

Validação de método multiresíduo para análise de pesticidas organohalogenados em maçãs

Validation of multiresidue method for analysis of organohalogenates pesticides in apples

RIALA6/995

Marvina N. IMOTO^{1*}, Paulo S. G. FONTOURA², Renato J. S. de FREITAS³

* Endereço para correspondência: ^{1*} Mestranda em Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos –Dep. De Eng. Química da Universidade Federal do Paraná – Caixa Postal 19011 –CEP 81531-990.Curitiba – Paraná,

e-mail: marvina@engquim.ufpr.br

² Professor, Mestre do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Dep. De Eng. Química da Universidade Federal do Paraná. Perito do Instituto de Criminalística do Paraná, Curitiba – Paraná

³ Professor, Doutor do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – UFPR, Curitiba –Paraná.

Recebido: 26/03/2004 - aceito para publicação: 08/11/2004

RESUMO

Para a realização de programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, os métodos multiresíduos são ideais pela possibilidade de determinar simultaneamente diversos tipos de pesticidas em uma única extração. Entretanto, para a validação desses métodos, os principais critérios a serem vistos são: especificidade, seletividade, linearidade, limites de detecção, limites de quantificação, robustez, exatidão e precisão, sendo os dois últimos parâmetros os que possibilitam estimar os erros e as variações embutidos no processo analítico. Neste trabalho, foram conduzidos ensaios de recuperação de pesticidas organohalogenados através de fortificações realizadas em maçãs nos níveis 1LOQ e 5 LOQ de cada pesticida para verificação da precisão e exatidão do método. As determinações dos pesticidas foram feitas por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, e, para a verificação dos parâmetros exatidão e precisão, os resultados obtidos evidenciaram que as recuperações ficaram entre 74% a 111%, e os coeficientes de variação entre 5,0 % e 14,0 %, estando os valores enquadrados dentro dos limites recomendados pela literatura para análise de resíduos de pesticidas.

Palavras-Chave. métodos analíticos; validação; cromatografia; pesticidas; maçãs

ABSTRACT

To development programs of monitoring residues of pesticides in foods, the multiresidue methods are the choice, because many kind of pesticide are determined with only one extraction. However, to evaluate the analytical process, the main traits are: specificity, selectivity, linearity, limits of detection, limits of quantification, ruggedness, precision and accuracy, being the two last ones, the main parameters to estimate the errors and variations included in the process. In this work, recovery assays of some organohalogenate pesticides were made in apples in 1 LOQ and 5 LOQ of each pesticide to verify the accuracy and precision of method. The pesticides were determined by gas chromatographic with electron capture detector, and the results showed that, the recovery obtained were between 74% and 111%, and variation coefficients between 5 % and 14 %, evidenced that the values are in the range recommended by literature .

Key-Words. analytical methods; validation; chromatography; pesticides; apples.

INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento de novos métodos aliados ao uso de equipamentos com tecnologias avançadas, os processos para análises de resíduos de pesticidas devem sempre incluir a validação dos métodos utilizados e não apenas sua otimização²¹.

Sob o ponto de vista prático, pode-se dizer que um método, após ser desenvolvido, deve ser submetido a um processo de avaliação que estime sua eficiência. Este processo de avaliação costuma ser chamado de validação. Um método será considerado validado se suas características estiverem em conformidade com os pré-requisitos exigidos. Existe, portanto, uma diferença entre avaliação de processo, que consiste na coleção dos dados experimentais, e a validação propriamente dita, que deve verificar a relação entre os resultados experimentais¹⁰.

No sentido rigoroso, entretanto, a validação de métodos representa uma parte do processo total que abrange também vários diferentes aspectos. Segundo Krull e Swartz, a validação é um processo formado por quatro fases, cada uma delas crítica ao sucesso total do processo: 1) validação do software; 2) qualificação do hardware; 3) validação do método; 4) adequação do sistema. O processo começa com um software validado. Então um método validado pode ser desenvolvido a partir de um sistema qualificado. Finalmente, todo o processo é integrado através de um sistema adequado.

