



OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR HPLC COM DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA PARA ANTIOXIDANTES SINTÉTICOS

Camila de Medeiros **Silva**¹; Enieluce Santos **Brito**²; Caroline Thais Carvalho **Santos**³ Marta Gomes
da **Silva**⁴

Nº 20212

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método para determinação simultânea de antioxidantes BHA, BHT e etoxiquim por cromatografia líquida de alta eficiência com uso de detector de fluorescência. O detector de fluorescência é seletivo e apresenta sensibilidade adequada para avaliar antioxidantes em matrizes complexas. O método validado apresentou boa linearidade, limites de quantificação de 0,02mg 100g⁻¹ para BHA, 0,25 mg 100g⁻¹ para BHT e 0,40 mg 100g⁻¹ para o etoxiquim, a precisão do sistema e do método e a exatidão foram adequados. O teste de robustez demonstrou que o tempo de agitação, período de contato entre o solvente e amostra em banho ultra som, afeta de forma significativa na extração dos analitos. Os teores de antioxidantes encontrados nas rações ficaram menores que limite máximo permitido e as rações avaliadas estavam dentro da data de validade.

Palavras-chaves: Rações, BHA, BHT, TBHQ, Etoxiquim, cromatografia

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas-SP; camilamedeiros98@gmail.com

2 Colaborador: Assistente técnico, CCQA/Ital, Campinas-SP.

3 Colaborador, Técnico de laboratório, CCQA/ Ital, Campinas-SP.

4 Orientadora: Pesquisadora, CCQA/Ital, Campinas-SP, martags@ital.sp.gov.br.



ABSTRACT – *The objective of this work was to optimize and validate a method for simultaneous determination of antioxidants BHA, BHT and ethoxyquin by high performance liquid chromatography using a fluorescence detector. The fluorescence detector is selective and has adequate sensitivity to evaluate antioxidants in complex matrices. The validated method showed good linearity, quantification limits of $0.02\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ for BHA, $0.25\text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ for BHT and $0.40\text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ for ethoxyquin, system and method precision and accuracy were adequate. The robustness test demonstrated that the stirring time, the period of contact between the solvent and the sample in an ultrasonic bath, significantly affects the extraction of the analytes. The levels of antioxidants found in the diets were lower than the maximum allowed limit and the evaluated diets were within the expiration date.*

Keywords: Feed, BHA, BHT, TBHQ, Ethoxyquin, chromatography

1 INTRODUÇÃO

1.1 Rações

O desenvolvimento da ciência da nutrição animal deu origem a uma variedade de rações com níveis adequados de nutrientes para atender aos diversos tamanhos, fases etárias, atividades e estado fisiológico do animal (MALAFAIA et al., 2002).

No Brasil, cabe ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento a responsabilidade da regulamentação das rações para cães e gatos, que está prevista no Decreto nº 76.986 de 6 de janeiro de 1976, que regulamentou a Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, e dispõe sobre a inspeção e a fiscalização dos produtos destinados à alimentação animal. A Instrução Normativa nº 08 de 2002, fixa e identifica as mínimas características de qualidade das quais os alimentos completos e os especiais para cães e gatos devem seguir.

O Brasil se sobressai mundialmente como um dos maiores produtores de alimentos para cães e gatos. Existem cerca de 500 marcas e 85 fabricantes da indústria de alimentos para pet (CARCIOFI e JEREMIAS, 2009). Com o crescimento constante do mercado, é de grande importância garantir os padrões e exigências de qualidade, bem como a otimização e redução de custos.

1.2 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são compostos capazes de retardar ou inibir a autoxidação, a partir da inibição ou interrupção da propagação de radicais livres por um ou mais mecanismos (MUKAI et al., 1993). A autoxidação pode causar formação de rancidez, descoloração, formação de sabores e odores que



alteram as propriedades sensoriais. Os antioxidantes sintéticos apresentam funções que podem retardar ou inibir a autooxidação por conversão de radicais livres em moléculas estáveis e, desta forma, aumentar a vida útil de produtos (WANASUNDARA e shahidi, 2005)

A Instrução Normativa nº 38, de 27 de outubro de 2015 do MAPA, permite o uso em rações de quatro antioxidantes, BHA-butilhidroxianisol INS 320, BHT-butilhidroxitolueno INS 321, etoxiquim CAS 91-53-2 e TBHQ-terc-butilhidroquinona INS319. O uso do TBHQ é sem restrição mas deve ser observado o uso até 200 mg/kg de gordura da ração completa, para o BHA e BHT é máximo de 150 mg/kg de dieta total, e para o etoxiquim deve ser considerado máximo de 150 mg/kg de dieta total, mas a mistura de etoxiquim com BHA e BHT não deve exceder 150 mg/kg da dieta total.

