



Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 5 (1): 001-017. Enero-Junio, 2014  
http://www.rvcta.org  
ISSN: 2218-4384 (versión en línea)  
© Asociación RVCTA, 2014. RIF: J-29910863-4. Depósito Legal: ppi201002CA3536.

Artículo

## **Cuantificación de plaguicidas residuales en granos de maíz (*Zea mays* L.) aplicando técnicas de evaluación residual**

Determination of residual pesticides in corn (*Zea mays* L.) kernels using residual evaluation techniques

Dante **Rojas**<sup>1\*</sup>, Valeria **Messina**<sup>2,3</sup>, Ana María **Sancho**<sup>1</sup>, Natalia **Pesquera**<sup>1</sup>, Diego **Cristos**<sup>1</sup>,  
Mariana **Galicio**<sup>4</sup>, Alejandra **Ricca**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Tecnología de Alimentos, Centro de Investigación de Agroindustria, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). B1708WAB, Morón, Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones en Sólidos (CINSO), Instituto de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF) / Unidad de Investigación y Desarrollo Estratégicos para la Defensa (UNIDEF), Ministerio de Defensa (MINDEF) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Juan Bautista de la Salle 4970 (B1603ALO), Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Avenida Rivadavia 1917 (C1033AAJ), Buenos Aires, Argentina.

<sup>4</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA). Avenida Chorroarín 280 (C1427CWO), Buenos Aires, Argentina.

\*Autor para correspondencia: drojas@cnia.inta.gov.ar

Aceptado 18-Abril-2014

### **Resumen**

El empleo de plaguicidas en la producción agrícola ha tomado marcada importancia para muchos sectores de la sociedad. Los productores agropecuarios necesitan realizar un tratamiento fitoterapéutico efectivo y la utilización de estos agroquímicos es una alternativa rentable. Sin embargo, la toxicidad de estas sustancias presenta un riesgo para la salud humana durante su fabricación y

empleo. El objetivo del presente trabajo fue obtener información de los niveles y frecuencia de los principales residuos de pesticidas presentes en granos de maíz aplicando técnicas de evaluación multiresidual. El muestreo (basado en la Norma ISO 950:1979) fue realizado en cintas de embarque y terminales portuarias del Río Paraná y del sur de la Provincia de Buenos Aires (Argentina), dado que manejan más del 80 % de las exportaciones del país (Ingeniero White, Rosario/General San Martín/San Lorenzo, Villa Constitución y Quequén). Sobre un total de 192 muestras, 94 presentaron residuos de plaguicidas, siendo el orden de frecuencia de aparición de los mismos: fenitrotión ( $n = 40$ ) > cipermetrina ( $n = 31$ ) > pirimifós metil ( $n = 27$ ) > deltametrina ( $n = 24$ ) > clorpirifós metil ( $n = 23$ ) > diclorvós ( $n = 18$ ) > permetrina ( $n = 15$ ) > clorpirifós etil ( $n = 12$ ) > fenvalerato ( $n = 3$ ) > malatión ( $n = 2$ ) > endosulfán ( $n = 0$ ; suma de alfa endosulfán, beta endosulfán y endosulfán sulfato). No se hallaron organoclorados. Considerando la legislación Argentina, solo 4 muestras presentaron niveles superiores a los Límites Máximos de Residuos (LMR), siendo cipermetrina el plaguicida involucrado. Sin embargo, según los LMR del Codex Alimentarius, todas las muestras presentaron niveles permitidos.

**Palabras claves:** granos de maíz, evaluación multiresidual, límites residuales, plaguicidas, técnicas residuales.

### Abstract

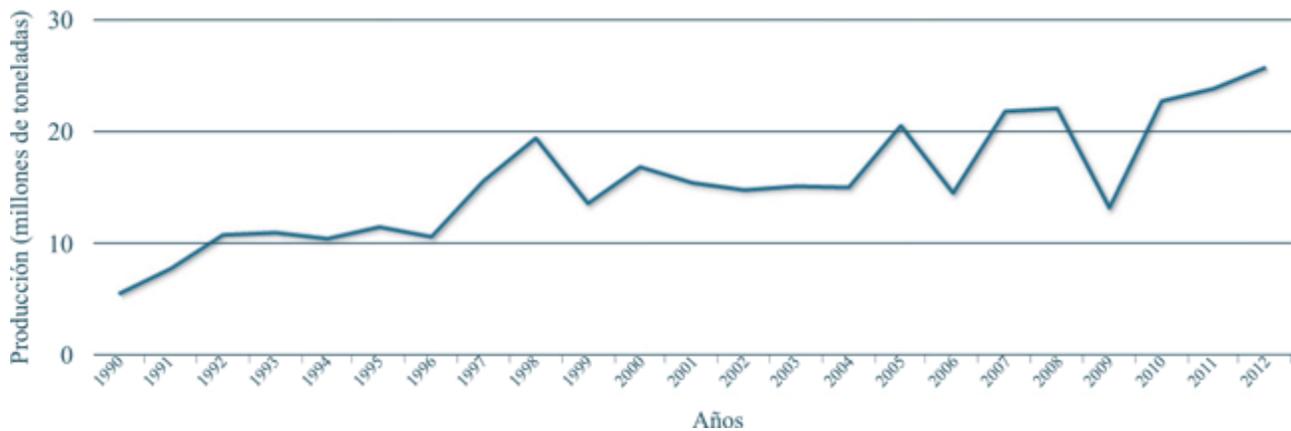
The use of pesticides in agricultural production, has taken strong importance to many sectors of society. Agricultural producers need to make effective phytotherapeutic treatment and the use of these agrochemicals is an economical alternative. However, the toxicity of these substances presents a risk to human health during manufacture and use. The aim of this study was to obtain information on the level and frequency of major pesticide residues present in Argentina in corn kernels applying multiresidual evaluation techniques. Sampling (based on ISO 950:1979 standard) was performed on tape loading and port terminals of the Parana river and south of the Province of Buenos Aires, due that these locations manage over 80 % of the country's exports (Ingeniero White, Rosario/General San Martín/San Lorenzo, Villa Constitución and Quequén). Of a total of 192 samples, 94 samples contained at least one pesticide residue. The frequency of appearance of pesticide were: fenitrothion ( $n = 40$ ) > cypermethrin ( $n = 31$ ) > pirimiphos methyl ( $n = 27$ ) > deltamethrin ( $n = 24$ ) > chlorpyrifos methyl ( $n = 23$ ) > dichlorvos ( $n = 18$ ) > permethrin ( $n = 15$ ) > chlorpyrifos ethyl ( $n = 12$ ) > fenvalerate ( $n = 3$ ) > malathion ( $n = 2$ ) > endosulfan ( $n = 0$ ; sum of alpha endosulfan, beta endosulfan and endosulfan sulphate). Organochlorines were not detected. According to Argentine legislation, only 4 samples had levels above Maximum Residue Levels (MRLs). Cypermethrin presented levels above MRL. Besides, according to Codex Alimentarius, all samples were below the levels allowed.