Embora os órgãos regulamentadores façam referência às quatro abordagens¹, neste trabalho o enfoque foi sobre validação de método, especificamente nos parâmetros exatidão e precisão.

De acordo com as atuais normas regulamentadoras para os métodos de ensaio e calibração, a validação de métodos é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos². Segundo as normas da NBR ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, os parâmetros recomendados para validação de métodos devem ser claramente declarados nos procedimentos documentados e incluir, quando aplicável, especificidade, seletividade, faixa de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e tendência (bias), precisão, robustez e incerteza de medição².

Em programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, nos quais são analisados diversos tipos de pesticidas nas mais variadas matrizes, os métodos multiresíduos são os processos analíticos de escolha pela possibilidade de determinação de um grande número de pesticidas em uma determinada matriz, utilizando uma única etapa de extração. Existem vários tipos de métodos multiresíduos descritos na literatura^{19,20,24}, os quais são mais ou menos eficientes de acordo com o pesticida, a matriz e o método utilizado, levando-se em conta as propriedades físico-químicas de cada ativo e as características de cada método.

As validações de métodos realizados em laboratórios são apropriadas em várias circunstâncias: para assegurar a viabilidade de um método de baixo custo, para a garantia da

confiabilidade do método em estudos colaborativos formais e para assegurar que as recomendações dos parâmetros de validação de métodos estão sendo usados corretamente²³.

A validação de métodos multiresíduos para pesquisa de pesticidas em várias matrizes pode ser realizada facilmente em laboratório, mediante ensaios de recuperação a partir de amostras fortificadas com soluções padrões com concentrações conhecidas, provenientes de padrões primários certificados⁶, e na ausência destes com soluções padrões rastreáveis¹¹.

Neste processo, a avaliação dos parâmetros precisão e exatidão é considerada a mais relevante porque permite estimar estatisticamente os erros e as variações existentes através dos resultados gerados. A exatidão pode ser estimada pelo erro absoluto e relativo, e a precisão pelas medidas de dispersão (bias), como desvio padrão, variância e coeficiente de variação, entre outras⁶. A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos, de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas²³ e costuma ser estimada em estudos intralaboratoriais⁹ para a demonstração da repetitividade, que expressa a precisão do método realizada sob condições de análise iguais, em um pequeno intervalo de tempo, considerando-se o mesmo analista, equipamento e condições ambientais. Normalmente, a precisão é expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação obtidos entre os resultados dos ensaios repetitivos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os resultados obtidos nos parâmetros exatidão e precisão em ensaios conduzidos para recuperação de pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, utilizando a técnica de extração do método multiresíduo²⁴. As fortificações da matriz no nível 1 LOQ equivalente a concentração de 0,02 mg/K, e no nível 5 LOQ com concentração equivalente a 0,1 mg/Kg da amostra, foram realizadas para verificação da recuperação dos pesticidas no limite de quantificação proposto pelo método da relação sinal/ruído na proporção 10:1 dos compostos na matriz, e verificação da performance do mesmo em uma faixa de concentração de padrões usual para este tipo de análise, respectivamente. Os dados obtidos das recuperações foram submetidos a um modelo estatístico (teste *t de Student*), aplicável para um número de amostras igual ou inferior a 20 para confirmação da exatidão do método em um determinado intervalo de confiança pré-estabelecido.

Para o estudo da precisão do método, foram verificados os coeficientes de variação obtidos nos ensaios de recuperações de cada pesticida e avaliados quanto à aceitabilidade do método, de acordo com as recomendações descritas na literatura para os níveis de concentrações trabalhados.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras utilizadas para realização dos ensaios foram maçãs orgânicas previamente analisadas e isentas de

agrotóxicos. Uma alíquota dessa amostra serviu como testemunha dos ensaios realizados para verificação dos interferentes da matriz na área de interesse.

