partition, whereas 50 mg of C₁₈, 50 mg of PSA and 150 mg of MgSO₄ were employed in the dispersive solid-phase extraction (d-SPE). The methods showed sensitivity, precision and accuracy. The quantitation limits were in agreement with the maximum residue limit established by the Codex Alimentarius, FAO and WHO.

Keywords: CG-EM; QuEChERS method; veterinary drug.

INTRODUÇÃO

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é uma espécie originária da Ásia, que se difundiu para praticamente todos os continentes. É um animal ruminante, que se adapta às diferentes condições edafo-climáticas, onde os bovinos e outras espécies não apresentam desempenho satisfatório, como as regiões subtropicais e tropicais. As raças estão divididas em dois grupos: os búfalos de rio e os de pântano. No Brasil os búfalos de rio são representados pelas raças Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi, destinados para leite e carne, os de pântano pela raça Carabao, voltada para carne e trabalho.¹

Introduzida inicialmente no norte do Brasil, a bubalinocultura vem ocupando espaço em várias regiões do país, sendo representada por animais altamente adaptados para a inserção na cadeia agroindustrial do leite e da carne.² O rebanho de búfalos brasileiro está estimado em torno de 1,15 milhões de animais; a maior produtora do país é a região Norte que detém 720 mil cabeças, com destaque para o estado do Pará, que responde por 39% do rebanho nacional. Em seguida, aparecem o Nordeste e o Sudeste, com 135 e 104 mil cabeças, respectivamente. Esta atividade se apresenta como uma alternativa rentável e saudável.³

A criação de gado bubalino, que apresenta boa adaptabilidade, possibilita bom rendimento econômico. O leite apresenta valor proteico e qualidade superiores ao das vacas zebuínas e europeias,⁴ com altos níveis de gordura, proteínas e minerais, em especial o cálcio, além da vitamina A.⁵ Com relação à carne, possui 40% menos colesterol e 12 vezes menos gordura que a bovina,⁶ sendo considerada um alimento nobre para o homem, tanto devido ao alto valor nutricional, quanto pela presença de proteínas de alto valor biológico, aminoácidos e ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais, além dos aspectos sensoriais extremamente desejáveis.⁷

A saúde humana pode ser colocada em risco pelo consumo de alimentos de origem animal que apresentem resíduos de medicamentos veterinários em concentrações acima do limite máximo de resíduo (LMR), recomendado por órgãos como *European Union*,⁸ *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*,⁹

entre outros. Medicamento veterinário pode ser conceituado como um produto farmacêutico, tecnicamente obtido ou elaborado, com finalidade profilática, paliativa, curativa ou para fins de diagnóstico,¹⁰ destacando-se os antimicrobianos, anti-helmínticos, antiparasitários, hormônios, promotores de crescimento. Resíduos são derivados de todas as substâncias químicas ou biológicas administradas ao animal, seja por indicação veterinária ou na alimentação.³ A presença de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos, além de ser um problema de saúde pública, envolve também aspectos econômicos, pois pode criar barreiras nas exportações.¹¹

Para atender aos baixos limites de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos estabelecidos pela legislação,¹² métodos analíticos confiáveis, que garantam que os alimentos estejam dentro de limites considerados seguros para a saúde pública, necessitam ser desenvolvidos e validados, os quais incluem a etapa de preparo da amostra e análise cromatográfica.

Anastassiades *et al.*¹³ introduziram um método de extração denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), destinado para a extração de pesticidas em matrizes alimentícias com baixo conteúdo de lipídios, como frutas e vegetais. Este método tem sido adaptado para ser aplicado a matrizes alimentícias mais complexas, que contêm alto conteúdo de lipídios e proteínas, como ovo e abacate,¹⁴ chocolate, café e cereal,¹⁵ alimento para bebês,¹⁶ sementes de linhaça e amendoim,¹⁷ azeitona e azeite de oliva,¹⁸ tecido animal^{19,20} e leite.²¹⁻²³

A cromatografia representa o mais relevante conjunto de técnicas analíticas disponíveis atualmente na análise de substâncias químicas, em especial a cromatografia gasosa, devido aos baixos limites de detecção que podem ser conseguidos com a técnica. A espectrometria de massas é uma das técnicas mais importantes de análise molecular, devido seu potencial em fornecer informações de massa molar, além da estrutura do analito.²⁴

