

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
*Green Biotech Network*

ARIADNE MAGALHÃES CARNEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE ZEAXANTINA E DE LUTEÍNA EM GRÃOS DE MILHO**

Botucatu

2023

ARIADNE MAGALHÃES CARNEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DE ZEAXANTINA E DE LUTEÍNA EM GRÃOS DE MILHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - Instituto de Biociências de Botucatu como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador:

Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari

Botucatu

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Carneiro, Ariadne Magalhães.

Desenvolvimento de um novo procedimento para extração e quantificação de zeaxantina e de luteína em grãos de milho/  
Ariadne Magalhães Carneiro. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu  
Orientador: Cristiano Soleo de Funari  
Capes: 90400003


1. Planejamento experimental. 2. Amostragem. 3. Química analítica. 4. Cromatografia Líquida. 5. Química verde. 6. Milho.

Palavras-chave: Planejamento de experimentos; Preparação da amostra; Química analítica verde; UHPLC; Zea mays L..

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ARIADNE MAGALHÃES CARNEIRO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.**

Aos 31 dias do mês de agosto do ano de 2023, às 08:30 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de ARIADNE MAGALHÃES CARNEIRO, intitulada **DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROCEDIMENTO PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ZEAXANTINA E DE LUTEÍNA EM GRÃOS DE MILHO**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas UNESP Botucatu, Dra. ISABEL DUARTE COUTINHO (Participação Virtual) do(a) Departamento: Pesquisa e Desenvolvimento / Natcrom Soluções Sustentáveis LTDA - Araraquara, Prof. Dr. DANIEL RINALDO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Química / Faculdade de Ciências - Unesp/ Câmpus de Bauru, Dr. LUIZ ANTONIO DUTRA (Participação Virtual) do(a) Instituto de Química / Unesp - Araraquara, Prof. Dr. FELIPE KORBUS SUTILI (Participação Virtual) do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / FCA/Botucatu - Unesp. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

Documento assinado digitalmente  
 CRISTIANO SOLEO DE FUNARI  
Data: 04/09/2023 10:47:16-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

## **Agradecimentos**

Algumas pessoas são essenciais em nosso caminho. Meus pais são essas pessoas, meu porto seguro, meu refúgio para os maus momentos e o aconchego para os bons. A Wilson e Jeruza dedico esta tese. Sou grata por tudo, e não seria capaz de realizar este trabalho sem eles. Tiago Pereira Marques também foi uma dessas pessoas. Parceiro, companheiro e amigo, agradeço imensamente pelo carinho.

Mesmo que difícil e desafiador, sou grata por todo o período que estive no doutorado. Cresci como profissional, aluna, pesquisadora e ser humano. Agradeço à CAPES (Código de financiamento 001) pela bolsa cedida, e à FAPESP (2017/06216-6 e 2018/01786-1) por todo o auxílio.

Agradeço também a todos os colegas de laboratório, com quem pude aprender muito, em especial Felipe Sanchez Bragagnolo, Bruna Lima, Lucas Chibli e Martin Leme. Agradeço ao professor Lin Chau Ming, pela doação das amostras e a Flávio Cesar Galhardo, pela ajuda e disponibilidade durante a coleta de amostras.

Ao meu orientador, Cristiano Funari, agradeço pelos inúmeros ensinamentos, pelos puxões de orelha nos momentos certos e pela enorme paciência que teve comigo durante todo o tempo. Levarei todos os aprendizados adquiridos até aqui para toda minha vida. Obrigada por ser o exemplo de profissional, ético e dedicado, que almejo ser um dia.

**Resumo:** Os grãos de milho são fonte importante dos carotenoides bioativos zeaxantina e luteína. Os métodos atuais para quantificar essas substâncias têm algumas desvantagens relacionadas à sustentabilidade e ao rendimento da amostra. Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método analítico verde, eficiente, rápido e reproduzível para quantificar essas xantofilas em grãos de milho. Os solventes recomendados pelo guia de seleção de solvente CHEM21 foram selecionados. A extração por maceração dinâmica e a separação por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência foram otimizadas por planejamento de experimentos. Em seguida, todo o procedimento analítico foi validado e comparado com procedimentos utilizados para o mesmo fim, inclusive oficial, e aplicados em diferentes amostras de milho. O método proposto demonstrou ser mais verde, igual ou mais eficiente, mais rápido e mais reproduzível do que os métodos comparativos. A etapa de extração também pode ser ampliada para a produção industrial de extratos enriquecidos com zeaxantina e luteína, uma vez que utiliza apenas água e etanol de grau alimentício compatível.

**Palavras-chave:** preparação da amostra, química analítica verde, planejamento de experimentos, *Zea mays* L., UHPLC

**Abstract:** Corn grains are a major source of both the bioactive carotenoids zeaxanthin and lutein. Current methods to quantify these substances have some disadvantages related to sustainability and sample throughput. This work aimed to develop a green, efficient, rapid, and reproducible analytical method to quantify these xanthophylls in corn grains. Solvents recommended by the CHEM21 solvent selection guide were screened. The extraction by dynamic maceration and separation by ultra-high-performance liquid chromatography were optimized by design of experiments. Then, the entire analytical procedure was validated and compared with procedures used for the same purpose, including an official one, and applied to different corn samples. The proposed method was demonstrated to be greener, equal to or more efficient, faster, and more reproducible than the comparative methods. The extraction step could be scaled up for industrial production of zeaxanthin- and lutein-enriched extracts, as it uses only compatible food grade ethanol and water.

**Keywords:** sample preparation, green analytical chemistry, design of experiments, *Zea mays* L., UHPLC

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
	2.1 Química Verde .....	3
	2.2 Química Analítica Verde .....	4
	2.3 Carotenoides .....	6
	2.4 Zeaxantina e luteína .....	8
	2.5 O Milho e seus metabólitos .....	11
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	12
	3.1 Amostras de milho .....	12
	3.2 Padrões e Solventes .....	14
	3.3 Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a um detector de rede de fotodiodos (UHPLC-PAD).....	14
	3.3.1 Transposição de método HPLC-PAD para UHPLC-PAD .....	14
	3.3.2 Desenvolvimento de um novo método UHPLC-PAD .....	14
	3.4 Preparação da amostra .....	15
	3.4.1 Métodos de extração comparativos e de referência .....	15
	3.4.2 Desenvolvimento de um novo método de extração.....	16
	3.5 Validação do novo método.....	16
	3.6 Quantificação de zeaxantina e luteína em diferentes amostras de milho .....	16
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	16
	4.1 Transposição dos métodos HPLC-PAD comparativos para UHPLC-PAD .....	16
	4.2 Desenvolvimento de um novo método UHPLC-PAD para separação de zeaxantina e luteína .....	18
	4.3 Desenvolvimento de um novo procedimento para extração de zeaxantina e luteína .....	23
	4.4 Expandindo a comparação entre procedimentos de quantificação de zeaxantina e luteína .....	28
	4.5 Validação do novo procedimento analítico .....	35
	4.6 Aplicação do método para diferentes amostras de grãos de milho .....	42
5	CONCLUSÃO .....	45
	REFERÊNCIAS .....	46

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura geral dos carotenoides (IUPAC, 1971) ..... 7
- Figura 2:** Estrutura química dos compostos zeaxantina e luteína (SILVA et al., 2010) ... 9
- Figura 3:** Estrutura do grão de milho (PAES, 2006). ..... 12
- Figura 4:** Cromatogramas UHPLC-PAD representativos a 450 nm de um extrato de grão de milho. (A) Wang et al. (2019) método transposto; (B) Rivera e cols. (2013) método transposto; (C) Método proposto. Coluna C18, 150 × 3,0 mm, 1,8 µm (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA). Fases móveis: Cromatograma A: acetonitrila-diclorometano (95:5, v/v); Cromatograma B: água (A) e acetonitrila-metanol (7:3, v/v) (B), no seguinte gradiente: 80% B (0–4,5 min), 80–100% B (4,5–6,1 min), 100% B (6,1–20,1 min); Cromatograma C: água (A) e etanol (B), no seguinte gradiente: 80–100% B (0–20 min). Vazões: em A: 0,7 mL/min; em B: 0,77 mL/min; em C: 0,45 mL/min. Volumes de injeção: 5 µL. Temperatura de análise: 35 °C. Compostos monitorados: (1) zeaxantina, (2) luteína. .... 17
- Figura 5:** Cromatograma representativo UHPLC-PAD a 450 nm da amostra 2 (Tabela 1). Coluna C18 150 x 3,0 mm, 1,8 µm (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA). Fases móveis: água (A) e ACN:MeOH 7:3 (v/v) (B), no seguinte gradiente: 80-100% B (0-6,10 min), 100% B (6,10-20,10 min) ). Volume de injeção: 5 µL. Temperatura de análise: 35°C. .... 18
- Figura 6:** Superfície de resposta para otimização da resolução zeaxantina-luteína no método analítico. As variáveis x2 e x3 são a porcentagem de carbonato de dimetila e tempo de gradiente, respectivamente. .... 20
- Figura 7:** (A) Cromatograma representativo UHPLC-PAD a 450 nm da amostra 2 (Tabela S1). (B) Cromatograma representativo UHPLC-PAD/UV a 451 nm de padrão de zeaxantina. (C) Cromatograma representativo UHPLC-PAD/UV a 446 nm de luteína padrão. Coluna C18 150 x 3,0 mm, 1,8 µm (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA). Fases móveis: água (A) e etanol (B), no seguinte gradiente: 80-100% B (0-20, 30 min). Volume de injeção: 5 µL. Temperatura de análise: 35°C. .... 21
- Figura 8:** (A) espectro de massa e (B) espectro de UV da zeaxantina na amostra 2 (Tabela S1). (C) Espectros de massa e (D) Espectros de UV do padrão analítico de zeaxantina. .... 22
- Figura 9:** (A) espectros de massa e (B) espectros UV de luteína na amostra 2 (Tabela S1). (C) Espectros de massa e (D) Espectros de UV do padrão analítico de luteína. .... 22
- Figura 10:** Cromatograma HPLC-PAD representativo de grão de milho (amostra 2, Tabela S1) o método desenvolvido neste trabalho (topo) seguido pelos picos deconvoluídos e espectros correspondentes: (1) zeaxantina e (2) luteína. Coluna C18 150 x 3,0 mm, 1,8 µm (Zorbax

Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA). Fases móveis: água (A) e etanol (B), no seguinte gradiente: 80-100% B (0-20, 30 min). Volume de injeção: 5 µL. Temperatura de análise: 35°C. .... 23

**Figura 11:** Média das áreas dos picos de UHPLC-PAD a 450 nm de zeaxantina e luteína em grãos de milho (amostra 2) quando extraídos com diferentes solventes. Para cada composto, letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os solventes de extração (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Extrações realizadas por maceração dinâmica, a 450 rpm, por 45 minutos, à temperatura de 30 °C, relação massa/solvente de 5 g:7,9 mL. .... 24

**Figura 12:** Comparação entre o novo método proposto, o método oficial AACC 14-50 e os métodos comparativos. As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). .... 27

**Figura 13:** Curvas de calibração para zeaxantina e luteína..... 36

**Figura 14:** Cromatogramas de UHPLC-PAD a 450 nm da injeção de um extrato representativo em 0, 24, 48 e 72 h após a preparação. O extrato foi mantido no escuro e a 25 °C. Coluna C18 150 x 3,0 mm, 1,8 µm (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA). Fases móveis: água (A) e etanol (B), no seguinte gradiente: 80-100% B (0-20, 30 min). Volume de injeção: 5 µL. Temperatura de análise: 35°C. ....41

**Figura 15:** Quantificação de zeaxantina e luteína em diferentes amostras em base seca. .42

**Figura 16:** Amostras de milho crioulo. .... 46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Lista de amostras e respectivos locais de origem. ....	13
<b>Tabela 2:</b> Planejamento Composto Central empregado para otimizar as condições cromatográficas para separação de zeaxantina e luteína .....	19
<b>Tabela 3:</b> Planejamento Fatorial Fracionado 25-1 para otimizar as condições de extração de zeaxantina e luteína. ....	25
<b>Tabela 4:</b> Planejamento Composto Central para otimizar as condições de extração de zeaxantina e luteína. ....	26
<b>Tabela 5:</b> Condições ótimas para zeaxantina, luteína e condição compromisso, respectivamente. ....	27
<b>Tabela 6:</b> Impactos ambientais estimados do novo procedimento proposto e dos métodos comparativos, e alguns de seus pontos fortes e fracos para a quantificação de zeaxantina e luteína. ....	29
<b>Tabela 7:</b> Cálculos da métrica AGREE com pesos padrão para cada procedimento de preparação de amostra antes da injeção no sistema UHPLC-PAD/UV .....	30
<b>Tabela 8:</b> Cálculos da métrica ComplexGAPI com pesos padrão para cada procedimento de preparação de amostra. ....	32
<b>Tabela 9:</b> Parâmetros da validação e resultados resumidos para o procedimento desenvolvido .....	35
<b>Tabela 10:</b> Precisão instrumental UHPLC-PAD (nove injeções consecutivas do mesmo extrato) .....	37
<b>Tabela 11:</b> Precisão intra-dia e entre dias (quatro extratos foram preparados e injetados cada dia).....	38
<b>Tabela 12:</b> Precisão intermediária. ....	39
<b>Tabela 13:</b> Estabilidade de três extratos mantidos à 25 °C no escuro, injetado ao longo de 72 h. ....	40
<b>Tabela 14:</b> Quantificação de zeaxantina e luteína em diferentes amostras de grão de milho .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais do mundo (Ranum, Peña-Rosas, & Garcia-Casal, 2014). Somente na safra 2021/2022, a produção mundial deste grão foi de 1,2 milhão de toneladas (USDA, 2022), uma vez que o milho é um alimento básico altamente integrado na agricultura global, na alimentação humana e animal (Nuss & Tanumihardjo, 2010). Este cereal é muito versátil e pode ser processado em uma variedade de alimentos e produtos industriais, como óleo, bebidas, cola e bioetanol (Ranum, Peña-Rosas, & Garcia-Casal, 2014).

Os grãos de milho contêm amido (72%), proteína (10%), lipídios (4%), fibras, vitaminas e minerais (magnésio, potássio e fósforo). Além de seu alto valor nutricional, esse cereal possui metabólitos secundários bioativos, principalmente carotenoides, que incluem as xantofilas – zeaxantina, luteína e  $\beta$ -criptoxantina – e os carotenos –  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno (Inglett, 1970; Siyuan, Tong, & Liu, 2018).

Tanto a zeaxantina quanto a luteína possuem diferentes atividades biológicas e foram relatadas como os principais carotenoides dietéticos para a manutenção da saúde dos olhos, e são frequentemente referidos como “pigmentos maculares” (Mrowicka, Mrowicki, Kucharska & Majsterek, 2022; Zuniga, Bishop & Turner, 2021). Estes são os únicos carotenoides que se acumulam na mácula ocular humana, reduzindo a sua degeneração associada à idade e à exposição à luz azul, ou seja, ajudam a manter uma boa saúde ocular humana (Junghans, Sies, & Stahl, 2001; Khachik, Bernstein, & Garland, 1997; Khachik, de Moura, Zhao, Aebischer, & Bernstein, 2002; Mrowicka et al., 2022).

Como os humanos não biossintetizam esses compostos, é preciso obtê-los por meio da ingestão de alimentos e suplementos. Para obter o benefício da proteção dos olhos, adultos saudáveis devem consumir pelo menos 10 mg por dia de zeaxantina e luteína (Wilson et al., 2021). O milho é a principal fonte de ambos os compostos em quantidades apreciáveis (Revilla et al., 2022). Com diferenças significativas no teor desses compostos dependendo da variedade de milho, entre outros fatores, a dose adequada estimada poderia ser alcançada pelo consumo diário de 4 a 11 espigas de milho; no entanto, isso acarretaria o consumo de grandes quantidades de carboidratos e lipídios, o que teria efeitos indesejados (por exemplo, ganho de peso) (Chew et al., 2013; O'Hare, Fanning & Martin, 2015). Portanto, tem havido uma busca por variedades de milho mais ricas em zeaxantina e luteína, bem como o desenvolvimento de suplementos alimentares ricos nesses compostos (D'Amato, De Feudis, Guiducci, & Businelli, 2019; de

Campo et al., 2019; O'Hare et al., 2015). Nesses casos, o controle de qualidade exigiria a quantificação dessas substâncias.

Em geral, um método analítico deve idealmente ser rápido, seletivo e reprodutível, bem como ter um alto grau de precisão e impactos ambientais mínimos (Armenta, Garrigues, Esteve-Turrillas, & de la Guardia, 2019; Moldoveanu & David, 2015). Até onde sabemos, nenhum dos métodos disponíveis na literatura para quantificar zeaxantina e luteína atende a todos esses critérios. Por exemplo, o método AACC 14-50 da American Association of Cereal Chemists emprega três solventes recomendados (de acordo com o guia de seleção de solvente CHEM21) (Prat et al., 2016) para todo o procedimento (ou seja, água, butanol e etanol), mas requer 18 horas para preparação da amostra somente (AACC International, 2009). O método proposto por Fanning et al. (2010) possui diversas etapas para preparo da amostra, afetando a reprodutibilidade do processo; usa os solventes perigosos hexano e éter metil terc-butílico (Prat et al., 2016); e empregou uma coluna C30 para a etapa de quantificação, que é uma fase estacionária incomum em laboratórios químicos.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método rápido, seletivo, reprodutível e eficiente com mínimo impacto ambiental (incluindo preservação da saúde do analista) para controle de qualidade de amostras de milho de acordo com seu teor de zeaxantina e luteína. Para conseguir isso, (i) os solventes recomendados pelo guia de seleção de solvente CHEM21 foram selecionados para as etapas de preparação da amostra e sua análise por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência; (ii) essas etapas foram otimizadas pelo planejamento de experimentos; (iii) todo o procedimento analítico foi validado com precisão intermediária, o que expressa variações dentro dos laboratórios; (iv) a deconvolução dos picos foi realizada para verificar a pureza dos picos correspondentes aos compostos alvo; (v) sua veracidade, eficiência e rendimento amostral foram comparados com procedimentos utilizados para o mesmo fim, inclusive oficial; (vi) e o método foi aplicado a diferentes amostras de milho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Química Verde

A Química Verde nasceu como uma resposta à Lei de Prevenção da Poluição de 1990, que declarou que a política nacional dos EUA deveria eliminar a poluição através de projetos melhorados, que incluíam mudanças econômicas nos produtos, processos, no uso de matérias-primas e incentivo a reciclagem, ao invés de tratamento e eliminação. Porém, a química verde entrou em pleno desenvolvimento em 1998, quando seus doze princípios norteadores foram introduzidos por Paul Anastas e John Warner (TÖRÖK; DRANSFIELD, 2017), e que são os seguintes: 1. Prevenção; 2. Economia de átomos; 3. Síntese de produtos menos perigosos; 4. Planejamento de produtos seguros; 5. Solventes e auxiliares mais seguros; 6. Busca pela eficiência de energia; 7. Uso de fontes renováveis de matéria-prima; 8. Evitar formação de derivados; 9. Catálise; 10. Planejamento para a degradação; 11. Análise em tempo real para a prevenção da poluição; 12. Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes. Como sua abordagem é atingir a sustentabilidade a um nível molecular, seus conceitos e princípios podem ser aplicados a todos os setores industriais e acadêmicos (ANASTAS; EGHBALI, 2010; ESPINO et al., 2016; KOEL, 2016; SUTTON et al., 2018).