**Keywords:** corn kernels, multiresidual evaluation, pesticides, residual limits, residual techniques.

### INTRODUCCIÓN

La producción Argentina de maíz (*Zea mays* L.) mostró una tendencia al crecimiento desde las primeras campañas de la década del

90. La producción anual de maíz fue alrededor de 20 millones de toneladas para el 2005 (Fig. 1), para consumo interno solo se destinaron 5 millones de toneladas, el resto fue el saldo exportable (Pouiller, 2005; Ricca, 2006;



**Figura 1.-** Producción de maíz en Argentina. Período 1990-2012.

FAOSTAT, 2013). La producción de maíz de Argentina para 2013/2014 se estima en 25 millones de toneladas (USDA/FAS, 2014).

En el mundo el 14,2 % de los pesticidas son utilizados para la producción de maíz (Racke, 2003). Históricamente, en Estados Unidos el 41 % del área cultivada de maíz ha sido tratada con insecticidas y raramente con fungicidas y las pérdidas de rendimiento ocasionadas por malezas, insectos y patógenos han sido estimadas en 10 %, 12 % y 10 %, respectivamente (Clark *et al.*, 1998).

Los productores agropecuarios necesitan realizar un tratamiento fitoterapéutico efectivo y una alternativa rentable es la utilización de estos agroquímicos. Sin embargo, la toxicidad y el uso incorrecto de estas sustancias presentan un riesgo para la salud humana durante su fabricación y empleo (Coscollá, 1993; Souza-Casadinho y Bocero, 2008; FAO/WHO, 2014).

Los residuos de plaguicidas también pueden afectar a la población en forma indirecta consumiendo alimentos y directamente por la contaminación ambiental. Sin embargo, la capacidad de los individuos para evitar su exposición es limitada. Como consecuencia, las autoridades nacionales redactan legislaciones con el fin de generar conductas que disminuyan el riesgo para la salud y favorezcan la producción cuidando el medio ambiente (FAO,

2006).

Modelos matemáticos han proyectado incrementos en el número de casos de envenenamiento a causa de plaguicidas en el mundo, de 500 mil casos por año en 1972 a 25 millones de casos por año estimados en 1990 (Levine y Doull, 1992; Teixeira *et al.*, 2004).

Según datos oficiales publicados por el Ministerio de Salud de la Nación, en los Centros de Información, Asesoramiento y Asistencia Toxicológica (CIAAT's) en Argentina, en el año 2000 correspondiente al Informe I se registraron 12976 consultas para plaguicidas de uso doméstico y 2185 consultas para plaguicidas de uso agrícola, a su vez, dicho centro informó que las consultas relacionadas a plaguicidas de uso doméstico correspondieron al 12 % (MSAL, 2000). En el año 2002 en el Informe III se registraron 9781 casos probables y confirmados para plaguicidas. A su vez, como plaguicidas de uso veterinario se registraron algunos productos veterinarios, donde aparecieron 589 casos en el Informe II y 765 casos en el Informe III, pero en esos informes no especificaron cuantos productos veterinarios correspondieron a plaguicidas (MSAL, 2001; MSAL, 2002).

Algunos plaguicidas están totalmente prohibidos o restringidos debido a su elevada toxicidad, y otros están autorizados para el

empleo en la producción agropecuaria. No obstante, la presencia de residuos de este último grupo de pesticidas en cultivos y alimentos, tiene fijado un Límite Máximo de Residuo (LMR) (Coscollá, 1993; Krieger *et al.*, 2010; PNUMA, 2010).

El uso extensivo de productos fitosanitarios y su toxicidad, condiciona a los gobiernos a regular su empleo, poniendo en práctica programas de control de residuos con diferentes objetivos como la evaluación toxicológica, la eficacia, la naturaleza y cantidad de residuos derivados de la aplicación de las distintas formulaciones comerciales.

El análisis químico de productos fitosanitarios en matrices alimenticias y medioambientales tiene una posición destacada para llevar a cabo estos controles (Lehotay y Hajšlová, 2002; Racke, 2003).

La validez de los resultados analíticos y las exigencias de los países compradores son consideraciones importantes a tener en cuenta en un laboratorio que realiza análisis de residuos de pesticidas en productos agroalimentarios. Además, una forma de ahorrar tiempo, trabajo y dinero en el laboratorio es utilizar el menor número de métodos para la mayor cantidad de analitos.

El objetivo del presente trabajo fue obtener información de los niveles y frecuencia de los principales residuos de pesticidas presentes en granos de maíz aplicando técnicas de evaluación multiresidual de plaguicidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras

El muestreo, basado en la Norma ISO 950 (ISO, 1979), fue realizado durante 2 periodos de cosecha (2012 y 2013). Se obtuvieron un total de 192 muestras de granos de maíz, 165 muestras fueron obtenidas de las cintas de embarque y 27 de terminales portuarias del Río Paraná y del sur de la Provincia de Buenos Aires (Ingeniero White,

Rosario/General San Martín/San Lorenzo, Villa Constitución y Quequén), dado que manejan más del 80 % de las exportaciones del país.

Previo a su análisis, se realizó en los laboratorios portuarios la molienda de los granos bajo la supervisión de personal proveniente del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), organismo responsable de garantizar y certificar la sanidad y calidad de la producción agropecuaria, pesquera y forestal. Las muestras fueron empaquetadas, selladas, rotuladas y remitidas al laboratorio INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Laboratorio de Plaguicidas) donde fueron almacenadas en refrigeración a  $-18 \pm 1$  °C hasta su análisis.

### Tratamiento de las muestras para su análisis

El método empleado se basó en el procedimiento QuEChERS ('quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe') (Lehotay *et al.*, 2007).

Se colocaron 5 g de granos molidos en un tubo de polipropileno con tapa a rosca de 50 mL. Se agregó 1 mL de hexaclorobenceno (Sigma-Aldrich®), agua desionizada y se agitó. Se agregó ácido acético glacial (Sintorgan®) (1 % en acetonitrilo), acetato de sodio anhidro (Sigma-Aldrich®) y sulfato de magnesio anhidro (Sigma-Aldrich®). Inmediatamente se agitó manualmente durante 1 minuto y se centrifugó a 5000 rpm (Gelec®, modelo G-130D) durante 3 minutos para separar el extracto límpido. Se transfirió el extracto a un tubo de polipropileno con tapa de 2,5 mL con amina primaria-secundaria (PSA) (Sigma-Aldrich®), C18 y sulfato de magnesio anhidro. Inmediatamente se agitó manualmente durante 5 minutos y se centrifugó a 5000 rpm para obtener un sobrenadante. Luego se colocó 500 µL del sobrenadante en viales de vidrio y se añadió solución de trifenílfosfato (Sigma-Aldrich®).

La optimización de la técnica analítica se realizó con muestras blanco. Las mismas no presentaron tratamiento con los plaguicidas investigados.

### Preparación de patrones para evaluar pesticidas en las muestras

Disoluciones y diluciones se realizaron corrigiendo los volúmenes de forma gravimétrica, a fin de disminuir la incertidumbre del método (Ávila *et al.*, 2004; Štěpán *et al.*, 2004; Herrera de Pablo *et al.*, 2007; Pihlström *et al.*, 2009). Se utilizó material volumétrico de vidrio calibrado con certificado de trazabilidad al Sistema Internacional de Unidades.