Padrões

Os padrões utilizados neste estudo foram padrões certificados, adquiridos de uma empresa alemã, Dr. Ehrenstorfer, sob a forma de padrões primários. Esses mesmos padrões foram pesados após cálculos para correção dos pesos em relação ao percentual de pureza dos mesmos, e diluídos em solventes orgânicos para obtenção de soluções estoques de cada padrão com concentrações por volta de 0,01%. A partir das soluções estoque foram preparados outras soluções intermediárias e de trabalho para a execução das curvas de calibração dos pesticidas organohalogenados.

Os compostos estudados para o processo foram: β HCH, Clorotalonil, Endosulfan I, Endosulfan II, Endosulfan sulfato, Tetradifona, Trifluralina e Vinclozolina. As estruturas químicas dos compostos ensaiados são mostradas na Figura 1.

Método analítico

Para a realização dos ensaios de recuperação dos pesticidas organohalogenados com a utilização da técnica de extração do método multirésíduos, modelo europeu¹⁷, e apesar das recomendações da realização de testes de recuperações em três níveis 1 LOQ, 2 LOQ e 10 LOQ nos processos de validação de métodos, neste trabalho em que os objetivos foram a realização de ensaios experimentais para testes de recuperação dos pesticidas em estudo para determinação do limite de