Os solventes representam um desafio na área da Química Verde, sendo, talvez, a parte mais ativa neste campo (ANASTAS; EGHBALI, 2010). Grandes quantidades de solventes orgânicos são empregadas nas reações químicas, além de que muitas extrações, purificações e processos de limpeza são altamente dependentes de solventes, sendo necessária grande quantidade deste reagente para atingir um grau de pureza suficiente do produto final. O consumo excessivo de solventes tóxicos e não-renováveis é prejudicial do ponto de vista ambiental e é um exemplo de prática não-sustentável (CLARKE et al., 2018). Portanto, foram criados guias de seleção de solventes verdes, de modo que pudessem orientar o desenvolvimento de novos produtos e processos utilizando solventes menos danosos (PRAT et al., 2015; TOBISZEWSKI; NAMIEŚNIKA; PENA-PEREIRA, 2017). Dentre os solventes tradicionais considerados mais adequados para uma química verde estão: água, etanol, acetato de etila, acetona, dentre alguns outros que podem ser selecionados de acordo com as características físico-químicas desejadas (PRAT; HAYLER; WELLS, 2014). Já entre os mais apolares, recomendados para a substituição total ou parcial de hexano, organoclorados e outros nocivos, estão acetato de butila, anisol anidro, carbonato de dimetila, (s) ou (r)-limoneno, lactato de etila, éter metílico *terc*-amílico, dentre outros (CHEMAT; VIAN; CRAVOTTO,

2012; PRAT et al., 2015; SHEN; CHEN; VAN BEEK, 2015; TOBISZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2017).

A economia circular é a visão de uma sociedade sustentável, que demanda maior responsabilidade pela produção sustentável da biomassa e a recuperação de valor a partir de produtos no final de seu ciclo de vida. Mesmo que seu principal foco tenha permanecido no meio-ambiente, a Química Verde se aproxima cada vez mais dos pilares do tripé da sustentabilidade, representando uma excelente ferramenta para as indústrias químicas para a implementação do sistema de química sustentável e para a transição em direção à sustentabilidade e à economia circular. Desta forma, a Química Verde deixa de ser orientada apenas para a sustentabilidade ambiental e passa a englobar dimensões sociais e econômicas (SILVESTRI et al., 2021). Além disso, a prática dos princípios da Química Verde pode representar um indicador de performance chave para que os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável, um conjunto de 17 objetivos propostos pela ONU em 2015, sejam alcançados. Chen et al. (2020) destacam que, para que a prática dos 12 princípios da Química Verde seja inserida em uma economia circular, são necessárias estratégias que integrem a colaboração entre diversos setores, o desenvolvimento de tecnologias de produção mais limpas, o estabelecimento de gestão integrada de substâncias químicas, a implementação de educação em química verde e a construção de um modelo de negócio e cadeia de suprimentos (CHEN et al., 2020).

## **2.2 Química Analítica Verde**

A Química Analítica pode ser definida como o meio de obtenção de informação química sobre a natureza, quantidade e identidade dos elementos e moléculas no ambiente. Seu objetivo como ciência é o de desenvolver métodos e processos que forneçam a informação desejada sobre a amostra, com níveis analíticos de sensibilidade, seletividade e precisão necessários. A relação entre a Química Analítica com a Química Verde é especialmente estreita, pois é a química analítica que fornece os meios e ferramentas que avaliam e possibilitam a química verde, além disto, a Química Analítica Verde, descrita pela primeira vez por Namiesnik em 1993, pode ser utilizada para determinar o quão “verde” é um produto químico ou tecnologia.

De acordo com L.H. Lawrence, a química analítica verde pode ser definida como o uso de técnicas de química analítica e metodologias que reduzem ou eliminam solventes, reagentes, conservantes e outras substâncias químicas que são tóxicas à saúde humana e ao ambiente, e que possam tornar as análises mais rápidas e eficientes do ponto de vista energético, sem

comprometer os critérios de performance. Portanto, a química analítica verde não deve ser vista como um obstáculo para o progresso no desenvolvimento de metodologias, mas sim como um estimulante para o progresso da química analítica (DE LA GUARDIA; GARRIGUES, 2012).

No entanto, atualmente reconhece-se que a Química Analítica Verde, por si só, deve ser um alvo dos princípios “verdes”. Desta forma, Galuszka et al. (2013) formularam os doze princípios da química analítica verde, adaptados dos princípios estabelecidos por Anastas e Warner, e que podem fornecer diretrizes para tornar os processos analíticos mais sustentáveis, que são os seguintes: 1. Uso de técnicas analíticas diretas; 2. Número reduzido de amostras, que por sua vez, possuam tamanho mínimo; 3. Medições *in situ*; 4. Integração entre processos analíticos e operações, visando menor uso de energia e reagentes; 5. Métodos miniaturizados e automatizados; 6. Evitar derivatização; 7. Evitar geração de resíduos; 8. A escolha por métodos multi-analitos e multi-parâmetros é aconselhada; 9. O uso de energia deve ser minimizado; 10. Uso de reagentes obtidos de fontes renováveis; 11. Reagentes tóxicos devem ser removidos ou substituídos; 12. A segurança do operador deve ser aumentada.

A preparação da amostra é uma das etapas da extração que mais apresenta a possibilidade da aplicação de conceitos da Química Analítica Verde. Esta fase é comumente desafiadora e crítica para qualquer procedimento analítico e basicamente consiste na separação do analito de interesse da matriz, removendo impurezas e possibilitando para a concentração do analito antes da análise instrumental. Além disso, a preparação da amostra é baseada em técnicas de extração que podem envolver múltiplos passos, o que deixa o procedimento suscetível a erros sistemáticos. Técnicas de preparação de amostra como extração líquido-líquido, que são empregadas em diversos procedimentos experimentais, possuem limitações como o uso de solventes tóxicos e a geração de resíduos (SMITH, 2003; ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2015; CARASEK et al., 2021).

Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência é uma das técnicas mais utilizadas em laboratórios químicos no mundo todo. Os métodos cromatográficos podem causar impactos significativos no ambiente, caso as práticas laboratoriais não estejam alinhadas aos princípios da Química Analítica Verde. Na maioria dos casos, as análises por HPLC são realizadas utilizando-se, como fase estacionária, uma coluna de 25 cm de comprimento e diâmetro interno de 4,6 mm, com fluxo de fase móvel entre 1 e 1,5 mL/min. Nestas condições, cada instrumento irá produzir até 2 L de resíduo diariamente. Considerando que cerca de 200.000 instrumentos

estão em atividade, estima-se que a quantidade de resíduo químico, gerada a cada ano no mundo, possa alcançar até 52.000.000 L (KORANY et al., 2017, SUTTON et al., 2018).

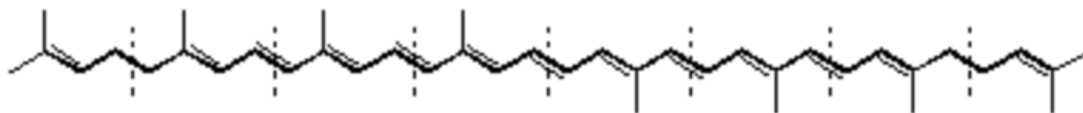
As técnicas cromatográficas são passíveis de serem mais verdes em todas as etapas da análise, desde a coleta e preparação da amostra até a determinação final. Três conceitos básicos, derivados dos doze princípios da Química Analítica Verde, são mais aplicados no âmbito da cromatografia verde: reduzir, substituir e reciclar. Para a cromatografia líquida especificamente, o foco deve ser na redução do consumo de solventes e na substituição de solventes ambientalmente perigosos por alternativas mais benignas. Para obter separações bem-sucedidas com o uso da cromatografia líquida, a combinação de diversos parâmetros relacionados a operação precisam ser ajustados, como o comprimento e tamanho interno da coluna, o tipo, vazão e o gradiente da fase móvel, a temperatura, o tamanho da amostra e a pressão das bombas (PŁOTKA-WASYLKA et al., 2020).

Muitas das pesquisas realizadas são focadas na redução da quantidade de solvente utilizada e, conseqüentemente, na redução de resíduo gerado, e na substituição de solventes tóxicos por solventes menos tóxicos. A redução de solvente utilizado pode ser alcançada através do uso de colunas miniaturizadas. Ao se reduzir o tamanho das partículas internas da coluna, reduz-se também seu comprimento, o que torna as análises mais rápidas e, conseqüentemente, diminui a quantidade de fase móvel. No entanto, a redução do diâmetro das partículas leva a um aumento da pressão exercida sob ela. Para driblar este obstáculo, técnicas de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência são empregadas. Já a substituição de solvente pode ser feita com o auxílio dos guias de seleção de solventes verdes e através do uso de técnicas como a cromatografia com fluido supercrítico (KORANY et al., 2017).

### **2.3 Carotenoides**

Carotenoides ocorrem na natureza como pigmentos amarelos, laranjas ou vermelhos, também se destacam pela sua ampla distribuição, variedade estrutural e suas múltiplas funções. Os carotenoides encontrados em alimentos são, geralmente, C<sub>40</sub> tetraterpenos/tetraterpenoides, formados a partir de unidades isoprenoides C<sub>5</sub>, unidas “cabeça” a “cauda”, exceto no centro, onde “cauda” e “cauda” se ligam e revertem a ordem, resultando em uma molécula simétrica. O esqueleto linear e simétrico possui grupos metilados laterais separados por seis átomos de carbono no centro e por outros cinco átomos de carbono. Modificações podem ocorrer de diversas formas, incluindo ciclização, hidrogenação, dehidrogenação, migração de duplas ligações, entre outras. Carotenoides podem ser acíclicos, como o licopeno, ou possuir um anel

de seis átomos em uma ou em ambas as extremidades da molécula, como o  $\beta$ -caroteno. Carotenoides hidrocarbonetos, como o  $\beta$ -caroteno e licopeno, são conhecidos como carotenos, e os derivados oxigenados são chamados de xantofilas. Os grupos que contêm oxigênio mais comuns são hidroxilas, substituintes queto, epóxi e aldeídos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2015).