A validação de um método analítico é de extrema importância para garantir que o mesmo seja exato, específico e reprodutível.²⁵ Os parâmetros a serem validados variam de acordo com área de estudo, método utilizado, tipos de analito e de amostra e objetivo ao qual se destina o método desenvolvido. Os principais parâmetros de validação para análises cromatográficas são seletividade, linearidade e faixa

*e-mail: shgb@uol.com.br

de aplicação, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), exatidão, precisão e robustez.²⁶⁻²⁸

A investigação do efeito de matriz durante a quantificação de compostos endógenos ou exógenos e/ou seus metabólitos é um importante parâmetro a ser avaliado durante o desenvolvimento e validação de um método bioanalítico.²⁹ Em análises por cromatografia gasosa, compostos coextraídos da matriz podem levar a resultados falso positivos ou falso negativos. Quando uma amostra real é injetada, componentes da matriz podem bloquear os sítios ativos, tais como os grupos silanóis livres, presentes no *liner* e coluna cromatográfica, reduzindo as perdas do analito pela adsorção nesses sítios ativos, resultando em um sinal analítico maior para os analitos na matriz do que em solvente orgânico,³⁰ produzindo uma resposta falso positiva. Por outro lado, quando há uma acumulação gradual de compostos não voláteis da matriz no sistema cromatográfico, pode levar à formação de novos sítios ativos, reduzindo o sinal do analito e gerando uma resposta falso negativa.³¹⁻³³

De acordo com Lehotay *et al.*,³⁴ fazer a calibração por superposição na matriz, onde a preparação dos padrões analíticos é feita no branco da matriz, é uma maneira eficiente para compensar o efeito de matriz.

Apesar da criação de búfalo apresentar vantagens, os estudos referentes a esta espécie são relativamente escassos, principalmente no que tange à análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos oriundos destes animais, com destaque para o leite³⁵⁻³⁷ e a carne.³⁸⁻⁴⁰

O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar métodos analíticos destinados à análise de resíduos de alguns medicamentos veterinários, clorpirifós, clorfenvinfos, fipronil, amitraz e cipermetrina, utilizados no combate a ectoparasitas de animais produtores de leite e carne para consumo humano, destacando-se o leite e a carne de búfalo. O método QuEChERS foi aplicado na etapa de preparo da amostra e a quantificação e identificação dos analitos foi feita por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-EM).

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais e reagentes

Os padrões analíticos de clorpirifós, clorfenvinfos, fipronil, amitraz e cipermetrina, com 96% pureza, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Alemanha). As soluções estoque e de trabalho foram preparadas em solvente acetonitrila, grau HPLC, obtido da Mallinckrodt (USA), armazenadas em freezer a -21 °C, permanecendo estáveis por vários meses. Os adsorventes utilizados na extração em fase sólida dispersiva (d-SPE) incluem PSA (40 µm), obtido da Varian (USA), e C₁₈ (50 µm), da J.T. Baker (USA). NaCl foi obtido da Synth (Brasil) e MgSO₄ da Mallinckrodt (USA). Amostras de leite e carne de búfalo, oriundas de animais isentos de contaminação pelos medicamentos veterinários clorpirifós, clorfenvinfos, fipronil, amitraz e cipermetrina, foram obtidas na Embrapa Amazônia Oriental, no estado do Pará.

Preparo das amostras

O método QuEChERS foi aplicado de acordo com Anastassiades *et al.*,¹³ e Lehotay *et al.*,¹⁴ sendo feitas algumas adaptações. No desenvolvimento do método, o procedimento analítico consistiu em pesar 2,0 g de amostra de leite ou carne em um tubo de centrifuga; adicionar os analitos clorpirifós, clorfenvinfos, fipronil, amitraz e cipermetrina, na concentração requerida, misturar e deixar em repouso por 1 h; adicionar 4 mL de MeCN, 0,8 g de MgSO₄ e 0,2 g de NaCl em cada tubo e centrifugar durante 1 min; transferir 1 mL da fase MeCN para um eppendorf, volume 1,5 mL, para aplicar a d-SPE, utilizando 50

mg PSA, 50 mg C₁₈ e 150 mg MgSO₄; misturar e centrifugar durante 1 min; transferir 0,7 mL do sobrenadante para um frasco de vidro de volume 2 mL e congelar por 2 h; transferir 0,4 mL do sobrenadante para o frasco do amostrador automático do CG-EM e analisar.