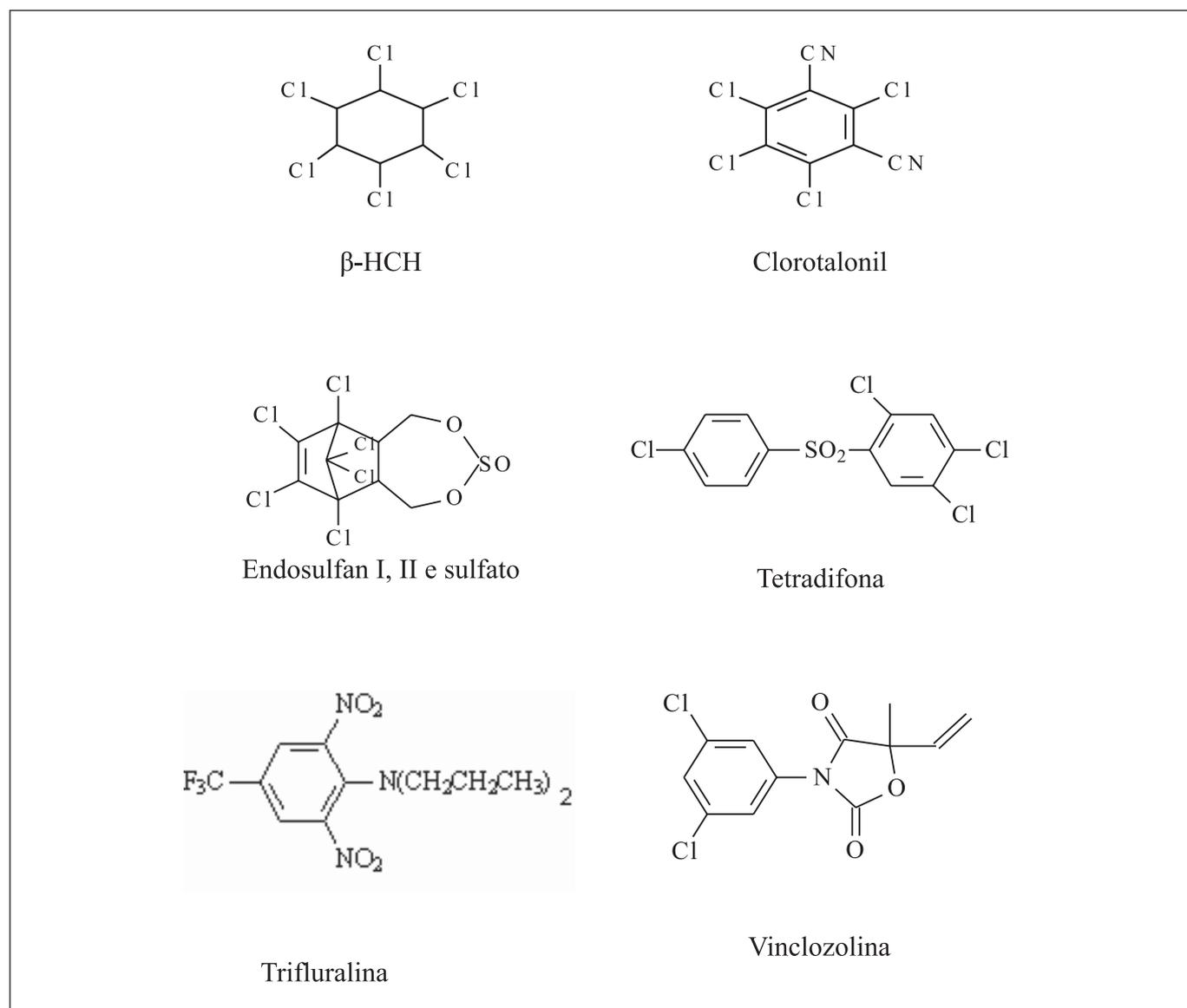


Figura 1. Estrutura química dos pesticidas recuperados em maçãs

quantificação proposto (1 LOQ = 0,02 mg/Kg), e a verificação da performance do método em um nível de concentração comum para este tipo de análise (5 LOQ = 0,1 mg/Kg), foram conduzidos fortificações da matriz com as misturas das soluções padrões somente em dois níveis, 1LOQ e 5LOQ, com cinco ensaios repetitivos em cada nível, no início e faixa final respectivamente, da faixa de trabalho do método. Dessa forma, foram conduzidos 10 ensaios com fortificações das matrizes com misturas de soluções padrões, seguidas dos processos de recuperação dos pesticidas pelo processo analítico de escolha.

As amostras foram cortadas em pequenos pedaços de cerca de dois centímetros, trituradas em processador de alimentos de laboratório até homogeneização completa e acondicionadas em frascos de vidro de boca larga com capacidade de 1kg. Da amostra homogeneizada, foram pesadas 11 alíquotas de 15 gramas cada, em bequer de forma alta com capacidade para 500 mL: 5 alíquotas para o nível de fortificação I, 5 alíquotas para o nível de fortificação II e 1 alíquota para a amostra Testemunha. As amostras, com exceção da Testemunha, foram fortificadas com 1,0 mL cada, com misturas das soluções padrões previamente preparadas em acetona grau resíduo, nas concentrações de 0,3 µg/ mL para cinco fortificações no nível 1LOQ e 1,5µg/ mL para cinco fortificações no nível 5LOQ.

As amostras assim fortificadas ficaram com concentrações finais de 0,02 mg/kg no nível 1LOQ e 0,10 mg/kg no nível 5LOQ de cada ativo em estudo. Após o processo de fortificação, as amostras ficaram no mínimo por três horas em capelas de exaustão, para a interação dos ativos com a matriz e evaporação do solvente utilizado na mistura dos padrões^{6,8}.

Decorridos o tempo necessário, os pesticidas foram então extraídos com auxílio de um ultra Turrax, ajustado a 15.000 rpm, com 30 mL de acetona grau resíduo por 15 segundos, seguidos da adição de mais 60 mL da mistura dos solventes diclorometano e n-hexano grau resíduo, na proporção de 1:1, por mais 15 segundos. As duas amostras (Testemunha), bem como outra amostra contendo a mistura dos solventes utilizados (Branco) foram conduzidas da mesma forma nos ensaios, para verificação de possíveis contaminações e interferentes da matriz na área de interesse¹².