**Figura 1:** Estrutura geral dos carotenoides (IUPAC, 1971)

A característica estrutural mais notável é um longo sistema de ligações duplas e simples que se alternam, localizada no centro da molécula. Esse sistema de ligações duplas conjugadas constitui o cromóforo, que confere aos carotenoides sua cor característica e dá o espectro de absorção que serve como base para sua identificação e quantificação. Para que o carotenoide tenha cor perceptível, é necessário no mínimo 7 ligações duplas conjugadas, como no  $\zeta$ -caroteno, de coloração amarelo clara. Fitoeno (3 ligações duplas conjugadas) e fitoflueno (5 ligações duplas conjugadas) não possuem coloração. O licopeno, com 11 ligações duplas conjugadas em uma estrutura acíclica, é vermelho. A ciclização também altera a coloração destes compostos, o  $\gamma$ -caroteno monocíclico e o  $\beta$ -caroteno bicíclico, embora possuam o mesmo número de ligações duplas conjugadas que o licopeno, são laranja-vermelho e laranja-amarelo, respectivamente. Os substituintes hidroxil não afetam o cromóforo, desta forma, o  $\alpha$ -caroteno e seu derivado dihidroxilado, a luteína, são amarelos. Da mesma maneira, o  $\beta$ -caroteno e seus derivados  $\beta$ -criptoxantina e zeaxantina possuem a mesma coloração. No entanto, esse sistema de ligações duplas também leva a molécula a ser suscetível à isomerização geométrica e degradação oxidativa. As características estruturais responsáveis pelas variações nas propriedades e atividades biológicas dos carotenoides são tamanho e rigidez da molécula, tamanho do sistema de ligações duplas conjugadas, grupos radicais cíclicos ou acíclicos e presença de substituintes polares (RODRIGUEZ-AMAYA, 2015).

O  $\beta$ -caroteno é o carotenoide mais distribuído, encontrado em praticamente todos os alimentos analisados, podendo ser um pigmento minoritário ou um dos principais. Já o bicíclico  $\alpha$ -caroteno e o monocíclico  $\gamma$ -caroteno são geralmente encontrados em menores concentrações, podendo acompanhar o  $\beta$ -caroteno. Em contraste com a relativa abundância de seus carotenos originários, com o  $\beta$ -caroteno sendo predominante em relação ao  $\alpha$ -caroteno.

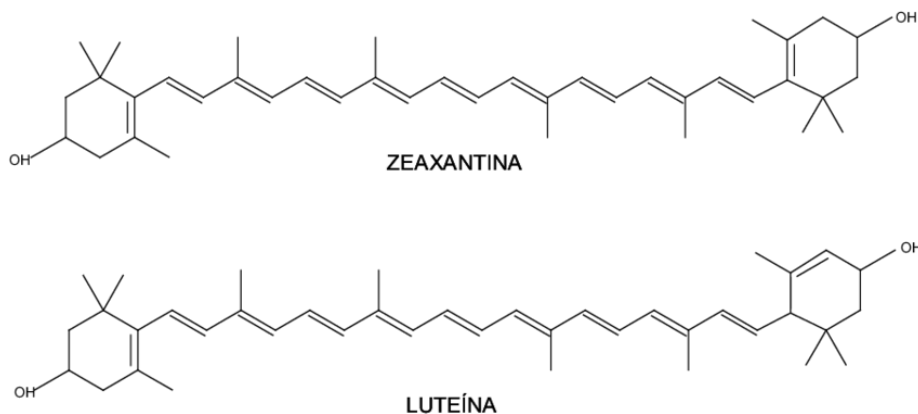
De modo geral, carotenoides são extraídos com solventes orgânicos como acetona, clorofórmio, hexano, isopropanol, metanol, diclorometano e dietil éter, sendo que a combinação de solventes também pode ser utilizada. Para escolha do solvente mais adequado deve-se levar em consideração o grupo funcional, que interfere na polaridade, o tamanho da cadeia do carotenoide, a matriz e o seus componentes e teor de umidade. Normalmente, solventes apolares, como hexano, éter ou tetrahidrofurano (THF) são os mais adequados para os carotenos ou xantofilas esterificadas, enquanto que solventes polares como acetona, etanol e acetato de etila são mais apropriados para a extração de carotenoides polares. Para a extração simultânea de carotenoides polares e apolares, misturas de acetona, etanol e hexano são as mais comuns. Tanto a acetona quanto o etanol, por serem miscíveis em água, são mais indicados para a extração de carotenoides de materiais vegetais que contenham alto teor de umidade. (SAINI; KEUM, 2018)

A maioria destes solventes apresenta riscos ambientais, à saúde e à segurança, desta forma, tanto o etanol quanto a acetona são os mais recomendados, em detrimento ao clorofórmio, hexano, dietil éter e diclorometano, que são comumente usados para a extração de carotenoides. Já os métodos utilizados para a extração podem ser classificados em cinco categorias principais: i) extração líquida à pressão atmosférica, como Soxhlet, maceração, extração assistida por micro-ondas ou por ultrassom, ii) extração por solvente acelerada, também conhecida por extração líquida pressurizada, iii) extração assistida por campo pulsoelétrico, iv) extração por fluido supercrítico, que geralmente emprega CO<sub>2</sub> supercrítico como solvente e com o uso mínimo de co-solvente orgânico, e v) extração enzimática (ALFONSI et al., 2008; CAPELLO; FISCHER; HUNGERBÜHLER, 2007; SAINI; KEUM, 2018).

#### **2.4 Zeaxantina e luteína**

Mais de 600 tipos de carotenoides ocorrem na natureza, dos quais 10 % fazem parte da dieta humana comum. Entretanto, somente uma proporção pequena destes compostos é detectada no sêrum humano. Cerca de 20 tipos de carotenoides foram identificados em plasma ou sêrum humano. Tanto na dieta quanto em sangue, os carotenoides apolares, os carotenos, são os mais abundantes. Contudo, como resultado de seleção e acumulação, somente dois carotenoides são encontrados na retina e cristalino, a zeaxantina e luteína, em concentrações bem maiores em relação a outros tecidos humano (MAOKA, 2020; MROWICKA et al., 2022). A pigmentação amarela da fóvea dá origem ao termo anatômico “mácula lútea”, do latim “ponto amarelo”. Foi observado que o espectro de absorção dos pigmentos desta região era similar ao

das xantofilas, e posteriormente estes pigmentos foram quimicamente identificados como luteína, zeaxantina e meso-zeaxantina, que acredita-se ser formada na mácula após transformações metabólicas (BERNSTEIN et al., 2016; BONE et al., 1988, 1993; NUSSBAUM; PRUETT; DELORI, 1981; WALD, 1945).



**Figura 2:** Estrutura química dos compostos zeaxantina e luteína (SILVA et al., 2010).

Xantofilas são carotenoides oxigenados derivados de alfa ou beta caroteno. Estes compostos estão entre os principais carotenoides nos tecidos fotossintéticos. A formação das xantofilas requer reações de hidroxilação específicas. No caso do beta-caroteno, duas hidroxilações sequenciais dos anéis beta produzem primeiramente a beta-criptoxantina e depois zeaxantina. Esta reação é normalmente catalisada por enzimas caroteno-bidroxilase do tipo non-heme di-iron (BCH). Enquanto as enzimas BCH também podem participar na biossíntese de luteína a partir do alfa-caroteno, a hidroxilação do anel beta do alfa-caroteno para produzir zeinoxantina é geralmente catalisada por CYP97A, uma enzima heme P450 contendo citocromo (RODRIGUEZ-CONCEPCION et al., 2018).

Uma enzima semelhante, CYP97C, atua como uma  $\epsilon$ -hidroxilase do caroteno para transformar a zeinoxantina em luteína. Alternativamente, o CYP97C pode primeiro hidroxilar o anel  $\epsilon$  do  $\alpha$ -caroteno para produzir  $\alpha$ -criptoxantina e depois o CYP97A pode hidroxilar o anel  $\beta$  da  $\alpha$ -criptoxantina para produzir luteína. A zeaxantina epoxidase (ZEP) introduz grupos epóxi nos anéis da zeaxantina, resultando na formação sequencial de anteraxantina e violaxantina. Essas reações podem ser revertidas pela violaxantina deepoxidase (VDE). A interconversão de zeaxantina e violaxantina é conhecida como ciclo VAZ. Em plantas com o ciclo LxL, a luteína pode ser convertida em epóxido de luteína (e vice-versa) por enzimas ZEP e VDE específicas. A introdução de uma ligação dupla alénica na molécula de violaxantina produz neoxantina num passo catalisado pela neoxantina sintase (NSY) (RODRIGUEZ-CONCEPCION et al, 2018).

A identidade da enzima e o mecanismo de ação, entretanto, permanecem obscuros. Na maioria das frutas e flores, bem como em muitas sementes e alguns tubérculos, as xantofilas são mono ou diesterificadas com diferentes ácidos graxos. Esta modificação aumenta sua lipofilicidade e estabilidade. O aumento da lipofilicidade conferida pelas cadeias acila pode favorecer seu sequestro no núcleo hidrofóbico dos plastoglóbulos, estruturas de lipoproteínas associadas aos tilacóides envolvidas por uma monocamada lipídica que são um local importante para o armazenamento maciço de carotenóides esterificados. Uma proteína relacionada à esterase, conhecida como PYP (Pale Yellow Petal), foi identificada como a enzima responsável pela esterificação da xantofila em flores de tomate. A co-localização de enzimas biossintéticas de xantofila e PYP em plastoglóbulos pode permitir um processo de esterificação eficiente. Atualmente, muito pouco se sabe sobre o papel regulador das xantofila- aciltransferases na acumulação de carotenóides. Alguns experimentos mostraram que as xantofilas aciltransferases são muito seletivas para a porção acil e apresentam uma regiosseletividade acentuada quando xantofilas assimétricas, como a luteína, são esterificadas. As moléculas doadoras de acil envolvidas no processo de esterificação da xantofila permanecem não identificadas (RODRIGUEZ-CONCEPCION et al, 2018).