O BHA é um antioxidante fenólico que age de forma mais efetiva na anulação da oxidação em gorduras animais do que em óleos vegetais. Apresenta baixa estabilidade em altas temperaturas mas é particularmente efetivo para controlar a oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, como os presentes em óleo de coco e palma (RAMALHO, 2006).

O BHT possui propriedades muito parecidas ao BHA, a maior diferença se deve ao fato de que o BHA é sinergista para propilgalatos, enquanto o BHT não (RAMALHO, 2006).

É possível afirmar que o BHA e o BHT são sinergistas entre si. O BHA sequestra os radicais peróxidos enquanto o BHT tem ação sinérgica ou regeneradora de radicais BHA (OMURA, 1995).

TBHQ é um pó cristalino branco e brilhoso, moderadamente solúvel em óleos e gorduras. É considerado, em geral, mais eficaz em óleos vegetais que BHA ou BHT; em relação à gordura animal (RAMALHO, 2006)

Estudos toxicológicos com animais têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico, o que torna o uso destes antioxidantes limitado (BALEY, 1996; MADHAVI e SALUNKLE, 1995).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS, REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram analisadas 3 amostras das marcas A (fabricação: 16/07/19, validade: 15/07/20), B (fabricação: 23/07/19, validade: 29/10/20) e C (fabricação: 01/12/2018, validade: 02/03/2020) adquiridas no mercado local.

Os padrões de antioxidantes foram fornecidos pela Sigma (USA): terc-butil-hidroquinona (TBHQ), produto nº 112941; 2- e 3-terc-butil-4-hidroxianisole (BHA), produto B1253; 3, 5-di-butil-hidroxi tolueno (BHT), produto 47168; e etoxiquim, produto 31519.



Todos os reagentes utilizados no estudo foram de grau analítico ou superior. Água deionizada foi purificada utilizando um sistema de osmose reversa (Gekara, São Paulo, Brasil).

2.2 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

No estudo foi utilizado um sistema cromatográfico composto por bomba modelo Rad Pump III (Lab Alliance, Pennsylvania, USA) e detector de fluorescência modelo 2475 (Waters, Massachusetts, USA), o injetor foi tipo Rheodyne com alça amostradora de 20 μL . A fase móvel foi composta por acetonitrila : metanol : ácido acético : trietilamina (42,45:42,45:15:0,1, v/v/v/v), vazão de 0,7 mL min^{-1} , e a separação ocorreu em coluna de RP 18 Lichrospher (C18, 5 μm , 250 x 4, Merk, Alemanha).

Os comprimentos de onda e excitação e missão foram avaliados e adequados para obtenção adequada da intensidade dos picos dos analitos.

2.3 Validação

A validação do método foi realizada de acordo com INMETRO (2020) e Quattrocchi et al (1992) e, consistiu na avaliação das seguintes figuras de mérito: sensibilidade (linearidade, limites de detecção e quantificação), precisão (método e sistema), exatidão e robustez.

Sensibilidade: a linearidade foi avaliada com a construção de uma curva analítica com seis pontos, com as seguintes concentrações: TBHQ entre 7,84E-05 e 2,74E-04 mg mL^{-1} ; BHA entre 6,50E-05 e 2,27E-04 mg mL^{-1} ; BHT entre 1,25E-03 e 4,39E-03 mg mL^{-1} e etoxiquim entre 7,05E-04 e 2,47E-03 mg mL^{-1} , respectivamente. As estimativas de limite detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram obtidas com curvas analíticas suplementares com três concentrações inferiores a primeira concentração dos analitos da curva analítica, injetados em triplicata. Para a construção das curvas de LD e LQ foram utilizadas as seguintes concentrações: TBHQ entre 3,92E-05 e 5,88E-05 mg mL^{-1} ; BHA entre 3,25E-05 e 4,87E-05 mg mL^{-1} ; BHT entre 6,27E-05 e 9,40E-05 mg mL^{-1} e etoxiquim entre 3,53E-05 e 5,29E-05 mg mL^{-1} , respectivamente. A avaliação da linearidade foi com a Equação 1 e do LD e LQ foi com a aplicação das Equações 2 e 3 (QUATTROCCHI et al. 1992).