Se prepararon soluciones patrones (10 mg/mL tolueno) de clorpirifós metil, clorpirifós etil, pirimifós metil, fenitrotión, malatión, alfa endosulfán, beta endosulfán, endosulfán sulfato, permetrina, cipermetrina, fenvalerato, esfenvalerato, deltametrina (Sigma-Aldrich®), diclorvós (AccuStandard®) y soluciones patrones (2 mg/mL tolueno) para hexaclorobenceno (HCB) y trifenilfosfato (TPP) (Sigma-Aldrich®). A su vez se utilizaron soluciones mezclas de pesticidas de diferentes concentraciones para determinar los parámetros analíticos del método (exactitud, precisión, sensibilidad, entre otros). Se utilizaron HCB y TPP como estándares internos (Lehotay, 2006).

### Curva de calibración

La respuesta de los analitos se comprobó trabajando con extractos de muestras blanco contaminadas a distintos niveles de concentración: 0,005 mg/kg; 0,01 mg/kg; 0,02 mg/kg; 0,03 mg/kg; 0,05 mg/kg; 0,1 mg/kg; 0,2 mg/kg; 0,3 mg/kg; 0,6 mg/kg y una muestra blanco. Se realizó el ensayo por triplicado, con al menos 2 inyecciones para cada nivel. La muestra blanco fue incluida para investigar la aparición de sustancias co-extraídas del maíz que produzcan interferencias o actúen como

contaminación.

Para su análisis se aplicó Análisis de Regresión y se calculó el coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) (Ec. 1).

$$\text{Ecuación (1)} \quad r = \frac{\sum (c - \bar{c})(s - \bar{s})}{\sqrt{\sum (c - \bar{c})^2 \sum (s - \bar{s})^2}}$$

Donde:

$c$  : es la concentración

$s$  : es la señal correspondiente a  $c$

$\bar{c}$  : es el promedio de  $c$

$\bar{s}$  : es el promedio de  $s$  (Di Rienzo *et al.*, 2008)

El criterio de aceptación utilizado fue  $R \geq 0,98$  (Herrmann y Poulsen, 2007; 2008; 2009).

### Ensayos de recuperación

Se contaminaron muestras blanco artificialmente a distintos niveles: 0,01 mg/kg; 0,02 mg/kg; 0,03 mg/kg; 0,04 mg/kg; 0,07 mg/kg; 0,15 mg/kg; 0,35 mg/kg y 0,60 mg/kg. Una muestra blanco sin contaminación fue incluida como “cero”. Se realizó el ensayo por triplicado, con al menos 2 inyecciones para cada nivel.

Exactitud: fue evaluada a través del cálculo de Recuperación porcentual ( $R$  %). La  $R$  % se calculó según Ec. 2.

$$\text{Ecuación (2)} \quad R \% = \frac{(CF - CU)}{CN} \times 100$$

Donde:

CF : es la concentración de analito medido en la muestra fortificada

CU : es la concentración de analito medido en la muestra sin fortificar

CN : es la concentración de analito agregado (valor nominal o teórico) en la muestra fortificada

El criterio de aceptación fue  $70 \leq R \% \leq 120$  % para cada analito en todos los niveles (Pihlström *et al.*, 2009).

**Precisión:** fue evaluada como reproducibilidad. Se determinó para todos los analitos en cada uno de los niveles y fue expresada como Desviación Estándar Relativa porcentual ('Relative Standard Deviation', *RSD* %) del ensayo de recuperación. La reproducibilidad para cada nivel de concentración, se calculó en base a todos los valores de concentración obtenidos (Ec. 3).

$$\text{Ecuación (3)} \quad RSD \% = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

Donde:

*SD* : es la desviación estándar de las determinaciones

$\bar{X}$  : es el promedio de la concentración calculada de cada nivel.

El criterio de aceptación utilizado fue el valor de *RSD* % observado para cada nivel investigado  $\leq RSD$  % calculado según la ecuación de Horwitz (Horwitz, 1982; Herrmann y Poulsen, 2007; 2008; 2009) (Ec. 4).

$$\text{Ecuación (4)} \quad RSD \% = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

Donde:

*C* : es la concentración expresada como una fracción de masa

**Sensibilidad:** Límite de Detección (LD): fue expresado como 3 veces la Desviación Estándar ('Standard Deviation', *SD*) de la recuperación del menor nivel que cumple con los criterios de aceptación de precisión y exactitud. Límite de Cuantificación (LC): fue expresado como 6 veces el *SD* de la recuperación del menor nivel que cumple con los criterios de aceptación de precisión y exactitud.

**Incertidumbre del método:** La estimación de la Incertidumbre del método se realizó con los datos obtenidos del ensayo de recuperación, según:

$$\text{Ecuación (5)} \quad RSD = \frac{SD_{R\%}}{R \%_{media}}$$

$$\text{Ecuación (6)} \quad U = RSD \cdot k \cdot C$$

Donde:

*RSD* : es la desviación estándar relativa

*SD<sub>R</sub> %* : es la desviación estándar de recuperación

*R %<sub>media</sub>* : es la recuperación promedio

*C* : es la concentración

*k* : es un factor de cobertura

*U* : es la incertidumbre expandida del método.

El valor de *k* es 2 para un nivel de confianza de 95 %.

### **Detección y cuantificación de pesticidas**

Se utilizó un cromatógrafo de gases marca PerkinElmer, modelo Clarus 600 (PerkinElmer, Inc., Shelton, Connecticut, USA) con muestreador automático, puerto de inyección con vaporizador de temperatura programable (PTV, 'programmed temperature vaporization'), control programable del sistema neumático, usados para inyección de grandes volúmenes (LVI, 'large volume injection'). Guarda columna de sílice fundida de 5 m x 0,25 mm (Supelco), columna capilar marca Varian, modelo Factor Four VF-5ms, de 30 m x 0,25 mm (0,25 μm) de fase estacionaria 95 % dimetil-5 % difenil polisiloxano de bajo sangrado. El gas portador ('carrier') fue helio con grado de pureza 99,999 %. Acoplado a un espectrómetro de masas PerkinElmer, modelo Clarus 600 (PerkinElmer, Inc.). Se utilizó una fuente de ionización por impacto electrónico a 290 °C. El mismo constó de un analizador

cuadrupolar, con un prefiltro también cuadrupolar con detector dínodo de conversión, una placa de fósforo y un tubo fotomultiplicador.

Se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de muestras y el programa de temperatura del horno fue: 70 °C (6 min); a 25 °C/min hasta 170 °C; a 5 °C/min hasta 230 °C; a 20 °C/min hasta 290 °C (10 min).

Los datos cromatográficos se obtuvieron monitoreando iones específicos (SIM, 'selected ion monitoring') usando un ión de cuantificación y al menos 2 iones calificadores, para cada analito. Para la selección de los iones se escogieron candidatos consultando la Base de Datos de Laboratorios de Referencia de la Unión Europea para Residuos de Plaguicidas ('DataPool of the EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides'). Los parámetros finales fueron determinados por inyección de soluciones patrones de los analitos en las mismas condiciones en que se analizaron las muestras (Albero *et al.*, 2005).

Los residuos de plaguicidas se identificaron de acuerdo a 2 parámetros: tiempo de retención relativo al HCB y relación de abundancias relativas de iones.