Análise cromatográfica: CG-EM

As concentrações dos analitos foram determinadas utilizando cromatógrafo a gás com detecção por espectrometria de massas, marca Shimadzu (Kyoto, Japan), modelo QP 2010 GC-MS, com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,1 µm).

As temperaturas do injetor, interface e fonte de íons foram de 250 °C, modo de injeção *splitless* (1 min) e hélio como gás de arraste (vazão de 0,75 mL min⁻¹). A programação de temperatura do forno foi de 100 °C – 12 °C min⁻¹ – 190 °C – 32 °C min⁻¹ – 270 °C (4 min). O volume de 1 µL foi injetado no CG-EM, utilizando um autoinjeter AOC-20i, da Shimadzu. O espectrômetro de massas foi operado inicialmente no modo varredura, entre *m/z* 45 e 475 Daltons, modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV, que permite a detecção dos analitos a um limite de 1,0 mg kg⁻¹. Concentrações inferiores puderam ser detectadas no modo MIS (monitoramento íon selecionado), sendo estabelecidos três íons para cada analito em estudo, clorpirifós (258; 286; 314), clorfenvinfos (267; 295; 323), fipronil (255; 351; 367), amitraz (266; 293; 314) e cipermetrina (163; 165; 181).

Validação

A validação foi feita utilizando a calibração por superposição na matriz para minimizar o efeito matriz, sendo avaliados os parâmetros de exatidão (recuperação), precisão (desvio padrão relativo), coeficiente de determinação, linearidade e limites de detecção (LD) e quantificação (LQ). A recuperação é a medida de eficiência do processo de isolamento do analito de interesse na matriz, no qual se encontra presente.²⁷ Em métodos destinados à análise de alimentos quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários, a exatidão tem sido avaliada mediante o teste de recuperação.⁴¹ A precisão expressa o grau de repetibilidade entre os resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado mais de uma vez em uma amostra homogênea, em idênticas condições de análise.²⁵ A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado.²⁷ Foi calculada construindo-se a curva de calibração externa para cada medicamento em estudo, em triplicata, depois de submetidos ao processo de extração, avaliando-se cinco níveis diferentes de concentração. O limite de detecção é definido como a menor quantidade de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato. Seu cálculo foi feito multiplicando-se três vezes o desvio padrão do ruído medido (3S), empregando-se um branco.²⁷ O limite de quantificação é a menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma fidelidade determinada. Foi calculado como dez vezes o desvio padrão do ruído (10S) empregando-se um branco.²⁷

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Preparo da amostra – método QuEChERS

As amostras de leite e carne de búfalo foram fortificadas com os padrões analíticos de clorpirifós, clorfenvinfos, fipronil, amitraz e cipermetrina, na concentração de 0,1 mg kg⁻¹, submetidas à extração, através do QuEChERS.^{13,14} A eficiência do processo de extração foi avaliada considerando-se os valores de recuperação e o desvio padrão relativo (DPR).

Na primeira etapa do processo de extração, partição líquido-líquido,¹³ utilizaram-se 10 g de amostra, 10 mL de MeCN, 4 g de MgSO₄ e 1 g de NaCl, sendo que os resultados de recuperação e DPR obtidos estiveram fora da faixa de aceite estabelecida pelo Documento SANCO n° 10684/2009,⁴² 70 a 120% e menor que 20%, respectivamente. Com o objetivo de se melhorar os resultados obtidos, reduziu-se a massa de amostra e sua proporção em relação ao solvente acetonitrila. Utilizaram-se 2 g de amostra, 4 mL de MeCN, 0,8 g de MgSO₄ e 0,2 g de NaCl. Na segunda etapa do processo aplicou-se a extração em fase sólida dispersiva (d-SPE),¹⁴ utilizando 1 mL da fase superior formada na partição líquido-líquido, 50 mg de PSA, 50 mg de C₁₈ e 150 mg de MgSO₄. O uso do procedimento descrito por Anastassiades *et al.*,¹³ foi devido aos analitos em estudo não necessitarem do uso de um tampão, já a aplicação do método proposto por Lehotay *et al.*,¹⁴ na segunda etapa do método, proporcionou um *clean-up* mais efetivo devido ao uso do PSA e à adição de C₁₈. Para melhorar a eficiência do método de extração, considerando as características do analito, alguns procedimentos podem ser necessários: ajuste do pH, adição de C₁₈ e PSA na d-SPE, redução da clorofila e carotenoides⁴³ e congelamento do extrato.⁴⁴ Após a d-SPE, uma alíquota de 0,7 mL do extrato foi congelada por 2 h e 0,5 mL do sobrenadante foram transferidos para o frasco do injetor automático e analisado por CG-EM. A Figura 1 apresenta os cromatogramas dos extratos obtidos após extração por QuEChERS, na análise de clorpirifós, clorfenvinfos, amitraz, fipronil e cipermetrina, em carne e leite de búfalo, que resultou em extratos que contêm os analitos em estudo, com altos valores de recuperação e livres de interferentes na região do cromatograma próxima ao tempo de retenção dos analitos.