A luteína (derivado deidroxilado do  $\alpha$ -caroteno) é comumente encontrada nos tecidos vegetais em maiores concentrações que a zeaxantina (derivado deidroxilado do  $\beta$ -caroteno). A luteína é o carotenoide predominantes em flores comestíveis, folhas e outros vegetais verdes. Já a zeaxantina é considerada um carotenoide minoritário nos alimentos, pois a biossíntese geralmente é finalizada no seu precursor, o  $\beta$ -caroteno, exceto nos casos do milho amarelo e nas frutas *Cariocar villosium* e *Lycium barbarium* (PENG et al., 2005), nos quais é um pigmento majoritário. Além disso, a zeaxantina é facilmente transformada em violaxantina. Já a luteína sofre pouca epoxidação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2015). A concentração de luteína em fontes naturais depende do nível de maturidade, técnica de processamento e tempo de estocagem do material. Em vegetais de cor verde escura, apenas traços de zeaxantina foram encontrados (SOMMERBURG et al., 1998; CALVO, 2005; ZAFAR et al., 2021).

Portanto, tanto a zeaxantina quanto a luteína são extremamente benéficas para a saúde humana, pois auxiliam na manutenção da boa saúde dos olhos. Estes compostos têm sido associados à redução do desenvolvimento de catarata e da degeneração macular associada à idade, visto que a presença dos produtos de oxidação tanto da luteína quanto zeaxantina na mácula sugere que estes compostos possuem atividade antioxidante (KHACHIK et al., 2002; KHACHIK; BERNSTEIN; GARLAND, 1997). Outro mecanismo de proteção oferecido por

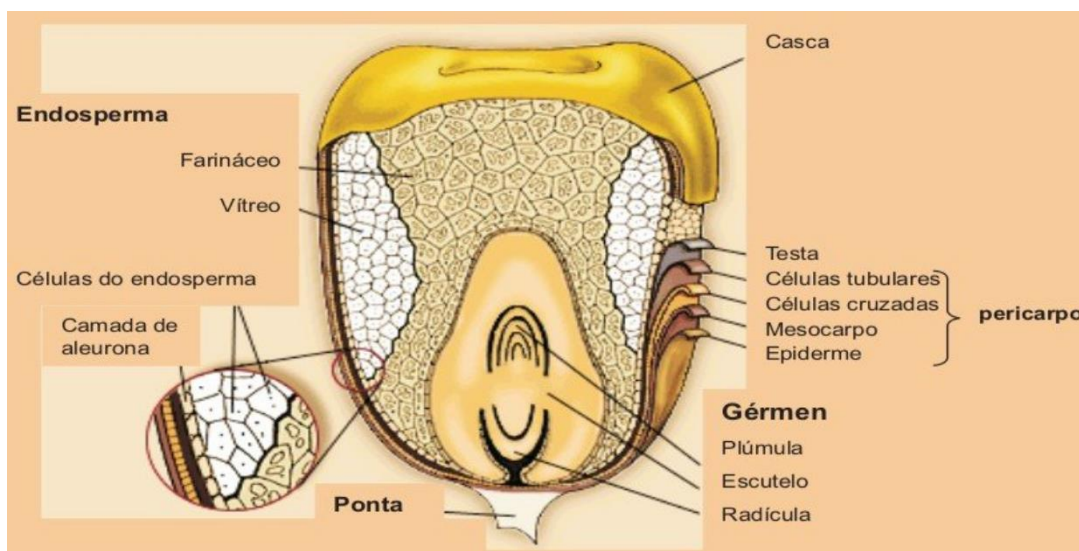
estas xantofilas é a filtragem de luz azul, que pode causar maiores danos aos nervos óticos (JUNGHANS; SIES; STAHL, 2001). De forma geral, entre adultos saudáveis, a ingestão de zeaxantina e luteína, especialmente a partir de doses acima de 10 mg por dia, aumente a densidade óptica do pigmento macular (WILSON et al., 2021). Desta forma, observa-se um aumento na comercialização e consumo destes pigmentos, frequentemente referidos como “pigmentos maculares, em forma de suplementos, facilmente encontrados em farmácias, e como ingrediente em alimentos e bebidas. O milho é uma das únicas fontes de ambas as substâncias simultaneamente (PISANELLI; OLIVEIRA, 2006).

Além de atuar na proteção dos olhos, a luteína e a zeaxantina possuem outras atividades benéficas para a saúde humana (LI et al., 2021). Devido às suas propriedades antioxidantes, estes carotenoides inibem a peroxidação da membrana lipídica e protegem de raios UV. Sua capacidade de absorver a luz azul também os torna aliados na manutenção de uma pele mais saudável (MUZUMDAR; FERENCZI, 2021). Estas propriedades antioxidantes também contribuem para a diminuição de riscos de osteoporose (CAO et al., 2018; KAN et al., 2022). Apesar de mais estudos serem necessários, há evidências que sugerem que a zeaxantina e luteína também possam contribuir para a saúde cardiovascular, devido à atenuação do estresse oxidativo e minimizando a resposta anti-inflamatória (YAO, 2021). A zeaxantina e luteína também são os carotenoides predominantes no cérebro adulto humano e podem contribuir para a manutenção da memória na população mais idosa (ZUNIGA; BISHOP; TURNER, 2021).

## **2.5 O Milho e seus metabólitos**

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas agrícolas mundiais, sendo a única cultura do mundo a ultrapassar 1 bilhão de toneladas de grãos, e é cultivado em praticamente todos os países. Em 2020, a área plantada mundial para a cultura de milho foi de 18.253.766 hectares, com produção total de 103.963.620 toneladas deste grão (FAOSTAT, 2022). De acordo com o Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), da Esalq/USP, apesar do recuo do PIB no primeiro trimestre de 2022, a queda não foi mais acentuada devido à estimativa de crescimento do faturamento agrícola no ano, reflexo da expansão esperada das safras, especialmente de milho e café, destacando a importância da cultura de milho para o país (CEPEA, 2022).

O milho produzido no país atualmente destina-se, principalmente, à ração animal, mas também é transformado em óleo, farinha, amido, margarina, xarope de glicose e flocos para cereais matinais (GARCIA et al., 2006).



**Figura 3:** Estrutura do grão de milho (PAES, 2006).

O grão de milho é formado por quatro estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta. Além do amido, que representa 72 % da composição média do grão em base seca, o endosperma apresenta em sua composição os carotenoides zeaxantina, luteína, betacriptoxantina, alfa e beta carotenos, dentre outros. O gérmen abriga quantidades consideráveis de proteínas e açúcares, 3 e 8% do peso do grão, respectivamente (Figura 3). Além dos carotenoides, os grãos apresentam outras variedades de metabólitos especializados, como ácidos fenólicos e flavonoides (JOHNSON; WALLACE, 2019). Entre os ácidos fenólicos observados, os principais foram ácido p-cumarico e ácido ferulico. Foi analisado também o óleo essencial das folhas de milho, cujo principal composto foi o fitol, que constituiu de 38,3 a 64,9 % da quantidade total de cada óleo essencial extraído de sete diferentes híbridos de milho (KONSTANTOPOULOU; KROKOS; MAZOMENOS, 2004)

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras de milho

Foram analisadas três marcas comerciais de grãos de milho adquiridos no mercado local (Botucatu, São Paulo, Brasil), uma amostra de grão da variedade BM888 cultivado na Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCA-UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil) e doze amostras de milho tradicional cultivado no município de Botucatu (Tabela 1).

**Tabela 1:** Lista de amostras e respectivos locais de origem.

Amostra	Origem	Código da amostra
Amostra comercial 1		1
Amostra comercial 2	Mercado local, Botucatu (São Paulo, Brasil)	2
Amostra comercial 3		3
Grão de milho variedade BM888 (FCA – UNESP)	Botucatu, São Paulo, Brasil (latitude 22°47'30", longitude 48°26'15")	4
Milho crioulo de grão roxo com casca roxa		5
Milho crioulo de grão amarelo (EPAGRI – SC)		6
Milho crioulo de grão avermelhado com casca amarela		7
Milho crioulo de grão rajado com casca amarela		8
Milho crioulo de grão rajado com casca vermelha		9
Milho crioulo de grão amarelo e preto com casca avermelhada	Botucatu, São Paulo, Brasil (latitude 22°47'30", longitude 48°26'15")	10
Milho crioulo de grão amarelo com casca vermelha		11
Milho crioulo de grão amarelo com casca amarela		12
Milho crioulo de grão amarelo com casca avermelhada		13
Milho crioulo de grão roxo com casca vermelha		14
Milho crioulo de grão vermelho com casca amarela		15
Milho crioulo de grão roxo (Ibitiboca – MG)		16

### 3.2 Padrões e solventes

Padrões de luteína e zeaxantina, o extrato padronizado “Mixed Vegetables” (de acordo com o fabricante, composto por 2,03% de ácido 5-metiltetrahidrofólico, 2,99% de folato, 11,89% de luteína, 2,92% de tiamina, 9,33% de  $\alpha$ -caroteno, 24,36% de  $\beta$ -caroteno, 9,99% de trans- $\alpha$ -caroteno, 2,55% de trans- $\beta$ -caroteno, 4,56% de vitamina B6 e 9,33% de zeaxantina), éter dietílico de grau analítico com 1 ppm de hidroxitolueno butilado (BHT) como inibidor, hexano, acetato de butila, carbonato de dimetila, lactato de etila, heptano, isopropanol e acetato de isopropila foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Acetona de grau

analítico, acetato de etila (EtOAc) e cloreto de sódio foram adquiridos da LS Chemicals (Ribeirão Preto, SP, Brasil). Acetonitrila grau HPLC-UV, diclorometano, metanol e etanol (EtOH) foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

### **3.3 Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada a um detector de rede de fotodiodos (UHPLC-PAD)**

As análises foram realizadas em um sistema UHPLC (Nexera UC, Shimadzu, Japão) (EMU FAPESP 2018/01786-1), composto por três bombas LC-30AD, unidade degaseificadora DGU-20A5R, autoinjeter SIL-30AC, forno de coluna CTO-20AC, um detector de rede de fotodiodo SPD-M20A, um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo simples (LCMS-2020, Shimadzu, Japão) com fonte de ionização do tipo ESI (LCMS-2020, Shimadzu, Japão) e um módulo de comunicação CBM-20A. Um pré-aquecedor de fase móvel de 1 $\mu$ L foi instalado antes da coluna cromatográfica. Os dados foram processados usando o software LabSolutions LCMS, versão 5.96 (Shimadzu, Japão).