Se analizaron los siguientes plaguicidas: diclorovós, clorpirifós metil, clorpirifós etil, pirimifós metil, fenitrotión, malatión, alfa endosulfán, beta endosulfán, endosulfán sulfato, permetrina, cipermetrina, fenvalerato, esfenvalerato y deltametrina.

### **Criterio de calidad de las muestras**

Las muestras se analizaron por duplicado y el desempeño analítico (GC-MS) se trabajó con doble estándar interno TPP y HCB en cada muestra. El criterio de aceptación fue que la relación TPP/HCB (área de picos) se mantuviera en todas las muestras ( $RSD < 10\%$ ) (Lehotay, 2006).

En cada tanda de 10 análisis se incluyó un control de calidad (muestra blanco contaminada) y un blanco de reactivos. Los

criterios utilizados fueron: a) Recuperación porcentual ( $70 \leq R \% \leq 120$ ) para todos los plaguicidas investigados; b) ausencia de interferentes y contaminaciones en el blanco de reactivos (Hill *et al.*, 1999; Lehotay, 2006; Pihlström *et al.*, 2009).

### **Identificación de analitos**

Para cada analito se determinó el tiempo de retención relativo al HCB y la relación de abundancias relativas entre el ión cuantificador y al menos 2 iones calificadores. Siendo los tiempos de retención relativos al HCB con una tolerancia de  $\pm 0,5\%$  (Pihlström *et al.*, 2009). Las curvas de calibración fueron construidas teniendo en cuenta el efecto matriz. El endosulfán se expresó como la suma de alfa endosulfán, beta endosulfán y endosulfán sulfato. Permetrina, cipermetrina, fenvalerato y deltametrina representa cada uno la suma de sus isómeros (SAGPyA, 2008; Pihlström *et al.*, 2009).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Curvas de calibración**

Los coeficientes de correlación estudiados presentaron valores  $R \geq 0,992$ . Herrmann y Poulsen (2007; 2008; 2009) presentaron coeficientes para validación (GC-ITD y GC-MS/MS) con valores de  $R \geq 0,98$  para sus curvas de calibración trabajando con la metodología QuEChERS en harinas de cereales (avena, arroz, centeno y trigo).

### **Ensayos de recuperación del método**

El ensayo de recuperación fue utilizado para evaluar la precisión, exactitud, estimar la incertidumbre y calcular el límite de cuantificación del método.

Exactitud: la exactitud del método fue evaluada para cada analito en los diferentes niveles de concentración calculando la

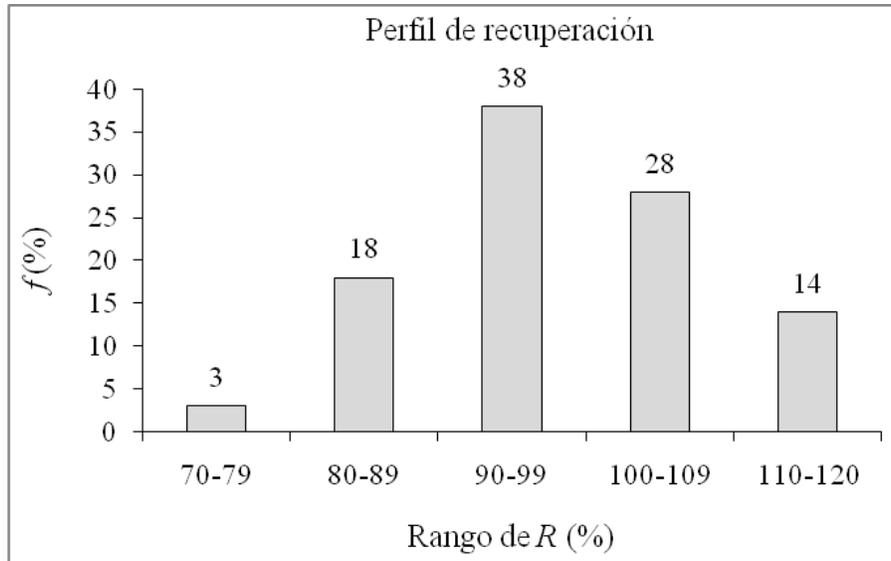
Recuperación porcentual ( $R$  %) obtenida durante el ensayo.

La Fig. 2 muestra la frecuencia relativa porcentual ( $f$  %) para distintos rangos de  $R$  %. Se observó que  $\approx$  el 65 % de las recuperaciones se hallaron entre 90 - 109 %, 21 % para  $R$  %

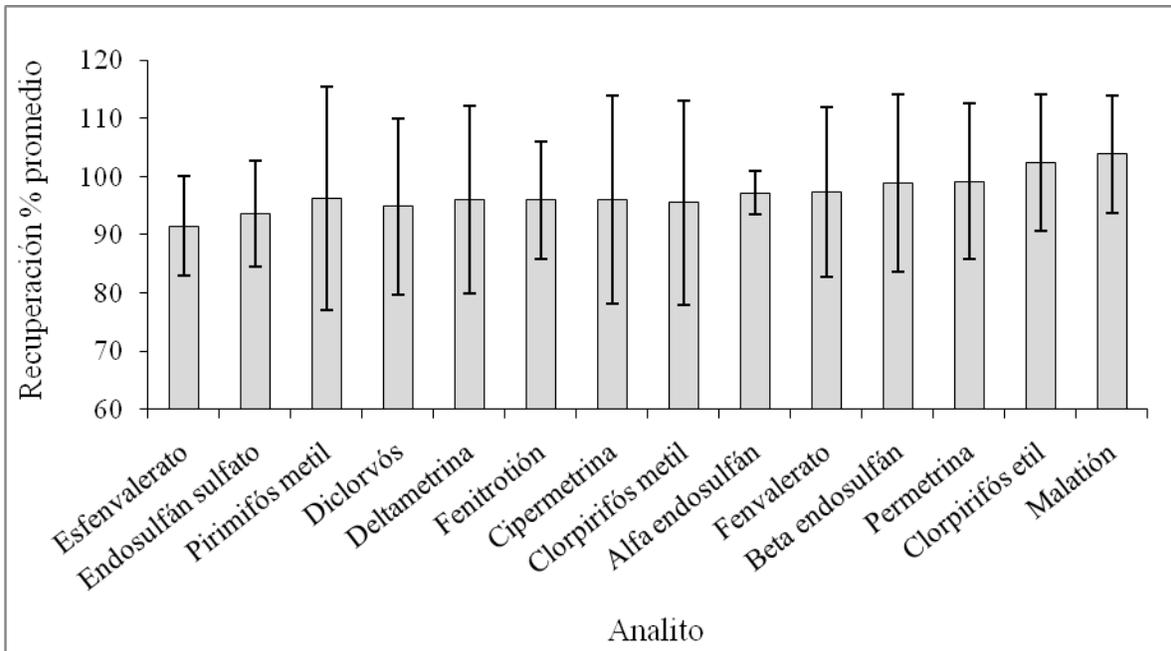
$< 90$  % y solo 14 % para  $R$  %  $> 110$ .

En la Fig. 3 se pueden observar los  $R$  % promedio de cada analito, donde esfenvalerato presentó la menor  $R$  % media (91,5 %) y malatión la mayor  $R$  % media (103,9 %).