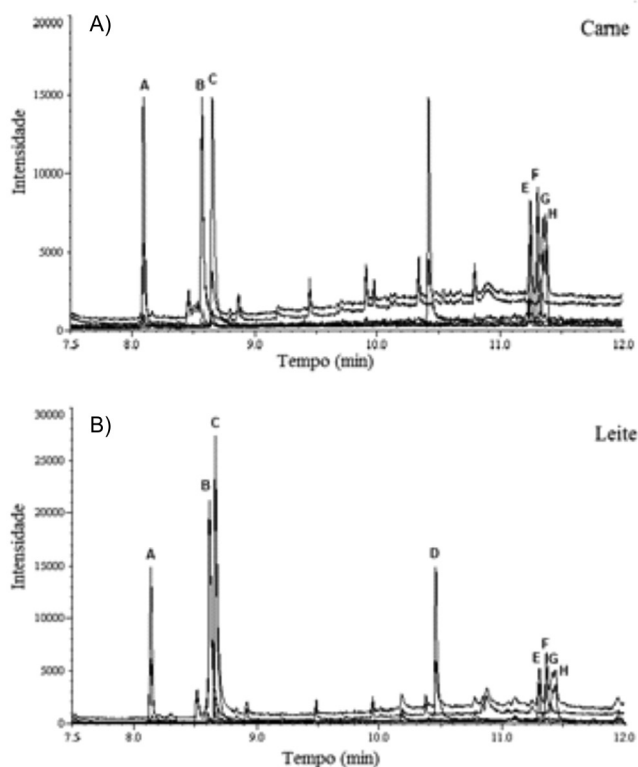


Figura 1. Cromatogramas após extração pelo método de QuEChERS, seguida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, em amostras de carne (A) e leite (B) de búfalo. Concentração dos analitos: 0,1 mg kg⁻¹. EM operando no modo MIS. Coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,1 μm). Programação de temperatura do forno: 120 °C – 4 °C min⁻¹ – 190 °C – 32 °C min⁻¹ – 270 °C (4 min). A = clorpirifós; B = clorfenvinfos; C = fipronil; D = amitraz; E, F, G, H = cipermetrina

O analito cipermetrina possui três centros de quiralidade, apresentando oito estereoisômeros (isômeros ópticos). O CG-EM utilizado não é capaz de separar os oito isômeros, detectando apenas quatro picos, que correspondem aos quatro pares enantioméricos, *cis1*, *cis2*, *trans1* e *trans2*.⁴⁵ Os resultados apresentados referentes à cipermetrina referem-se à somatória das áreas dos quatro picos.

Avaliação do efeito de matriz

Segundo Hajšlova *et al.*,⁴⁶ alguns dos fatores que podem contribuir com o efeito matriz incluem natureza do analito, natureza da matriz, proporção analito-matriz e o sistema CG. Pinho *et al.*⁴⁷ consideraram que a exatidão e precisão dos resultados das análises de traços por cromatografia gasosa são afetadas pelo efeito de matriz, principalmente quando se utilizam soluções padrão preparadas em solvente puro para a quantificação destes em matrizes de natureza complexa. Entre os diversos métodos propostos para minimizar o efeito de matriz, o mais comum é o uso de soluções padrão preparadas no extrato branco da matriz.