As misturas, após homogeneização, foram filtradas em funil analítico contendo sulfato de sódio anidro, e dos extratos orgânicos, tomaram-se alíquotas de 0,3 mL para cada teste, para determinação das recuperações dos ativos em estudos. Os solventes das amostras foram evaporadas à temperatura ambiente até secar total e os resíduos foram novamente ressuspensos em mistura de isooctano-tolueno na proporção de 9:1 até o volume final de 1,0 mL. Foram injetados 1 µL de cada teste, em cromatógrafo gasoso equipado com detector de captura de elétrons.

As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes:

Equipamento: cromatógrafo gasoso marca Varian, com detector de captura de elétrons, com fonte de Ni₆₃, modelo CP 3800, com injetor e amostrador automáticos.

Coluna: sílica fundida CP-8 (30 m x 0,25 mm x 1,5 µm de diâmetro de filme)

Injetor: temperatura 240°C

Modo de injeção: splitless

Detector: temperatura 300°C

Fluxo do gás de arraste: 1,5 mL/ min (Nitrogênio para ECD)

Rampa: 90°C por 3', 10°C/min até 180°C, 5°C/min até 230°C, 10°C/ min até 280°C mantendo por 10min. Tempo total da corrida = 55 minutos.

As determinações qualitativa e quantitativa dos resíduos recuperados foram obtidas pela média das três leituras consecutivas de cada ensaio nas curvas de calibração previamente realizadas com a mistura dos vários ativos em estudo no extrato orgânico obtido no processo de extração da amostra Testemunha para neutralizar o efeito matriz^{12,13}. A identificação dos compostos foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos nos ensaios com os respectivos padrões analíticos, e a determinação quantitativa dos compostos recuperados pelo método de padronização externa.

As concentrações dos pontos da curva de calibração analítica ficaram com as seguintes concentrações em ordem crescente, respectivamente: 0,005mg/kg; 0,01 mg/kg; 0,02 mg/kg (1 LOQ); 0,04 mg/kg; 0,06 mg/kg e 0,10 mg/kg (5 LOQ). As curvas de calibração com os fatores de correlação (r^2) obtidos e ilustrados nas Figuras 2 a 9 fazem parte dos resultados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exatidão expressa a capacidade de um método analítico obter resultados próximos ao valor real e é estimada pelo cálculo do erro absoluto ou do erro relativo, sendo considerado a chave para a validação de um método⁴. Neste estudo, a exatidão foi avaliada pelos resultados obtidos nas recuperações das maçãs fortificadas e comparação estatística com os valores do padrão certificado.

Os valores das recuperações realizadas obtidos da média de três leituras e submetidos ao teste de hipóteses¹⁶, para verificação da exatidão do método são apresentados na Tabela 1.

Segundo vários autores^{11,14,15}, para análise em nível de traços, costuma-se considerar como aceitável recuperações que estejam no intervalo de 70% a 120% do valor esperado, mesmo que no teste t se rejeite a hipótese nula H_0 = recuperação 100%. Em análises de recuperações de pesticidas em baixos níveis de concentrações equivalentes aos limites de detecção e ao menor nível de quantificação (LOQ), o Codex Alimentarius⁸ prevê recuperações em intervalos aceitáveis até entre 60% a 140%.

Para a confirmação da exatidão do método, os resultados das recuperações obtidos foram submetidos ao teste de hipóteses, em que, submetendo-se os resultados das recuperações obtidas nos ensaios ao teste *t de Student* que permite comparações entre séries simples para um determinado

intervalo de confiança, foi possível avaliar os resultados quanto à exatidão do método. Assim, estabelecida como hipótese nula H_0 = recuperação 100% e como hipótese alternativa H_1 = recuperação ≠ de 100%, aplicou-se o teste *t de Student* com um intervalo de 99% de confiança e *n-1* graus de liberdade para cada ativo. Os valores obtidos do $t_{calculado}$ mostraram-se abaixo do valor de $t_{tabelado}$ para o intervalo de confiança estabelecido, aceitando-se a hipótese nula H_0 , isto é, não existem diferenças

significativas entre as recuperações obtidas e o valor da recuperação 100% esperado.