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \quad (1)$$

$$\text{Limite de detecção} = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (2) \quad \text{Limite de quantificação} = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Onde: t_r , valor *t-student* calculado; r , correlação linear; n , número de medidas; Y_{bl} , estimativa da resposta do branco (coeficiente linear obtido na equação da curva concentração área⁻¹); S_{bl} , estimativa de desvio do padrão do branco (coeficiente linear obtido na equação da curva concentração s^{-1}); b , coeficiente angular da curva analítica.



Precisão: do sistema foi obtida com cinco injeções, consecutivas, de um ponto da curva analítica, e do método foi avaliada com oito repetições analíticas, simultâneas e independentes. O coeficiente de variação (CV) encontrado entre as repetições foi avaliado segundo Horwitz (1982) (Equação 4).

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

Onde: C, concentração estudada expressa como potência de 10 (ex. 1 mg 1000g⁻¹ (ppm) = 10⁻⁶, CV = 2⁴ = 16%).

Exatidão: foi obtida pela recuperação dos analitos adicionado à amostra de ração C em três níveis de adição e com três repetições analíticas, e avaliada estatisticamente Yehye et al.¹ pela Equação 5.

$$t_{cal} = \frac{|X - \bar{X}|}{s} \sqrt{n} \quad (5)$$

Onde: t_{cal} , t -student calculado; X , corresponde a 100%; \bar{X} , recuperação média; s, estimativa de desvio padrão das recuperações; n, número de medidas.

Robustez: no teste foi utilizado a ração A por apresentar os antioxidantes BHA e BHT e avaliada segundo Quattocchi et al. (1992), utilizando o desenho de Placket e Burman com estudo de sete variáveis em oito ensaios (Tabela 1). As variáveis avaliadas no estudo estão descritas na Tabela 2, e os resultados obtidos foram verificados pelo teste t (HEYDEN et al, 2001; DEJAEGER et al., 2007), com a avaliação do erro crítico ($E_{critical}$), com nível de significância $\alpha = 0,05$, para n-1 graus de liberdade (Equação 6 e 7).

Tabela 1: Matriz das variáveis segundo desenho de Placket e Burman (QUATTROCCHI, 1992)

Variável	Ensaio							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A ou a	A	A	A	A	a	a	a	a
B ou b	B	B	b	b	B	B	b	b
C ou c	C	c	C	c	C	c	C	c
D ou d	D	D	d	d	d	d	D	D
E ou e	E	e	E	e	e	E	e	E
F ou f	F	f	f	F	F	f	f	F
G ou g	G	g	g	G	g	G	G	g

Letra maiúscula = nível +; letra minúscula = nível -.



Tabela 2: Descrição das variáveis utilizadas no teste de robustez

Variável	Descrição	Nível –	Nível +
A	Tomada de amostra	2 g	5 g
B	Antioxidante (ácido ascórbico)	0,00 g	0,01 g
C	Volume solvente extração	3 x 5 mL	3 x 10 mL
D	Tempo extração	5 min	10 min
E	Temperatura evaporação	< 40°C	≤ 50°C
F	Homogeneização após solvente	sem	com
G	Volume final	5 mL	10 mL

$$t = \frac{|E_x|}{(SE)_e} \quad (6)$$

$$|E_x| = t * (SE)_e \quad (7)$$

Onde: t = t -critical ($n-1$); $|E_x|$ = efeito variável X na resposta Y; $(SE)_e$ = erro padrão do efeito que representa variabilidade experimental.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ADEQUAÇÃO DOS COMPRIMENTOS DE ONDA DE EXCITAÇÃO E EMISSÃO

Os resultados obtidos na avaliação dos comprimentos de ondas para os quatros analitos estão apresentados na Tabela 3. Baseado nos resultados obtidos, optou-se por utilizar comprimentos de ondas para excitação e emissão diferentes para o etoxiquim, pois o analito requer maior energia para excitar a molécula e emite fluorescência em comprimento de onda mais longo que os demais analitos. A programação utilizada para o detector de fluorescência está descrita na Tabela 4, e o tempo total da corrida para os analitos foi de 15 minutos (Figura 1 e 2).