A Figura 2 apresenta as curvas analíticas dos analitos estudados, avaliando-se as concentrações de 0,050; 0,100; 0,200 e 0,500 mg kg⁻¹, nas quais se percebe uma correlação bem maior dos extratos com os extratos branco da matriz, quando comparadas com os padrões preparados em solvente, evidenciando a ocorrência de efeito matriz. O extrato corresponde ao leite ou carne fortificada com os analitos e submetida ao processo de extração; o extrato branco da matriz refere-se ao leite ou carne submetida ao processo de extração e após ser fortificada com os analitos e o padrão aos analitos preparados em solvente acetonitrila. Portanto, nos cálculos de recuperação e precisão de clorpirifós, clorfenvinfos, fipronil, amitraz e cipermetrina, os padrões analíticos foram preparados no extrato branco da matriz.

Validação da metodologia analítica

Após a otimização das condições de extração na análise de clorpirifós, clorfenvinfos, fipronil, amitraz e cipermetrina em carne e leite de búfalo, realizou-se a validação da metodologia analítica, método QuEChERS–CG-EM.

Recuperação e precisão

Neste estudo os valores de recuperação e precisão (desvio padrão relativo – DPR) foram determinados por análises em triplicata, de amostras de leite e carne fortificadas com os padrões analíticos, avaliando-se as concentrações de 0,100; 0,200 e 0,500 mg kg⁻¹. Os valores médios de recuperação variam de 83 a 112%, com valor máximo de DPR de 17%, para o leite e de 81 a 120%, com DPR máximo de 15%, para a carne (Tabela 1) de modo que todos se encontram dentro da faixa de aceite estabelecida pelo Documento SANCO n° 10684/2009,⁴² 70 a 120% para a recuperação e até 20% para DPR.

Linearidade

Foi determinada pela curva de calibração obtida pelo método do padrão externo. No cálculo da linearidade foram consideradas as concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,35 e 0,50 mg kg⁻¹ para a carne, exceção para o analito cipermetrina onde a concentração mais baixa analisada foi 0,1 mg kg⁻¹ e a mais alta 0,75 mg kg⁻¹ e as concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 mg kg⁻¹ para o leite (Figura 3), obtendo-se coeficientes de determinação variando de 0,9612 a 0,9953 para a carne e de 0,9500 a 0,9973 para o leite. O método desenvolvido mostrou-se linear nas concentrações analíticas analisadas, com coeficientes de