Para o cálculo do $t_{calculado}$, utilizou-se da seguinte equação:

$$t_{calculado} = \frac{\text{Rec \%} - 100 \%}{s / \sqrt{n - 1}}$$

Figura. 2. β-HCH $r^2 = 0,999904$

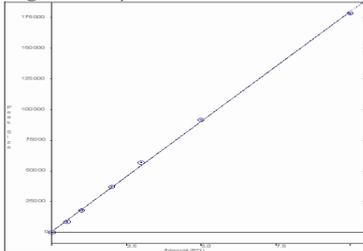


Figura. 3. Clorotalonil $r^2 = 0,999494$

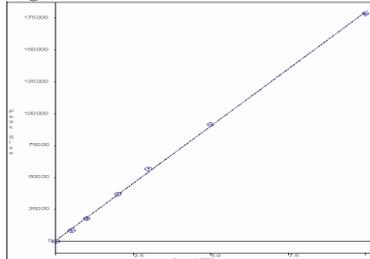


Figura. 4. Endosulfan I $r^2 = 0,999111$

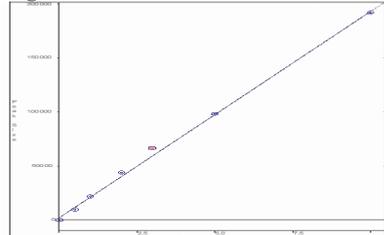


Figura. 5. Endosulfan II $r^2 = 0,999163$

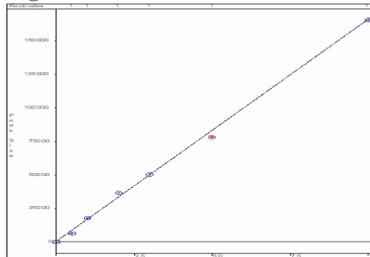


Figura. 6. Endosulfan sulfato $r^2 = 0,999631$

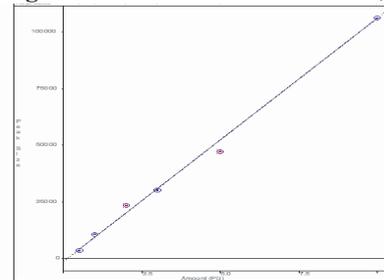


Figura. 7. Tetradifona $r^2 = 0,999511$

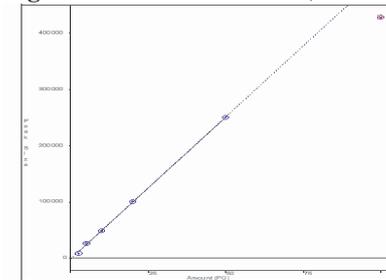


Figura. 8. Trifluralina $r^2 = 0,999393$

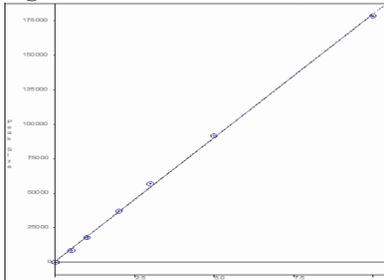
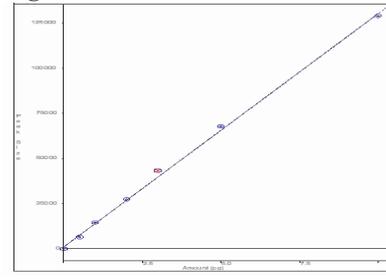


Figura. 9. Vinclozolina $r^2 = 0,999277$



Figuras 2 a 9. Curvas de calibração dos pesticidas com os valores de coeficiente de correlação (r^2) obtidos