Tabela 3: Resultados obtidos nos testes para avaliação dos comprimentos de ondas

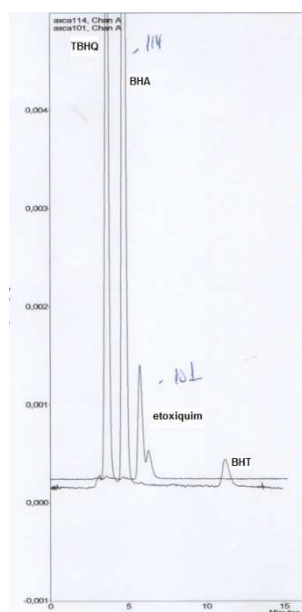
λ (nm)	% área				Escala (v)
	TBHQ	BHA	Etoxiquim	BHT	
EEx 240; Em 290	18	48	0	33	0,001
Ex 240; Em 330	42	48	11	0	0,001
Ex 240; Em 350	44	42	14	0	0,001
Ex 240; Em 400	2	1	62	0	0,001
Ex 250; Em 290	23	12	42	13	0,001
Ex 250; Em 300	22	46	17	11	0,006
Ex 250; Em 310	35	57	5	4	0,018
Ex 260; Em 290	15	17	25	36	0,008
Ex 260; Em 300	22	52	8	19	0,001

Ex 260; Em 310	32	59	2	7	0,05
Ex 260; Em 320	39	56	2	3	0,07
Ex 270; Em 300	25	56	2	17	0,01
Ex 270; Em 310	39	56	0	5	0,007
Ex 280; Em 310	40	57	0	3	0,016
Ex 290; Em 310	44	54	0	1	0,016

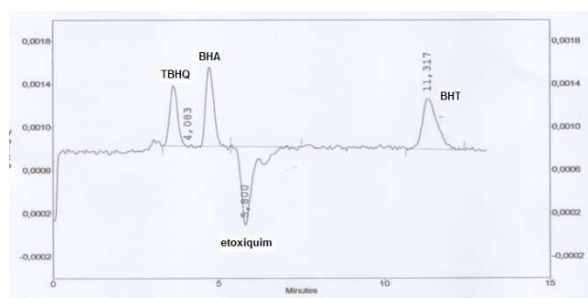
λ , comprimento de onda; v, volts

Tabela 4: Programação dos comprimentos de ondas para excitação e emissão

Programação (min)	λ excitação (nm)	λ emissão (nm)	Analito	Tempo retenção
zero	280	310	TBHQ e BHA	3,7 e 4,7
5,3	240	400	etoxiquim	5,8
7,1	280	310	BHT	11,4



1



2

Figura 1: Cromatogramas dos antioxidantes obtidos nas condições otimizadas para análise

Figura 2: Cromatograma de mistura de antioxidantes obtido com a programação dos comprimentos de onda. Condições analíticas descritas no texto.



3.2 AVALIAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES PRESENTES NAS RAÇÕES

As rações para cães identificadas como A, B e C, apresentavam no rótulo as seguintes informações: produto A adição de BHT, produto B de BHA e BHT e o produto C sem adição de antioxidantes. Os resultados obtidos nas rações antes de otimizar o processo de extração dos analitos estão apresentados na Tabela 5. Os resultados encontrados diferiram dos rótulos dos produtos A que apresentou BHA e BHT e o produto B somente BHA. Embora os resultados observados sejam diferentes do rótulo, concentrações encontradas nos produtos A e B estão abaixo do limite máximo de adição, segundo a Instrução normativa nº 38 do MAPA.