En el Documento No. SANCO



**Figura 2.-** Recuperación porcentual ( $R$  %) en función de la frecuencia relativa porcentual ( $f$  %).



**Figura 3.-** Recuperación porcentual ( $R$  %) promedio agrupadas por analito.

10684/2009 se recomienda un intervalo de aceptación de 70 - 120 %. Aunque, sugiere considerar recuperaciones menores, en forma excepcional, cuando se demuestre una buena precisión y se conozca la causa de la baja recuperación.

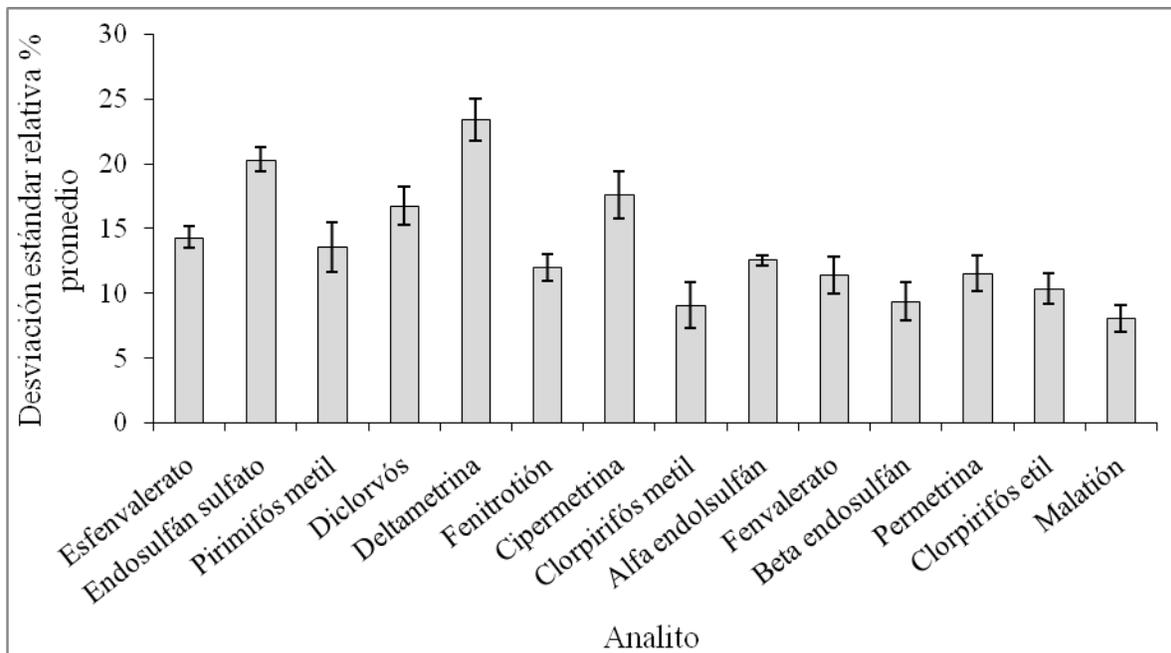
Lehotay *et al.* (2007) han señalado que en residuos de plaguicidas, cuando se aplica el método QuEChERS, el criterio de aceptación para la recuperación porcentual debería estar entre 70 - 120 %. La recuperación porcentual en cada nivel de fortificación para el presente ensayo fue de 70 - 120 %. La exactitud aceptable se logró optimizando el tiempo de retención, la relación masa/carga de los iones y la abundancia de los mismos (SENASA, 2002; FAO/OMS, 2005; Pihlström *et al.*, 2009).

**Precisión:** La precisión de la metodología fue evaluada como reproducibilidad para cada analito en los diferentes niveles de concentración estudiados durante el ensayo de recuperación. La reproducibilidad se calculó como *RSD* % (Fig. 4). Los mayores valores de *RSD* % promedio correspondieron a deltametrina (23,4 %),

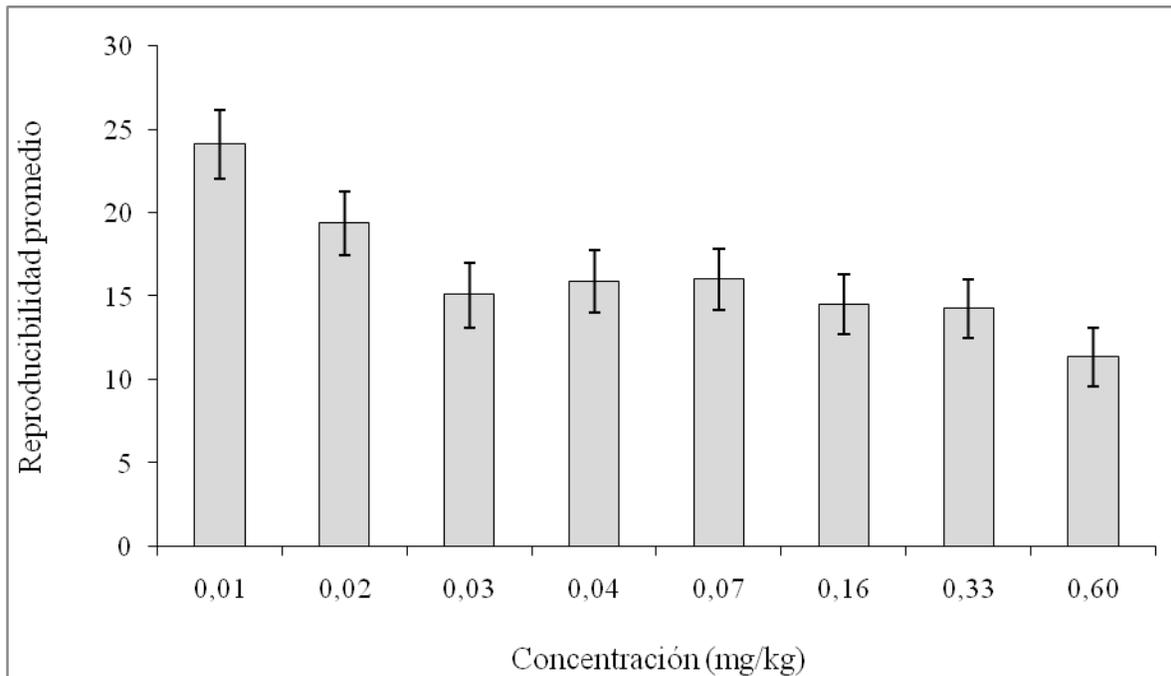
endosulfàn sulfato (20,3 %), cipermetrina (17,6 %), diclorvós (16,7 %).

En la Fig. 5 se puede observar la *RSD* % en función de los niveles de concentración estudiados. Las variaciones de *RSD* % en función de los niveles de concentración estudiados mostraron que los niveles de concentración más bajos (0,01 - 0,02 mg/kg) presentaron valores de *RSD* % promedio más altos (24 % y 19 %, respectivamente) y el nivel más alto (0,60 mg/kg) mostró el menor *RSD* % promedio (11 %), lo cual es esperable al analizar la ecuación de Horwitz (Alder *et al.*, 2001).

El Documento SANCO No. 10684/2009 recomienda un *RSD* % de reproducibilidad  $\leq 20$  %. Sin embargo, laboratorios oficiales de la Unión Europea publican resultados de validación de metodología QuEChERS, aceptando valores de *RSD* % menores o iguales a los obtenidos de la Ec. Horwitz (Herrmann *et al.*, 2007; 2008; 2009). El criterio de aceptación establecido en el presente trabajo fue el valor de *RSD* % observado para cada nivel investigado  $\leq$  *RSD* % calculado según la ecuación de Horwitz.