Tabela 1. Valores de recuperações obtidos dos pesticidas

Pesticidas	n	Nível (mg/kg)	Recuperação média (%)	t _{calculado}	S	CV (%)
β-HCH	5	0,02	106	1,20	9,95	9,5
	5	0,1	83	-3,72	9,12	11,0
Clorotalonil	5	0,02	107	1,36	10,3	9,5
	5	0,1	111	2,54	8,64	7,8
Endosulfan I	5	0,02	99	-0,15	13,10	13,0
	5	0,1	95	-1,67	5,97	6,3
Endosulfan II	5	0,02	94	-1,02	11,73	12,5
	5	0,1	93	-2,67	5,24	5,5
Endosulfan (sulfato)	5	0,02	92	-1,37	11,62	12,5
	5	0,1	93	-2,10	6,65	7,3
Tetradifona	5	0,02	74	-4,66	9,87	13,5
	5	0,1	-	-	-	-
Trifluralina	5	0,02	81	-3,39	11,20	14,0
	5	0,1	92	-2,96	5,40	6,0
Vinclozolina	5	0,02	108	1,05	15,24	14,0
	5	0,1	103	1,20	4,97	5,0

n= numero de análises; S= Variância; CV= Coeficiente de Variação; t₅, 99%= 4,032

Onde:

Rec= % recuperação média

100 =% recuperação esperada

s é o desvio padrão

n é o número de replicatas (Graus de Liberdade igual a

5 para este estudo)

A precisão de um método é definida como sua capacidade de fornecer resultados com baixa dispersão, ou seja, um método é considerado preciso quando ao analisar uma mesma amostra várias vezes, os resultados obtidos são bem próximos entre si e é estimada por medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação, entre outras.

Em análises de resíduos de pesticidas, considera-se que o método é preciso quando os coeficientes de variação apresentam-se menores que 20%. Este valor deve-se aos baixos níveis de concentração determinados^{5,13,15,18}

O desvio padrão absoluto bem como o desvio padrão relativo ou coeficientes de variação obtidos a partir dos ensaios de recuperação são considerados adequados para análise de resíduos de pesticidas, quando valores iguais ou inferiores a 20% são encontrados, em que, dependendo dos níveis de concentração dos analitos ou massa a ser detectada, os desvios tornam-se maiores, nos quais as grandezas de variabilidade podem ser consideradas aceitáveis, conforme literaturas da área^{13, 18, 22,23}. Na Tabela 2, são demonstrados os coeficientes de variação aceitáveis pela União Européia¹³ e da AOAC⁵, em que, de acordo com o aumento das concentrações há uma diminuição dos desvios padrões relativos (CV%).

Para o estudo da precisão do método, foram verificados os parâmetros de repetitividade, obtidos nos graus de concordância entre os resultados das análises individuais dos procedimentos em que foram aplicados repetidamente às múltiplas análises, cinco em cada nível, da mesma amostra homogênea de maçãs, conduzidas em idênticas condições de teste, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo dia e mesmos reagentes. Como todos os valores do CV% dos ensaios de recuperação obtidos mostraram-se inferiores ao estabelecido na Tabela 2 nas concentrações ensaiadas entre 0,02 à 0,1 mg/Kg que equivaleriam a 10 à 100 µg/Kg com coeficientes de variação aceitáveis até 32%, o método avaliado nos ensaios para validação dos pesticidas βHCH, Clorotalonil, Endosulfam I, Endosulfam II, Sulfato de Endosulfam, Tetradifona, Trifluralina e Vinclozolina mediante ensaios de recuperação intralaboratorial foi considerado preciso na faixa de trabalho ensaiada, entre 0,02 à 0,1 mg/Kg de amostra, com

Tabela 2. Variabilidade por concentração (União Européia¹³)