Tabela 5: Resultados obtidos nas avaliações das três amostras de reações.

Produto	TBHQ (mg/kg)	BHA (mg/kg)	BHT (mg/kg)	Etoxiqum (mg/kg)
A	ND ^a	18,10 (0,08) ^b	46,38 (0,96) ^b	ND ^b
B	ND ^a	0,77 (0,01) ^b	ND ^a	ND ^a
C	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a

^a Média e estimativa de desvio padrão

^b ND = Não detectado

3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Sensibilidade: os dados obtidos na avaliação da linearidade estão apresentados na Tabela 6. O valor *t-student* para n-1 graus de liberdade com 95% de probabilidade é $t_{(95, 4)}$ 2,78, e os valores *t* calculados para a linearidade foram 25,12 para TBHQ, 28,21 para o BHA, 57,70 para o BHA e 31,56 para o etoxiquim, respectivamente. Baseado nos valores obtidos, a correlação foi significativa para a faixa avaliada.

Como a matriz ração apresenta muitos interferentes e o sinal do instrumento sofre ação destes, foi adotado como LD 50% e LQ 100% da concentração utilizada no primeiro nível de adição no teste de exatidão para os analitos BHA e BHT. Os valores considerados para o LD foram 0,01 mg 100g⁻¹ para BHA e 0,13 mg 100g⁻¹ para o BHT, e para o LQ foram 0,02 mg 100g⁻¹ para o BHA e, 0,25 mg 100g⁻¹ para o BHT, respectivamente. O antioxidante TBHQ requer ajustes no sistema de eluição devido a coeluição de interferente no tempo de retenção do analito (Figura 3).

Tabela 6: Parâmetros de linearidade, limites de detecção (LQ) e quantificação (LQ) calculados

Analito	RL: Curva analítica (mg área ⁻¹)	(r ²)	RL: Curva LD e LQ (mg área ⁻¹)	RL: Curva LD e LQ (mg s ⁻¹)	LD (mg 100g ⁻¹)	LQ (mg 100g ⁻¹)
TBHQ	A=56.650.874,64c + 1.117,62	0,9937	A=19.495.764c + 2.776,8	A=-4.889.024,2c + 772,5	1,04E-02	2,14E-02
BHA	A=89.062.180,98c + 1.731,61	0,9950	A=118.710,6c - 247,7	A=29.545.606,8c - 922	3,91E-03	1,23E-02

BHT	$A = 5.045.098,86c + 2.222,08$	0,9988	$A = 5.255.866,7c + 681,5$	$A = -918.641,8c + 1.454,9$	5,26E-02	1,59E-01
Etoxiqum	$A = 11.080.665,03c + 1.663,31$	0,9960	$A = 19.680.127c - 1.866,7$	$A = -2.125.858,6c + 1.573,6$	1,51E-01	4,03E-01

RL, equação de regressão linear; c, concentração; r^2 , coeficiente de correlação; s, estimativa de desvio padrão das áreas obtidas nas três injeções de cada concentração; A, Área.

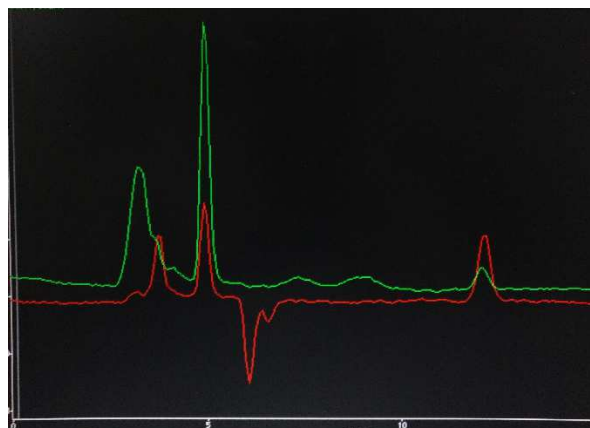


Figura 3: Cromatograma vermelho: mistura de padrões de antioxidantes; cromatograma verde: razão A. Condições analíticas descritas no texto.