**Figura 4.-** Desviación estándar relativa porcentual (*RSD* %) promedio para cada analito estudiado.



**Figura 5.-** Reproducibilidad (*RSD* %) promedio en función de las distintos niveles de concentración.

Como conclusión se pudo comprobar que con la metodología propuesta se logró precisión aceptable para diclorvós, clorpirifós metil, pirimifós metil, fenitrotión, malatión, clorpirifós etil, cipermetrina, fenvalerato y esfenvalerato en el intervalo de 0,01 a 0,60 mg/kg; para permetrina y deltametrina entre 0,02 a 0,60 mg/kg, para alfa endosulfán entre 0,03 a 0,60 mg/kg, beta endosulfán entre 0,04 a 0,60 mg/kg y para endosulfán sulfato entre 0,07 a 0,60 mg/kg.

**Sensibilidad:** Para evaluar la sensibilidad del método se calcularon los Límites de Detección (LD) y Límites de Cuantificación (LC) del método para cada residuo investigado. Con el fin de determinar los LD y LC se calculó el desvío estándar del menor nivel de concentración que cumplió con los criterios de aceptación establecidos para precisión y exactitud. Los valores de LD y LC se establecieron como múltiplos del desvío estándar (Cuadro 1).

Los analitos presentaron LC entre 0,008 mg/kg (fenitrotión y malatión) y 0,084 mg/kg

(endosulfán sulfato). Los mayores LC correspondieron a beta endosulfán, alfa endosulfán y endosulfán sulfato; 0,041 mg/kg; 0,045 mg/kg y 0,084 mg/kg, respectivamente. El elevado LC de estos 3 analitos pudo deberse a que durante la ionización generan gran cantidad de iones con mucha abundancia y solo una fracción de este analito inyectado origina el ión de cuantificación, dando LC y variabilidad elevados (Štěpán *et al.*, 2004).

Los LC obtenidos en el presente trabajo fueron menores que los Límites Máximos de Residuos (LMR) de la legislación de Argentina (SAGPyA, 2008) y los recomendados por el Codex Alimentarius (FAO/OMS, 2013). Solo los LC de diclorvós y endosulfán sulfato se encontraron por encima de los LMR establecidos por la Unión Europea (PE/CUE, 2005; DG SANCO, 2014). El método aplicado proporcionó una adecuada sensibilidad para la legislación nacional, recomendaciones del Codex y la Unión Europea (excepto para diclorvós y endosulfán sulfato) (Cuadro 2).

**Cuadro 1.-** Límite de Detección (LD), Límite de Cuantificación (LC) e Incertidumbre expandida (*U*) del método.

Compuesto	LD (mg/kg)	LC (mg/kg)	<i>U</i> (%)
Diclorvós	0,007	0,014	34
Clorpirifós metil	0,005	0,010	26
Clorpirifós etil	0,006	0,013	21
Pirimifós metil	0,005	0,010	26
Fenitrotión	0,004	0,008	27
Malatión	0,004	0,008	23
Alfa endosulfán	0,022	0,045	26
Beta endosulfán	0,021	0,041	28
Endosulfán sulfato	0,042	0,084	22
Permetrina	0,009	0,019	27
Cipermetrina	0,007	0,013	24

**Cuadro 2.-** Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos en diversas normativas, relacionados con maíz (grano consumo) o cereales en grano.

Compuesto	LMR-Unión Europea* (mg/kg)	LMR-Codex Alimentarius** (mg/kg)	LMR-Argentina*** (mg/kg)
Diclorvós	0,01	5	5
Clorpirifós metil	3	-	5
Clorpirifós etil	-	-	0,05
Pirimifós metil	5	7	10
Fenitrotión	0,05	6	10
Malatión	8	0,05	8
Alfa endosulfán	0,05	-	0,2
Beta endosulfán	0,05	-	0,2
Endosulfán sulfato	0,05	-	0,2
Permetrina	0,05	2	2
Cipermetrina	0,3	0,3	0,1
Fenvalerato	0,02	2	0,1
Esfenvalerato	0,02	-	0,1
Deltametrina	2	2	1

\* Reglamento (CE) N° 396/2005 (PE/CUE, 2005; DG SANCO, 2014).

\*\* Base de Datos en línea del Codex sobre los residuos de plaguicidas en los alimentos (FAO/OMS, 2013).

\*\*\* Resolución 507/2008 (SAGPyA, 2008).

**Incertidumbre:** Los valores estimados para la incertidumbre expandida ( $U$ ) del método estuvieron entre 21 % y 34 % (Cuadro 1) y el valor más alto correspondió a diclorvós.

Existen numerosos trabajos que presentan distintas formas de estimar la incertidumbre expandida de un método obteniendo resultados que van desde < 10 % hasta 50 % y luego asumen una incertidumbre expandida para el método de 50 % por recomendación del Documento No. SANCO 10684/2009 (Štajnbaher y Zupančič-Kralj, 2003; Kmellár *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2009; Economou *et al.*, 2009; Walorczyk y Gnusowski, 2009; Chung y Chan, 2010).

Se comprobó que todos los valores estimados de incertidumbre de medición fueron aceptables para su empleo en el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos según las recomendaciones del Documento No. SANCO 10684/2009 (Pihlström *et al.*, 2009).

### Detección y cuantificación de pesticidas

En aproximadamente el 52 % de las muestras procedentes de cintas de embarque se encontraron residuos de plaguicidas mientras

que para las terminales portuarias cerca del 33 % de las muestras analizadas presentaron al menos 1 residuo de pesticida.

En el Cuadro 3 se puede observar los diferentes agentes fitosanitarios y su posible relación con las zonas. No se detectaron residuos de plaguicidas en 98 muestras ( $n = 192$ ) siendo 80 muestras en cintas de embarque y 18 en terminales portuarias. En las muestras en las cuales se detectaron ( $n = 94$ ), 85 correspondieron a cintas de embarque y 9 a terminales portuarias. Los residuos de plaguicidas más frecuentemente detectados fueron fenitrotión ( $n = 40$ ) seguido por cipermetrina ( $n = 31$ ). También se destacaron la escasa aparición de fenvalerato ( $n = 3$ ), malatión ( $n = 2$ ) y la ausencia de endosulfán ( $n = 0$ , asumido como la suma de alfa endosulfán, beta endosulfán y endosulfán sulfato). Para todos los analitos el resultado más frecuente fue: no detectado. Los organofosforados aparecieron en 122 determinaciones, los piretroides en 73 y no se detectaron organoclorados.

Analizando solo los casos detectados en cintas de embarque, nuevamente fenitrotión ( $n = 38$ ) fue el más frecuente, seguido por

**Cuadro 3.-** Distribución de muestras detectadas y no detectadas (ND), según número de residuos de plaguicidas hallados.

Nº residuos detectados	Número de muestras totales	Cintas de embarque	Terminales portuarias
ND	98	80	18
1	44	40	4
2	23	22	1
3	12	11	1
4	8	7	1
5	5	4	1
6	2	1	1
Total	192	165	27

pirimifós metil ( $n = 26$ ), cipermetrina ( $n = 24$ ) y clorpirifós metil ( $n = 23$ ).