#### **3.3.1 Transposição de método HPLC-PAD para UHPLC-PAD**

Dois métodos HPLC-PAD relatados na literatura para quantificar carotenoides foram transpostos para UHPLC-PAD para uma coluna C18, 150  $\times$  3,0 mm, 1,8  $\mu$ m (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA), com o auxílio do software HPLC Calculator 3.0 (Guillarme, Nguyen, Rudaz, & Veuthey, 2008). O primeiro método consistiu em uma fase móvel que emprega água (A) e acetonitrila:metanol (7:3, v/v) (B), no gradiente 80% B em 4,5 min, 80-100% B de 4,5 a 6,1 min, permanecendo em 100% B até 20,1 min a uma vazão de 0,77 mL/min (Rivera et al., 2013). O segundo método consistiu em uma fase móvel que emprega acetonitrila-diclorometano (95:5, v/v) em modo isocrático a uma vazão de 0,7 mL/min (Wang et al., 2019). O volume de injeção para ambos os métodos foi de 5  $\mu$ L e o comprimento de onda monitorado foi de 450 nm.

#### **3.3.2 Desenvolvimento de um novo método UHPLC-PAD**

O planejamento experimental do tipo Composto Central Rotacional (DCCR) foi empregado para otimizar as condições cromatográficas para a separação de zeaxantina e luteína do extrato padronizado “Mixed Vegetables” a 400 mg/mL. Todas as condições durante a otimização são apresentadas na seção 4.2. A condição otimizada final utilizou coluna C18 150  $\times$  3,0 mm, de 1,8  $\mu$ m (Zorbax Eclipse XDB C18, Agilent, EUA); temperatura do forno da

coluna de 35 °C; fase móvel composta por água (A) e EtOH (B), com gradiente de eluição de 80 a 100% de B em 20 min; fluxo de 0,45 mL/min.

### **3.4 Preparação da amostra**

Todas as amostras de grãos de milho foram moídas em moinho analítico (IKA® A11, Alemanha) e separadas em malha 14-32 mesh para extração (Bertel, Caierias, Brasil). Todos os extratos produzidos foram filtrados com um filtro de seringa de nylon de 0,22 µm (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra) antes da análise por UHPLC-PAD. Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

#### **3.4.1 Métodos de extração comparativos e de referência**

O método de extração AACC 14-50 foi empregado como referência usando as seguintes condições: 8 g de amostra foram extraídos em 40 mL de butanol saturado com água por 1 min em um agitador vortex (Heathrow Scientific®, EUA). O sistema foi então deixado em repouso por 18 horas no escuro (AACC International, 2009).

Além disso, três métodos descritos na literatura com o mesmo objetivo foram utilizados para comparação. Para um deles, 1,5 g da amostra foi extraído com 15 mL de solução de metanol-acetato de etila (6:4, v/v) a 60 °C por 20 minutos em agitador a 160 rpm (GYROMAX 737R, Amerex Instruments, Inc., EUA). A solução obtida foi resfriada, filtrada e colocada em um funil de separação com 15 mL de solução de hexano-éter dietílico (9:1, v/v) e 20 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Para eliminar potenciais compostos polares remanescentes na fase orgânica, após intensa agitação por 1 min, ela foi coletada e extraída com 20 mL de H<sub>2</sub>O. A fase orgânica foi concentrada em evaporador rotativo a 40 °C (Heidolph™ Hei-Vap Core, Schwabach, Alemanha) e ressolubilizada em 2,96 mL de metanol (Rivera et al., 2013). Em outro método, 1,0 g de amostra foi extraído com 7 mL de etanol 95% em banho de ultrassom (Embrasol Tec®, Brasil) a 55 °C por 45 min. A solução foi filtrada, um segundo ciclo de extração foi realizado e os extratos foram combinados (Wang et al., 2019). No terceiro método, 1,52 g de amostra foi extraído com 3 mL de etanol em um agitador vortex (Heathrow Scientific®, EUA) por 10 min. Em seguida, 3 mL de água e 3 mL de hexano foram adicionados ao sistema. O sistema foi centrifugado (Excelsa® i 2206, Fanem®, Brasil) por 5 min a 3600 rpm, e a fase superior foi coletada. A extração com hexano foi repetida 5 vezes. As fases superiores foram reunidas, concentradas em rota-evaporador a 30 °C e ressolubilizadas em 3 mL de metanol-diclorometano (1:1, v/v) (Fanning et al., 2010).

### **3.4.2. Desenvolvimento de um novo método de extração**

O planejamento fatorial fracionário (Tabela 3) e o planejamento composto central (Tabela 4) foram empregados para otimizar as condições de extração de zeaxantina e luteína em grãos de milho começando com a amostra 2 (Tabela 1). Todas as condições durante a otimização são apresentadas na seção 4.3. A condição otimizada final foi de 2 g de milho moído (14-32 mesh) extraído em 3,95 mL de etanol-água (78,6:21,4 v/v) por maceração dinâmica por 20 min a 500 rpm e 60 °C (Heidolph™ MR Hei-Tec, Schwabach, Alemanha).

### **3.5. Validação do novo método**

A validação do novo método analítico, desde a preparação da amostra até a análise por UHPLC-PAD, foi feita de acordo com “The International Guidelines for Analytical Techniques Validation” (ICH, 2005). Os seguintes parâmetros foram avaliados: linearidade, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), precisão instrumental, precisão intra e interdias, precisão intermediária e seletividade. Este último foi avaliado pela deconvolução dos picos de zeaxantina e luteína usando o software LabSolutions LCMS, versão 5.96 (Shimadzu, Japão). Além disso, a estabilidade dos extratos foi monitorada por 72 h injetando 3 extratos a cada 24 h e mantidos no escuro (as informações completas sobre os testes de precisão e estabilidade são fornecidas nas Tabelas 9 a 13).

### **3.6. Quantificação de zeaxantina e luteína em diferentes amostras de milho**

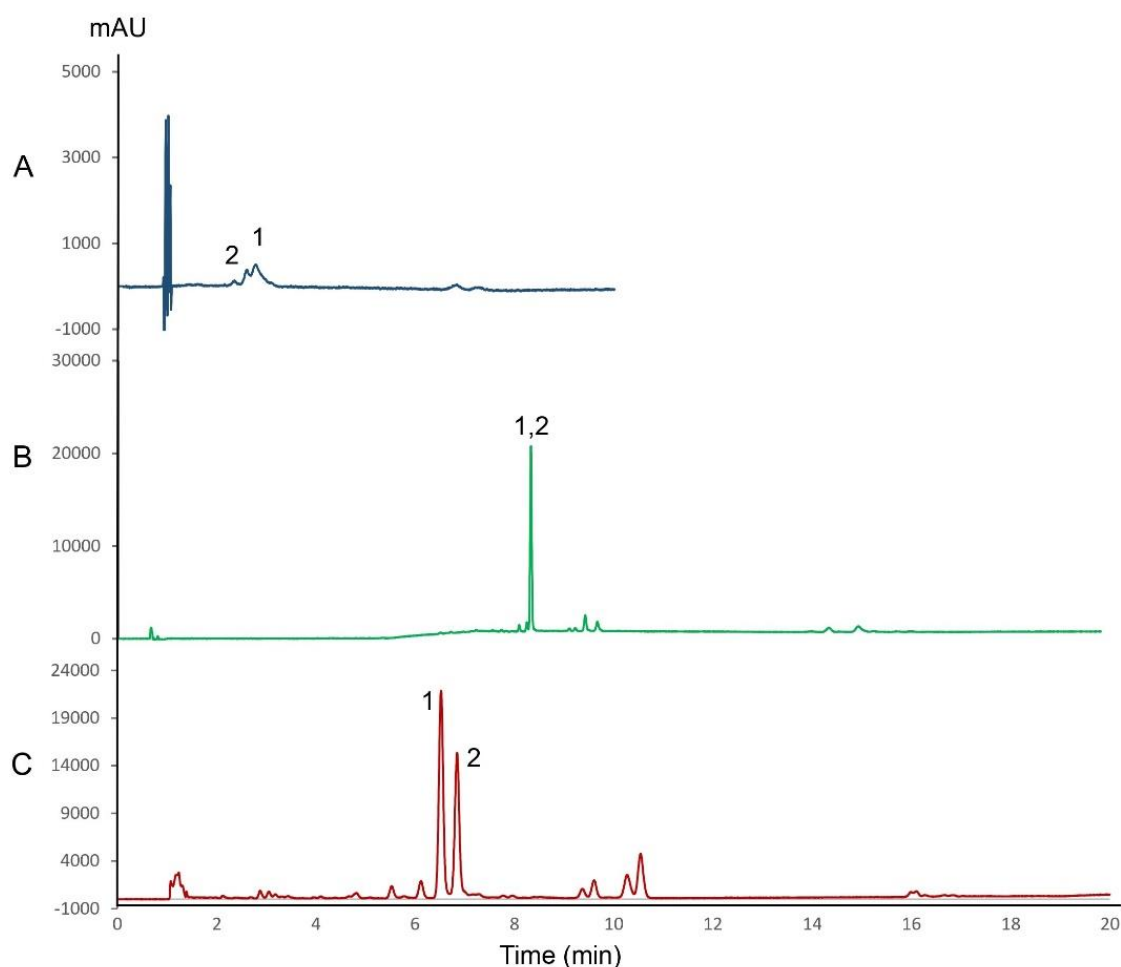
Curvas de calibração para zeaxantina ( $y = 35132x + 4636,8$ ;  $R^2 = 0,9908$ ) e luteína ( $y = 43300x - 199,24$ ;  $R^2 = 0,9978$ ) foram construídas em triplicata, através de diluições seriadas em balão volumétrico de 10 mL, usando pelo menos oito concentrações dos padrões versus a área do respectivo pico cromatográfico. O volume de injeção foi de 5 µL. Foram utilizados os softwares Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, WA, EUA) e Minitab 18 (Minitab, PA, EUA).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