Precisão: os resultados obtidos nos testes de precisão do sistema e do método estão apresentados na Tabela 7. O teste de precisão do método foi realizado com a razão A, que apresentou os antioxidantes BHA e BHT. Os coeficientes de variação encontrados foram menores que os obtidos com as equações de Horwitz (1982), portanto as precisões foram adequadas.

Tabela 7: Valores encontrados no teste de precisão do sistema e método para antioxidantes

Analito	Precisão	Valor médio	s	CV (%)	CV Max (%)
BHA	Sistema (n 5; área)	16285	578	4	10
	Método (n 8; mg 100g ⁻¹)	1,81	0,04	2	
BHT	Sistema (n,5; área)	17233	659	4	9
	Método (n 8; mg 100g ⁻¹)	53,63	0,15	4	
Etoxiqum	Sistema (n 5; área)	24571	1021	4	9

s, estimativa de desvio padrão; CV, coeficiente de variação; CV Max, coeficiente de variação obtido pela equação de Horwitz (1982).

Exatidão: Os resultados obtidos com o teste estão apresentados na Tabela 8, e o valor *t-student* calculado foi comparado com o valor tabelado com n-1 graus de liberdade para uma probabilidade

de 95%, t tabelado $(95\%, 8)$ é igual a 1,86. Como os valores calculados foram menores que o valor t tabelado, o método apresentou exatidão adequada com 95% de confiança.

Tabela 8: Valores encontrados na exatidão do método para antioxidantes.

Analito	Nível adição	A	B	C	Rec. \bar{X}	CV (%)	t cal
BHA	0,014	0,018	0,015	0,017	123,31	10	1,68
	0,027	0,029	0,041	0,028	120,15	21	
	0,048	0,051	0,056	0,059	114,37	7	
BHT	0,246	0,270	0,242	0,231	101,31	8	0,24
	0,488	0,395	0,382	0,422	81,57	5	
	0,860	0,744	0,842	0,833	93,77	7	
Etoiquim	0,117	0,119	0,141	0,120	108,06	10	0,12
	0,235	0,281	0,277	0,261	116,10	4	
	0,412	0,363	0,394	0,358	90,00	5	

Rec., recuperação; \bar{X} , média; t cal, valor t -student calculado.

Robustez: os resultados obtidos no ensaio estão na Tabela 10 e foram avaliados pelo teste t (HEYDEN et al, 2001; DEJAEGER et al., 2007), sendo considerado o valor crítico $t_{(95, 6)}$ igual a 2,45. O efeito das variáveis sobre os antioxidantes BHA e BHT estão apresentados na Figura 4. De acordo com o resultado obtido foi definido para o procedimento analítico a tomada de amostra de 5 g; 0,01 g de antioxidante (ácido ascórbico; volume de solvente para extração de 3 x 5 mL; tempo de extração em banho ultra som de 10 minutos; temperatura igual ou menor que 40°C para evaporação do solvente e volume final para dissolução dos analitos de 10 mL.

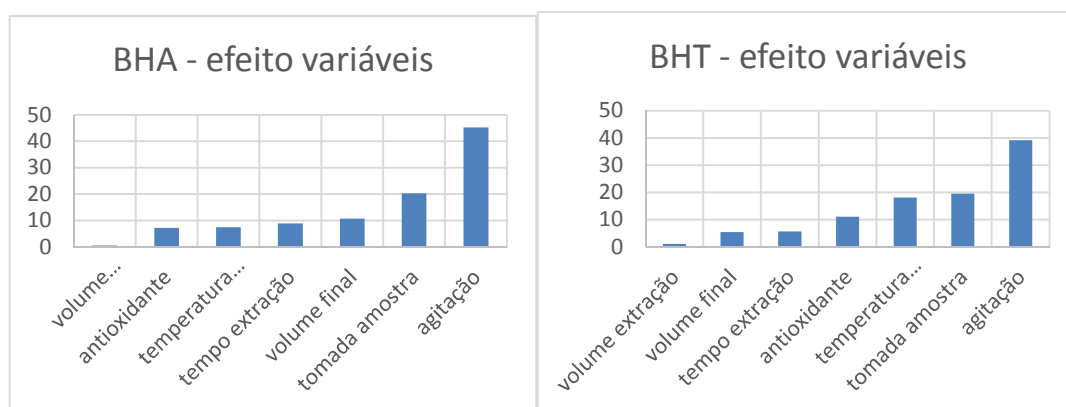


Figura 4: Efeito das variáveis nos ensaios dos antioxidantes BHA e BHT.