Para muestras de cintas de embarque, fenitrotión presentó el promedio más alto (0,21 mg/kg) seguido por diclorvós (0,11 mg/kg) y permetrina (0,11 mg/kg). El mayor valor también lo presentó fenitrotión (1,4 mg/kg), luego permetrina (0,46 mg/kg) y pirimifós metil (0,37 mg/kg).

En el Cuadro 4 se observan los casos en los cuales los LMR se excedieron. De acuerdo a los LMR establecidos por la Unión Europea (PE/CUE, 2005; DG SANCO, 2014) los residuos de plaguicidas que presentaron valores superiores fueron diclorvós ( $n = 14$ ), fenitrotión

( $n = 13$ ), permetrina ( $n = 5$ ), clorpirifós etil ( $n = 1$ ), cipermetrina ( $n = 1$ ) y fenvalerato ( $n = 1$ ).

Por ende, el orden de frecuencia de aparición de los plaguicidas fue: fenitrotión ( $n = 40$ ) > cipermetrina ( $n = 31$ ) > pirimifós metil ( $n = 27$ ) > deltametrina ( $n = 24$ ) > clorpirifós metil ( $n = 23$ ) > diclorvós ( $n = 18$ ) > permetrina ( $n = 15$ ) > clorpirifós etil ( $n = 12$ ) > fenvalerato ( $n = 3$ ) > malatión ( $n = 2$ ) > endosulfán ( $n = 0$ ; suma de alfa endosulfán, beta endosulfán y endosulfán sulfato).

Los LMR recomendados por el Codex Alimentarius no fueron superados en ningún caso. Tomando la legislación Argentina, solo cipermetrina ( $n = 4$ ) presentó valores mayores al LMR.

**Cuadro 4.-** Número de determinaciones superiores a los Límites Máximos de Residuos (LMR) analizados.

Compuesto	> LMR-Unión Europea*	> LMR-Codex Alimentarius**	> LMR-Argentina***
Diclorvós	14	0	0
Fenitrotión	13	0	0
Clorpirifós etil	1	0	0
Permetrina	5	0	0
Cipermetrina	1	0	4
Fenvalerato	1	0	0

\* Reglamento (CE) N° 396/2005 (PE/CUE, 2005; DG SANCO, 2014).

\*\* Base de Datos en línea del Codex sobre los residuos de plaguicidas en los alimentos (FAO/OMS, 2013).

\*\*\* Resolución 507/2008 (SAGPyA, 2008).

## CONCLUSIONES

El método utilizado proporcionó una adecuada selectividad, linealidad, precisión, exactitud y la estimación de la incertidumbre fue realizada para los residuos de pesticidas estudiados. La metodología es sencilla y de bajo costo (pequeños volúmenes de solvente y rápida), adecuada para organismos de control y

evaluación rutinaria del cumplimiento de legislación nacional y del Codex Alimentarius.

Sobre un total de 192 muestras de granos maíz, 94 presentaron residuos de plaguicidas, siendo 85 muestras pertenecientes a las cintas de embarque y el resto a terminales portuarias. A su vez se observó que el orden de frecuencia de aparición de los plaguicidas fue: fenitrotión ( $n = 40$ ) > cipermetrina ( $n = 31$ ) >

pirimifós metil ( $n = 27$ ) > deltametrina ( $n = 24$ ) > clorpirifós metil ( $n = 23$ ) > diclorvós ( $n = 18$ ) > permetrina ( $n = 15$ ) > clorpirifós etil ( $n = 12$ ) > fenvalerato ( $n = 3$ ) > malatión ( $n = 2$ ) > endosulfán ( $n = 0$ ; suma de alfa endosulfán, beta endosulfán y endosulfán sulfato).

Considerando la legislación de Argentina, solo 4 muestras presentaron niveles superiores al LMR, siendo cipermetrina el plaguicida involucrado. Sin embargo, todas las muestras presentaron niveles permitidos según los LMR del Codex Alimentarius.

## RECOMENDACIÓN

Es de suma importancia que se controle en las cintas de embarque y terminales portuarias los niveles residuales de pesticidas, dado que pueden ocasionar daños a la salud humana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albero, Beatriz; Sánchez-Brunete, Consuelo and Tadeo, José L. 2005. Multiresidue determination of pesticides in juice by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. 66(4):917-924.
- Ávila, Akie K.; Araujo, Thiago O.; Couto, Paulo R.G. e Borges, Renata M.H. 2004. Comparação da estimativa de incerteza de medição na determinação de cobre por espectrometria de absorção atômica com chama por diluição gravimétrica e volumétrica. Banco de Artigos Técnicos. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Brasil. 8 p.
- Banerjee, Kaushik; Oulkar, Dasharath P.; Patil, Shubhangi B.; Jadhav, Manjusha R.; Dasgupta, Soma; Patil, Sangram H.; Bal, Sunita and Adsule, Pandurang G. 2009. Multiresidue determination and uncertainty analysis of 87 pesticides in mango by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(10):4068-4078.
- Chung, Stephen W.C. and Chan, Benny T.P. 2010. Validation and use of a fast sample preparation method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in analysis of ultra-trace levels of 98 organophosphorus pesticide and carbamate residues in a total diet study involving diversified food types. *Journal of Chromatography A*. 1217(29):4815-4824.
- Clark, M.S.; Ferris, H.; Klonsky, K.; Lanini, W.T.; van Bruggen, A.H.C. and Zalom, F.G. 1998. Agronomic, economic, and environmental comparison of pest management in conventional and alternative tomato and corn systems in northern California. *Agriculture, Ecosystems & Environment*. 68:51-71.
- Coscollá, R. 1993. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- DG SANCO. 2014. Directorate General for Health & Consumers (Dirección General de Sanidad y Consumidores). EU pesticides database. Pesticides EU MRLs. Regulation (EC) No 396/2005. [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/?event=homepage](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=homepage)
- Di Rienzo, Julio Alejandro; Casanoves, Fernando; González, Laura Alicia; Tablada, Elena Margot; Díaz, María del Pilar; Robledo, Carlos Walter y Balzarini, Mónica Graciela. 2008. Estadística para las ciencias agropecuarias. (7ma. ed.). Córdoba, Argentina: Editorial Brujas.
- Economou, Anastasios; Botitsi, Helen; Antoniou, Spyros and Tsipi, Despina. 2009. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216(31):5856-5867.
- FAO. 2006. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la