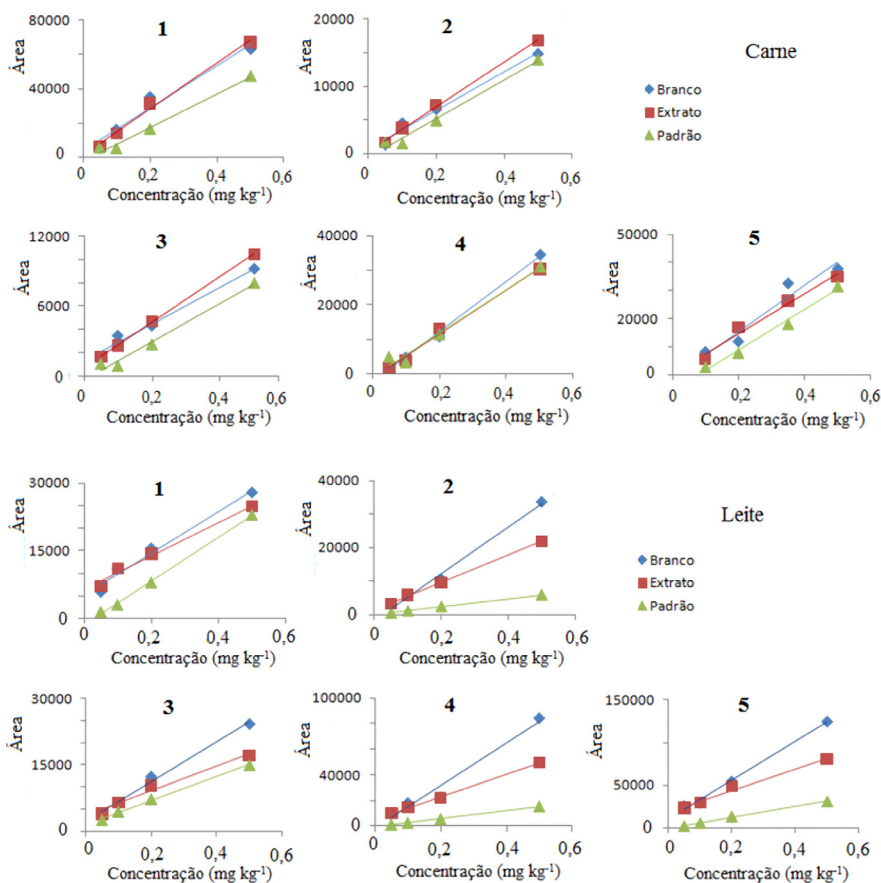


Figura 2. Gráfico analítico de clorfeninfos (1), clorpirifós (2), fipronil (3), amitraz (4) e cipermetrina (5), presentes no extrato, branco e em solvente acetoni-trila, nas concentrações de 0,050; 0,100; 0,200 e 0,500 mg kg⁻¹. Matrizes carne e leite de búfalo

Tabela 1. Valores de recuperação (%) e desvio padrão relativo (DPR) para clorfeninfos, clorpirifós, fipronil, amitraz e cipermetrina, em leite e carne de búfalo

| Medicamento veterinário | Concentração (mg kg ⁻¹) | | | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|
| | 0,1 | | 0,2 | | 0,5 | |
| | Leite | Carne | Leite | Carne | Leite | Carne |
| Clorfeninfos | 94±8 | 105±2 | 85±11 | 89±2 | 110±2 | 87±10 |
| Clorpirifós | 103±5 | 113±8 | 91±14 | 111±1 | 106±17 | 95±5 |
| Fipronil | 101±3 | 114±3 | 83±13 | 109±2 | 102±4 | 102±2 |
| Amitraz | 96±5 | 87±2 | 97±9 | 108±7 | 89±13 | 81±3 |
| Cipermetrina | 97±7 | 92±1 | 90±5 | 120±3 | 112±15 | 93±15 |

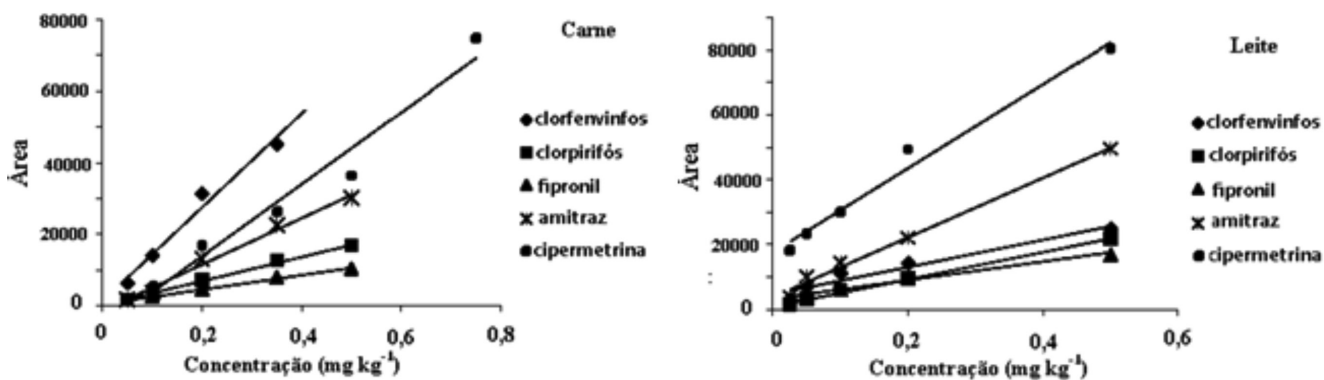


Figura 3. Curvas analíticas de clorfeninfos, clorpirifós, fipronil, amitraz e cipermetrina, nas matrizes leite e carne de origem bubalina