4 CONCLUSÃO

O método validado mostrou-se robusto, linear para a faixa avaliada, e com boa precisão e exatidão. Devido as características da amostra, ração para cães, os limites de detecção e quantificação foram $0,01 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $0,02 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para BHA, $0,13 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $0,25 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para BHT, e $0,15 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $0,40 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ para o etoxiquim, respectivamente. O antioxidante etoxiquim foi retirado do estudo devido a coeluição de interferentes. As duas marcas de ração, A e B avaliadas apresentaram teores de antioxidantes menores que o limite máximo permitido, e a presença de antioxidantes diferiram da informação dos rótulos.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPQ – PIBIC, pela bolsa concedida.

6 REFERÊNCIAS

BAILEY, A. E.; ***Bailey's Industrial Oil and Fat Products***, 5 th ed., John Wiley: New York, 1996, vol. 3.

BRASIL. MAPA. Decreto nº 76.986, de 6 de janeiro de 1976. Disponível em:

<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1970-1979/decreto-76986-6-janeiro-1976-425557-publicacaooriginal-1-pe.html>. Acesso em 28 Jul 2020

BRASIL. MAPA – Instrução normativa nº 38, de 27 de outubro de 2015. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-38-de-27-de-outubro-de-2015.pdf/view>. Acesso em 07 fev,2020.

BRASIL. MAPA. Instrução Normativa nº 8, de 11 de outubro de 2002. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 2002. seção 2, p.1-6.

CARCIOFI, A. C.; JEREMIAS, J. T. Progresso científico sobre nutrição de animais de companhia na década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 35-41, 2010, Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbz/v39sspe/05.pdf>. Acesso em: 28 jul. 2020.

DEJAEGER, B., HEYDEN, Y.D.. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography**, v. 1158, p. 138-157, 2007. Doi: 10.1016/j.chroma.2007.02.086.

HEYDEN, Y.V.; NIJHUIS, A; SMEYERS-VERBEKE, J. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 723-753, 2001. Doi: 10.1016/S0731-7085(00)00529-X.



HORWITZ, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 1, pg. 67A – 76A, 1982.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008. Rev.: 09, 2020. Disponível em: file:///C:/Users/Admin/Downloads/DOQ-Cgcre-8_09.pdf. Acesso em 28 jul 2020.

MALAFIA, P.A.M. et al. Determinação das frações que constituem a proteína bruta de alguns volumosos e concentrados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 32, 1996, Fortaleza: SBZ, 1996, p.302-305.

MADHAVI, D. L.; SALUNKHE, D. K. In: **Antioxidants**; MAGA, J.; TU, A. T., eds.; New York: Marcel Dekker, 1995, p. 89.

MUKAI, K; MORIMOTO, H; KIKUCHI, S; NAGAOKA, S. Kinetic study of free-radicalscavenging action of biological hydroquinones (reduced forms of ubiquinone, vitamin K and tocoferol quinone) in solution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, v. 1157, n 2, p, 313-317, 1993. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(93\)90115-O](https://doi.org/10.1016/0304-4165(93)90115-O).

OMURA, K. Antioxidant synergism between butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **Journal of the American Oil Chemists's Society**, v. 72, p. 1565-1570, 1995. DOI: 10.1007/BF02577855.

QUATTROCCHI, O. A. ANDRIZZI, S.A., LABA, R.F. **Introdución a la HPLC Aplicación y Práctica**. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro SA, 1992, p.301-328.

WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: SHAHIDI, F. *Bailey's Industrial Oil and fat Products*, sixth edition, six volume set. John Wiley & Sons, Inc. 2005, chap. 11, p. 431-489. <https://doi.org/10.1002/047167849X.bio002>.

YEHYE, W. A.; RAHMAN, N. A.; ARIFFIN, A.; HAMID, S. B. A.; ALHADI, A. A.; KADIR, F. A.; YAEGHOOBI, M. Understanding the chemistry behind the antioxidante activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p.295-312, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.026>.