Concentração	Coeficiente de variação (CV%)
1 µg/ Kg (1 ppb)	45
10 µg/ Kg (10 ppb)	32
100 µg/ Kg (100 ppb)	23
1 mg/ Kg (1 ppm)	16

exceção do pesticida Tetradifona no nível 5 LOQ equivalente à concentração 0,1 mg/Kg, que teve esse ponto excluído da curva de calibração por encontrar-se fora do seu intervalo dinâmico.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo ficaram dentro dos limites recomendados pela literatura para análise de resíduos de pesticidas apresentando uma boa exatidão e precisão para análise de pesticidas organohalogenados em maçãs nas condições experimentais. Este mesmo método poderá ser utilizado no desenvolvimento de novas pesquisas para validação de outros pesticidas de diferentes grupos químicos, levando-se em conta aspectos como custo, tempo, disponibilidade de pessoal e diversos materiais de referência a serem validados.

REFERÊNCIAS

1. ABNT. NBR ISO 9001- **Sistemas de Gestão da Qualidade. Requisitos gerais**, Rio de Janeiro, 2000.
2. ABNT - NBR ISO/IEC 17025- **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**, Rio de Janeiro, 2001.
3. ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. [<http://anvisa.gov.br/toxicologia/index.htm>]. Acesso em 5 fevereiro de 2004.
4. Amarante Jr., O.P. et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, 12(1/2): 116-31, 2001.
5. AOAC / FAO/ IAEA/ IUPAC. **Guidelines for single laboratory validation of analytical methods for trace level concentrations of organic chemicals**. 2002, 8 p.
6. Brito, N. M. et al. Avaliação da Exatidão e Precisão de Métodos de Análise de Resíduos de Pesticidas Mediante Ensaio de Recuperação. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, 12: 155-68, 2002.
7. Causon, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B.**, 689: 175, 1997.
8. Codex Alimentarius Commission/FAO/WHO. **In-House Method Validation**. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committée on methods of analysis and sampling. 23th session. Hungary, 2001.
9. Cowell, J. E.; Kunstman, J. L.; Nord, P. L. Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: an interlaboratory study. **J. Agric. Food Chem.**, 34(6): 955-60, 1986.
10. Feinberg, M.; Raguénés, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Anal. Chim. Acta.**, 391: 239-52, 1999.
11. Gustavo-González, A.; Angeles-Herrador, M.; Asuero, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, 48: 729-36, 1999.
12. Hajslová, J. et al. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticides residues. **J. Chromatogr. A.**, 800: 283-95, 1998.
13. Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyer, K.W., Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 63: 1344-55, 1980.
14. Hubert, P. H. et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Anal. Chim. Acta.**, 391: 135-48, 1999.
15. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of analytical procedures: methodology**. ICH, 1996.
16. Koehler, H. S. **Estatística experimental**. UFPR, Curitiba, 1996 (Apostila).
17. Krull, I.; Swartz, M. Validation viewpoint: quantitation in method validation. **LC-GC.**, 16(12): 1084-90, 1998.
18. Leite, F. **Validação em Análise Química**. Campinas - SP, 4ª edição, 2002.
19. Lee, S. M. et al. Multipesticide residue method for fruits and vegetables. **Fresenius. J. Anal. Chem.**, 339: 376-83, 1991.
20. Luke, M. A.; Froberg, J. E.; Matsumoto, H. T. Extraction and clean-up of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 58(5): 1020-6, 1975.
21. Polesello, S. How to present an analytical method. **Food Chem.**, 58(1/2): 145-7, 1997.
22. Thier, H.P.; Zeumer, H. **Manual of pesticide analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987. p.37-41
23. Thompson, M.; Ellison, L. R. S.; Wood, R. **Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis**. IUPAC, Hungary, 2002.
24. Zoonen, P. van et al. Multi-residue Method. Part 1. In: **Analytical methods for Pesticides Residues in Foodstuffs**, sixth edition, Netherlands, 1996, p. 1-8.