Tabela 2. Valores dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para clorfenvinfos, clorpirifós, fipronil, amitraz e cipermetrina, nas matrizes carne e leite de búfalo e limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pelo Codex Alimentarius, FAO e OMS, para os analitos em estudo

| Medicamento veterinário | LD (mg kg ⁻¹) | | LQ (mg kg ⁻¹) | | LMR (mg kg ⁻¹) | |
|-------------------------|---------------------------|-------|---------------------------|-------|----------------------------|-------|
| | Leite | Carne | Leite | Carne | Leite | Carne |
| Clorfenvinfos | 0,007 | 0,02 | 0,025 | 0,07 | - | - |
| Clorpirifós | 0,003 | 0,02 | 0,01 | 0,007 | 0,02 | 1 |
| Fipronil | 0,007 | 0,03 | 0,025 | 0,1 | 0,02 | 0,5 |
| Amitraz | 0,007 | 0,03 | 0,025 | 0,1 | 0,01 | 0,05 |
| Cipermetrina | 0,007 | 0,05 | 0,025 | 0,16 | 0,05 | 2 |

- não registrado

determinação superiores a 0,9500, demonstrando que o detector de massas responde bem às concentrações injetadas.

Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados aplicando-se o método analítico desenvolvido, QuEChERS–CG-EM. A Tabela 2 apresenta os valores de LD e LQ para os medicamentos veterinários em estudo e os valores dos limites máximos de resíduos (LMRs) estabelecidos pelo *Codex Alimentarius*, FAO e OMS,⁴⁸ para a carne e leite bovinos, visto que não foram estabelecidos limites para o gado bubalino. Os valores de LQ obtidos são iguais ou inferiores aos LMRs estabelecidos pela legislação, com exceção para amitraz.

CONCLUSÃO

O método proposto para análise de clorpirifós, clorfenvinfos, fipronil, amitraz e cipermetrina em leite e carne de búfalo, método QuEChERS–CG-EM, mostrou-se sensível, preciso e reprodutível, sendo o limite de quantificação para cada medicamento veterinário igual ou inferior ao limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido pelo *Codex Alimentarius*, FAO e OMS, com exceção para amitraz. Os valores de recuperação e precisão obtidos estão compreendidos no intervalo de aceite estabelecido pelo Documento SANCO nº 10684/2009, ao manter no processo de extração uma relação de amostra e solvente extrator de 1:2. Boa linearidade foi obtida para os cinco analitos estudados, com coeficientes de determinação superiores a 0,9500. Constatou-se o efeito de matriz, sendo observada maior correlação do extrato com o extrato branco da matriz do que com os padrões analíticos preparados em solvente orgânico. A técnica mostrou-se rápida e de baixo custo, com consumo reduzido de solventes orgânicos (4 mL), podendo ser utilizada como um protocolo para investigar a presença de resíduos de clorpirifós, clorfenvinfos, fipronil, amitraz e cipermetrina em amostras de leite e carne de búfalo.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro (processos 04/11736-9; 05/53188-0; 300085/2010-9).