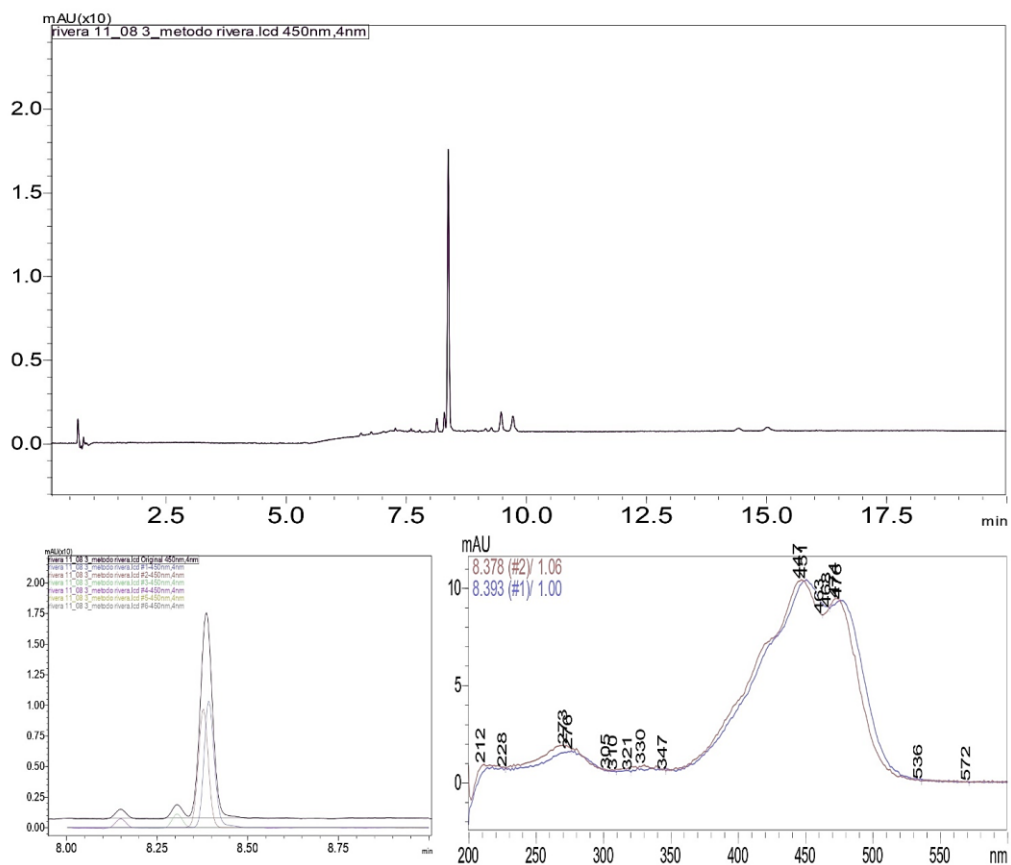
### **4.1 Transposição dos métodos HPLC-PAD comparativos para UHPLC-PAD**

Os cromatogramas da transposição de dois métodos HPLC-PAD para UHPLC-PAD, empregando o software HPLC Calculator versão 3.0 (Guillarme, Nguyen, Rudaz, & Veuthey, 2008) com a indicação dos picos correspondentes aos compostos zeaxantina (1) e luteína (2), são mostrados na Figura 4. Para o método transposto baseado em Wang et al. (2019), apenas a

separação parcial do pico pode ser observada em torno de 2,5 min (Fig. 4A). No entanto, para aquele transposto de Rivera et al. (2013), foi observado um pico mais intenso correspondente à coeluição dos compostos zeaxantina e luteína (Fig. 4B), confirmado pela deconvolução do pico em questão, pois apresentava espectros UV compatíveis com ambas as substâncias (Fig. 5). Como nenhum dos procedimentos de separação se mostrou adequado para quantificar os compostos alvo, em que uma resolução de, pelo menos, 1,5 é indicada (Snyder, Kirkland, & Dolan, 2009), um novo procedimento de separação foi desenvolvido usando UHPLC-PAD.



**Figura 4:** Cromatogramas UHPLC-PAD representativos a 450 nm de um extrato de grão de milho. (A) Wang et al. (2019) método transposto; (B) Rivera e cols. (2013) método transposto; (C) Método proposto. Coluna C18, 150 × 3,0 mm, 1,8 μm (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA). Fases móveis: Cromatograma A: acetonitrila-diclorometano (95:5, v/v); Cromatograma B: água (A) e acetonitrila-metanol (7:3, v/v) (B), no seguinte gradiente: 80% B (0–4,5 min), 80–100% B (4,5–6,1 min), 100% B (6,1–20,1 min); Cromatograma C: água (A) e etanol (B), no seguinte gradiente: 80–100% B (0–20 min). Vazões: em A: 0,7 mL/min; em B: 0,77 mL/min; em C: 0,45 mL/min. Volumes de injeção: 5 μL. Temperatura de análise: 35 °C. Compostos monitorados: (1) zeaxantina, (2) luteína.



**Figura 5:** Cromatograma representativo UHPLC-PAD a 450 nm da amostra 2 (Tabela 1). Coluna C18 150 x 3,0 mm, 1,8  $\mu$ m (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA). Fases m3veis: 3gua (A) e ACN:MeOH 7:3 (v/v) (B), no seguinte gradiente: 80-100% B (0-6,10 min), 100% B (6,10-20,10 min) ). Volume de inje3o: 5  $\mu$ L. Temperatura de an3lise: 35°C.

#### 4.2. Desenvolvimento de um novo m3todo UHPLC-PAD para separa3o de zeaxantina e lute3na

Para otimizar o procedimento de separa3o por UHPLC-PAD no modo de fase reversa, um planejamento Composto Central de tr3s fatores (vari3veis x) foi realizado. A influ3ncia das porcentagens de acetato de etila (EtOAc) (x1) e carbonato de dimetila (DMC) (x2) como modificador org3nico da fase m3vel (B) e o tempo de gradiente (x3) foi avaliada para obter uma resolu3o adequada para quantificar os compostos alvo zeaxantina e lute3na, bem como um m3todo compat3vel com a qu3mica verde de produtos naturais (Funari, Rinaldo, Bolzani, & Verpoorte, 2023). O solvente usado como base em B era EtOH. Esses tr3s solventes (ou seja, EtOH, EtOAc e DMC) s3o classificados como solventes recomendados no guia de sele3o de solvente CHEM21 (Prat et al., 2016) e podem ter seletividade diferente na busca pela separa3o de zeaxantina e lute3na (EtOH, EtOAc e DMC pertencem aos grupos II, Via e Vib no tri3ngulo de seletividade de Snyder) (Snyder, Kirkland & Dolan, 2009). O CHEM21 foi selecionado entre

os guias de seleção de solventes existentes porque classifica os solventes usando um conjunto de critérios de Segurança, Saúde e Meio Ambiente (SHE) alinhados com o Sistema Harmonizado Global (GHS). Além disso, porque é a característica menos verde de um solvente que define sua classificação final, não uma soma das pontuações SHE que poderia subestimar uma questão importante (Prat et al., 2016). Assim, considerou-se rigoroso o suficiente para atender ao propósito deste trabalho. Até onde sabemos, o DMC nunca foi testado como modificador orgânico em B por HPLC, mas poderia ser se sua solubilidade em água (13,9 g/100 mL) fosse respeitada (Funari et al., 2023). Como resposta, adotou-se a resolução entre os picos dos dois compostos de interesse (par crítico). Os experimentos e suas respectivas respostas são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Planejamento Composto Central Rotacional empregado para otimizar as condições cromatográficas para separação de zeaxantina e luteína