- Alimentación. Código internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Roma, Italia.
- FAO/OMS. 2005. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Directrices para el uso de la Espectrometría de Masas (EM) en la identificación, confirmación y determinación cuantitativa de residuos. CAC/GL 56 - 2005.
- FAO/OMS. 2013. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos. Base de Datos en línea del Codex sobre los residuos de plaguicidas en los alimentos. <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/index.html?lang=es>
- FAO/WHO. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Pesticide residues in food 2013. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Report 2013. FAO Plant Production and Protection Paper, N° 219. Rome. 625 p. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Report13/JMPR\\_2013\\_Report.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report13/JMPR_2013_Report.pdf)
- FAOSTAT. 2013. Base de Datos. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>
- Herrera de Pablo, J.C.I.; Abellanas-Oar, B.; López-Perez, R.; Vergara-García, N.; Escobar-García, M.A. y Pascual-López, G. 2007. Evaluación de la incertidumbre de medida en el análisis de residuos de plaguicidas. En Comunicaciones (requisitos técnicos) del IV Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. 02 Mayo-30 Junio. <http://www.iberolab.org/opencms/opencms/congreso/IberolabIV2007/Comunicaciones/comunicaciones1.html>
- Herrmann, Susan Strange and Poulsen, Mette Erecius. 2007. Method validation report: Determination of pesticides in cereals using the QuEChERS method and GC-ITD. CRL for Cereals and Feeding stuff-National Food Institute-Technical University of Denmark.
- Herrmann, Susan Strange and Poulsen, Mette Erecius. 2008. Validation report 3. Determination of pesticide residues in cereals by GC-MS/MS (QuEChERS method). CRL for Cereals and Feeding stuff-National Food Institute-Technical University of Denmark.
- Herrmann, Susan Strange and Poulsen, Mette Erecius. 2009. Validation report 5. Determination of pesticide residues in cereals by GC-MS/MS (QuEChERS method). CRL for Cereals and Feeding stuff-National Food Institute-Technical University of Denmark.
- Hill, A.R. and Reynolds, S.L. 1999. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. *Analyst*. 124(6):953-958.
- Horwitz, William. 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Analytical Chemistry*. 54(1):67A-76A.
- ISO. 1979. International Organization for Standardization. Cereal - Sampling (as grain). ISO 950:1979.
- Kmellár, B.; Fodor, P.; Pareja, L.; Ferrer, C.; Martínez-Uroz, M.A.; Valverde, A. and Fernandez-Alba, A.R. 2008. Validation and uncertainty study of a comprehensive list of 160 pesticide residues in multi-class vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1215(1-2):37-50.
- Krieger, Robert; Doull, John; Hodgson, Ernest; Maibach, Howard; Reiter, Lawrence; Ritter, Leonard; Ross, John, Slikker, William and Vega, Helen. 2010. Hayes' handbook of pesticide toxicology. Volume 1. (3rd. ed.). San Diego, CA, USA: Academic Press/Elsevier.

- Lehotay, Steven J. 2006. Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe approach for determining pesticide residues. In Pesticide protocols. (pp. 239-261). Methods in biotechnology. Vol. 19. Totowa, NJ, USA: Humana Press Inc.
- Lehotay, Steven J. and Hajšlová, Jana. 2002. Application of gas chromatography in food analysis. Trends in Analytical Chemistry. 21(9-10):686-697.
- Lehotay, Steven J.; O'Neil, Mary; Tully, Jose; Valverde-Garca, Antonio; Contreras, Mariano; Mol, Hans; Heinke, Volkmar; Anspach, Thomas *et al.* 2007. Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: collaborative study. Journal of AOAC International. 90(2):485-520. AOAC Official Method 2007.01.
- Levine, Robert S. and Doull, John. 1992. Global estimates of acute pesticide morbidity and mortality. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. 129:29-50.
- MSAL. 2000. Ministerio de Salud de la Nación. Primer informe estadístico de consultas registradas por los CIAATs (Centros de Información, Asesoramiento y Asistencia Toxicológica) de la República Argentina - Año 2000. <http://www.msal.gov.ar/redartox/estadistica/estadistico2000.pdf>
- MSAL. 2001. Ministerio de Salud de la Nación. II informe estadístico de consultas por exposición a tóxicos registradas por los CIAATs (Centros de Información, Asesoramiento y Asistencia Toxicológica) de la República Argentina - Año 2001. <http://www.msal.gov.ar/redartox/documentos/IIINFESTAD2001.pdf>
- MSAL. 2002. Ministerio de Salud y Ambiente de la Nación. III informe estadístico de exposiciones a tóxicos registradas por los CIAAT's (Centros de Información, Asesoramiento y Asistencia Toxicológica) de la República Argentina - Año 2002. <http://www.msal.gov.ar/redartox/documentos/Reporte2002.pdf>
- PE/CUE. 2005. Parlamento Europeo/Consejo de la Unión Europea. Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo (texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial de la Unión Europea. 48(L 70):1-16.
- Pihlström, Tuija; Anastassiades, Michelangelo; Andersson, Arne; de Kok, André; Poulsen, Mette Erecius; Fernández-Alba, Amadeo R.; Gamón, Miguel; Lippold, Ralf *et al.* 2009. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. SANCO/10684/2009. [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf)
- PNUMA. 2010. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP), enmendado en 2009. Texto y anexos. Châtelaine, Suiza: Secretaría del Convenio de Estocolmo. <http://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-COP-CONVTEXT.Sp.pdf>
- Pouiller, C.A. 2005. Perfil descriptivo de la cadena del maíz. Dirección de Mercados Agroalimentarios-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA), Argentina.
- Racke, K.D. 2003. Release of pesticides into the environment and initial concentrations in soil, water, and plants. Pure and Applied Chemistry. 75(11-12):1905-1916.
- Ricca, A.P. 2006. Aprovechamiento de granos contaminados con fumonisina B1 para la obtención de etanol y análisis del posterior uso de las vinazas sólidas como complemento en el alimento balanceado.

- Tesis Doctoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina.
- SAGPyA. 2008. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Productos y subproductos agropecuarios. Resolución 507/2008. Sustitúyase el Anexo I y Anexo II de la Resolución N° 256/03, relacionada a tolerancias o límites máximos de residuos de plaguicidas en productos y subproductos agropecuarios. Listado de productos fitosanitarios químicos y biológicos.
- SENASA. 2002. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Control de productos de origen animal. Requisitos que deberán cumplir los laboratorios que soliciten autorización para ingresar en la Red de Laboratorios del SENASA. Manuales de Calidad y de Procedimientos. Resolución 138/2002. Buenos Aires, Argentina.
- Souza-Casadinho, Osvaldo Javier y Bocero, Silvia Liliana. 2008. Agrotóxicos: condiciones de utilización en la horticultura de la Provincia de Buenos Aires (Argentina). *Revista Iberoamericana de Economía Ecológica*. 9:87-101.
- Štajnbaher, Darinka and Zupančič-Kralj, Lucija. 2003. Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1015(1-2):185-198.
- Štěpán, Radim, Hajšlová, Jana, Kocourek, Vladimír and Tichá, Jana. 2004. Uncertainties of gas chromatographic measurement of troublesome pesticide residues in apples employing conventional and mass spectrometric detectors. *Analytica Chimica Acta*. 520(1-2):245-255.
- Teixeira, Helena, Proença, Paula; Alvarenga, Margarida; Oliveira, Margarida; Marques, Estela P. and Vieira, Duarte Nuno. 2004. Pesticide intoxications in the centre of Portugal: three years analysis. *Forensic Science International*. 143(2-3):199-204.
- USDA/FAS. 2014. United States Department of Agriculture/Foreign Agriculture Service. World Agricultural Production. Argentina corn: December high temperatures reduce production. Circular Series, WAP 1-14, January 2014. <http://apps.fas.usda.gov/psd/online/circulars/production.pdf>
- Walorczyk, Stanisław and Gnusowski, Bogusław. 2009. Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in honeybees using acetonitrile-based extraction and gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216(37):6522-6531.