REFERÊNCIAS

- Andrade, V. J.; Garcia, S. K.; *Rev. Bras. Reprod. Anim.* **2005**, *29*, 39.
- Gonçalves, O.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008.
- MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento); <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>, acessada em Julho 2011.
- Rosa, B. R. T.; Ferreira, M. M. G.; Avante, M. L.; Zangirolami Filho, D.; Martins, I. S.; *Revista científica eletrônica de medicina veterinária* **2007**, *8*, 1.
- Teixeira, L. V.; Bastianetto, E.; Oliveira, D. A. A.; *Rev. Bras. Reprod. Anim.* **2005**, *29*, 96.
- <http://www.portaldoagronegócio.com.br>, acessada em Setembro 2011.
- Oliveira, A. L.; *Rev. Bras. Reprod. Anim.* **2005**, *29*, 122.
- EMEA - The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Committee for Veterinary Medicinal Products Cypermethrin, 2002; <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/080101enpdf>, acessada em Dezembro 2011.
- JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2004; <http://www.who.int/pcs/food/jecfa/jecfahtm>, acessada em Dezembro 2011.
- http://www.aveworld.com.br/artigos/post/residuos-de-medicamentos-veterinarios-em-alimentos_113, acessada em Novembro 2010.
- Gallo Netto, C.; *Jornal da UNICAMP*, Brasil, 2009, 5 a 18/10/09, p. 9.
- Codex Alimentarius; <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html>, acessada em Agosto 2011.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J.; *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412.
- Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Yun, S. J.; *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 630.
- Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7001.
- Hercegová, A.; Dömötöróvá, M.; Kruzlicová, D.; Matisová, E.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1102.
- Koesukwiat, U.; Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Dorweiler, K. J.; Leepipatpiboon, N.; *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5950.
- Cunha, S. C.; Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Fernandes, J. O.; Oliveira, M. B. P. P.; *J. Sep. Sci.* **2007**, *30*, 620.
- Stubbings, G.; Bigwood, T.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *637*, 68.
- Mastovska, K.; Lightfield, A. R.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1202*, 118.
- Kinsella, B.; Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Lightfield, A. R.; Furey, A.; Danaher, M.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *637*, 196.
- Aguilera-Luiz, M. M.; Vidal, J. L.; Romero-González, R.; Frenich, A. G.; *J. Chromatogr., A* **2008**, *1205*, 10.
- Brondi, S. H. G.; Macedo, A. N.; Souza, G. B.; Nogueira, A. R. A.; *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2011**, *46*, 1.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de cromatografia*, Ed. da UNICAMP: Campinas, 2006.
- Vieira, E.; Lichtig, J.; *Arq. Inst. Biol.* **2004**, *71*, 1.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
- Lanças, F. M.; *Validação de métodos cromatográficos de análise*, Rima: São Carlos, 2004.
- Hill, A. R. C.; Reynolds, S. L.; *Analyst* **1999**, *124*, 953.
- Cassiano, N. M.; Barreiro, J. C.; Martins, L. R. R.; Oliveira, R. V.; Cass, Q. B.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 1021.
- Schenck, F. J.; Lehotay, S. J.; *J. Chromatogr., A* **2000**, *868*, 51.

31. Erney, D. R.; Gillespie, A. M.; Gilvydis, D. M.; Poole, C. F.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *638*, 57.
32. Hajslová, J.; Zrostlíková, J.; *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 181.
33. Mastovska, K.; Lehotay, S. J.; Anastassiades, M.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 8129.
34. Lehotay, S. J.; Mastovska, K.; Lightfield, A. R.; Gates, R. A.; *J. AOAC Int.* **2010**, *93*, 355.
35. Anastasio, A.; Esposito, M.; Amorena, M.; Catellani, P.; Serpe, L.; Cortesi, M. L.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5241.
36. Bulut, S.; Akkava, L.; Gök, V.; Konuk, M.; *Environ. Monit. Assess.* **2011**, *181*, 555.
37. John, P. J.; Bakore, N.; Bhatnagar, P.; *Environ. Int.* **2001**, *26*, 231.
38. Kumar, P.; Singh, S. P.; Ahmad, A. P.; Rao, V. D. P.; *Int. J. Food Saf., Nutr. Publ. Health* **2008**, *1*, 189.
39. Muthukumar, M.; Sudhakar Reddy, K.; Narendra Reddy, C.; Kondal Reddy, K.; Gopala Reddy, A.; Jagdishwar Reddy, D.; Kondaiah, N.; *J. Food Sci. Technol.* **2010**, *47*, 325.
40. Pradeep, K.; Singh, S. P.; Madhukar, D.; Kotresh, A. M.; *Buffalo Bulletin* **2009**, *28*, 188.
41. Paschoal, J. A. R.; Rath, S.; Airoidi, F. P. S.; Reyes, F. G. R.; *Quim. Nova* **2008**, *31*, 1190.
42. Documento No. SANCO/10684/2009, Supersedes Documento No. SANCO/3131/2007, Implemented by 01/01/2010; http://www.ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf, acessada em Março 2011.
43. <http://chromatographyonline.findanalytichem.com/legc/article/articleDetail.jsp?id=680292>, acessada em Janeiro 2012.
44. http://www.chem.agilent.com/Library/posters/Public/Avocado_poster_EPRW2006.pdf, acessada em Janeiro 2012.
45. Sassine, A.; Moura, S.; Léó, V. M.; Bustillos, O. V.; *J. Anal. Toxicol.* **2004**, *28*, 238.
46. Hajslová, J.; Holadová, K.; Kocourek, V.; Poustka, J.; Godula, M.; Cuhra, P.; Kempný, M.; *J. Chromatogr., A* **1998**, *800*, 283.
47. Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R.; Silvério, F. O.; *Quim. Nova* **2009**, *32*, 987.
48. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/index.html#C>, acessada em Janeiro 2012.