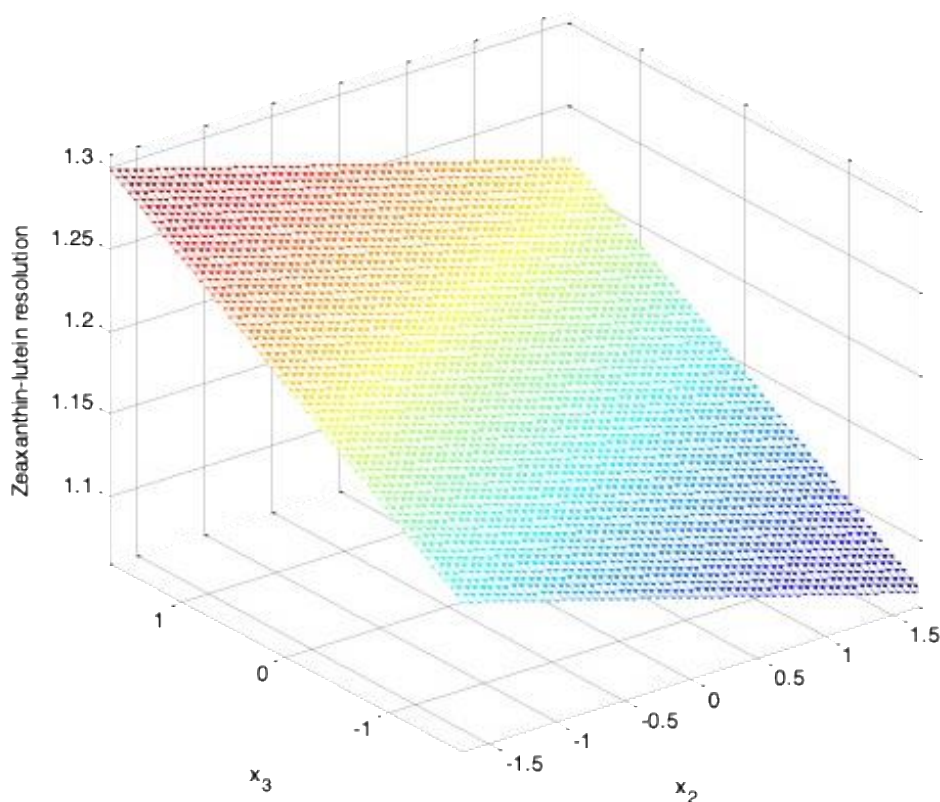
Experimento	Fatores			Resultados
	x1 (% EtOAc) <sup>a</sup>	x2 (% DMC)	x3 (tempo de gradiente, min)	y (resolução zeaxantina /luteína)
1	-1 (2)	-1 (2)	-1 (12)	1.163
2	1 (8)	-1 (2)	-1 (12)	1.155
3	-1 (2)	1 (8)	-1 (12)	1.123
4	1 (8)	1 (8)	-1 (12)	1.121
5	-1 (2)	-1 (2)	1 (18)	1.274
6	1 (8)	-1 (2)	1 (18)	1.241
7	-1 (2)	1 (8)	1 (18)	1.212
8	1 (8)	1 (8)	1 (18)	1.195
9	-1.67 (0)	0 (5)	0 (15)	1.178
10	1.67 (10)	0 (5)	0 (15)	1.154
11	0 (5)	-1.67 (0)	0 (15)	1.219
12	0 (5)	1.67 (10)	0 (15)	1.133
13	0 (5)	0 (5)	-1.67 (10)	1.098
14	0 (5)	0 (5)	1.67 (20)	1.237
PC1	0 (5)	0 (5)	0 (15)	1.191
PC2	0 (5)	0 (5)	0 (15)	1.196
PC3	0 (5)	0 (5)	0 (15)	1.205
PC4	0 (5)	0 (5)	0 (15)	1.205
PC5	0 (5)	0 (5)	0 (15)	1.188

<sup>a</sup> Percentagem de etanol = 100% - x1 - x2; Parâmetros fixados : temperatura (35 °C), comprimento de onda de detecção (450 nm), concentração da amostra (standardized extrato "Mixed Vegetables" 400 mg/mL, vazão (0.45 mL/min) and volume de injeção (5 µL).

A partir da execução desse planejamento Composto Central Rotacional, obteve-se o seguinte modelo matemático, com 95% de confiança para significância dos coeficientes de regressão e R<sup>2</sup> de 0,902:

$$y = 1,18358 - 0,02398 x_2 + 0,04361 x_3 \text{ (Equação 1)}$$

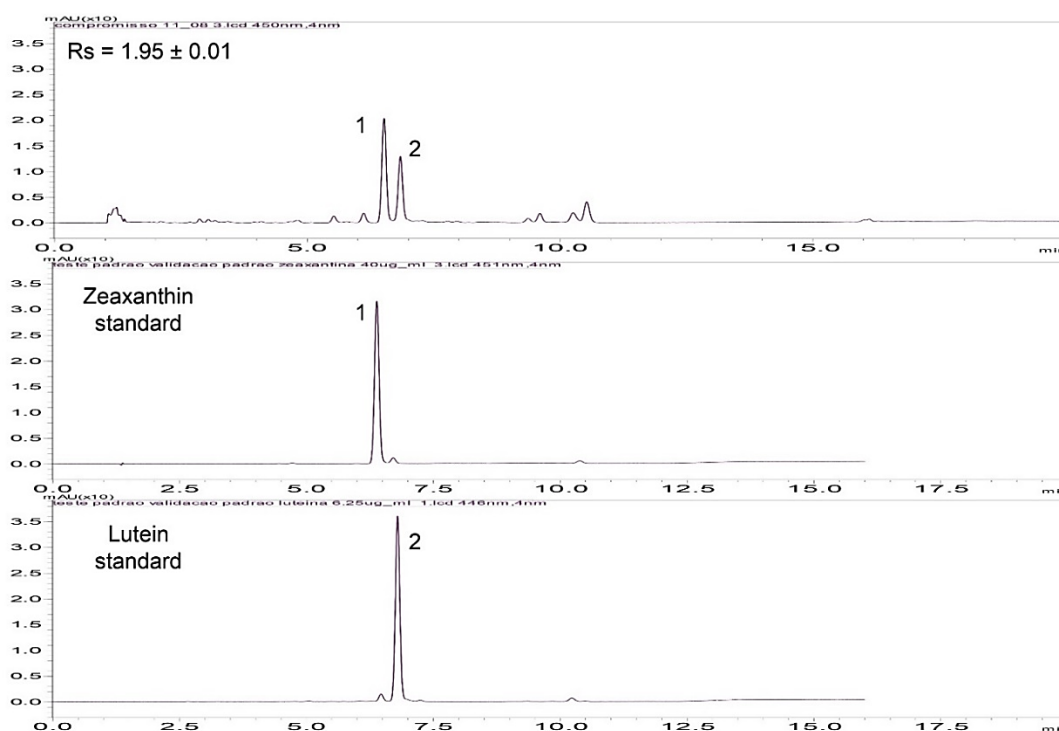
A partir da Equação 1, pode-se gerar a superfície de resposta para resolução em função da porcentagem de DMC e tempo de gradiente, conforme apresentado na Figura 6.



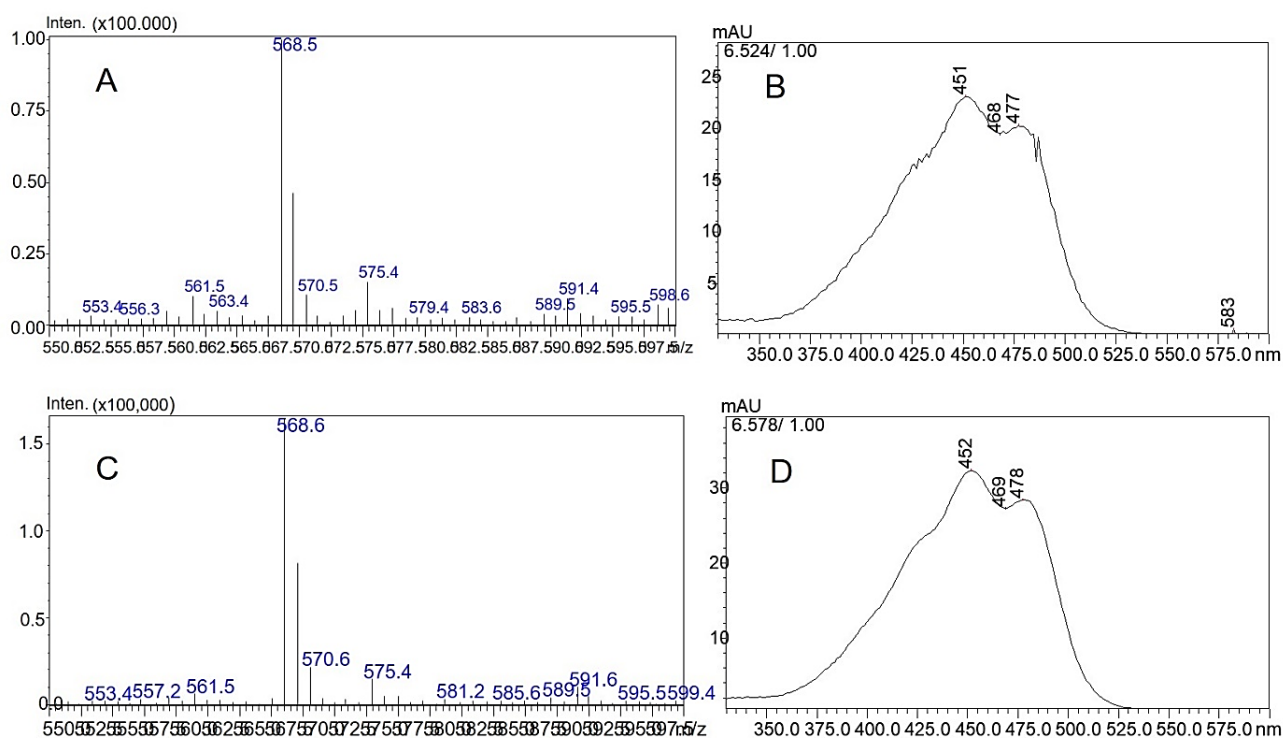
**Figura 6:** Superfície de resposta para otimização da resolução zeaxantina-luteína no método analítico. As variáveis x2 e x3 são a porcentagem de carbonato de dimetila e tempo de gradiente, respectivamente.

De acordo com o modelo com superfície de resposta mostrado na Fig. 6, para maximizar a resolução entre zeaxantina e luteína (y), a variável x2 deve ser usada no mínimo (0% DMC) e x3 no máximo (gradiente de 20 min). Este resultado é consistente com os experimentos 7, 8 e 5, que apresentam valores baixos para x2 e valores altos para x3 (Tabela 2). Como x1 (% EtOAc) não foi estatisticamente significativo, seu valor mínimo (0% EtOAc em B) foi mantido, ou seja, a fase móvel poderia ser composta apenas por água (A) e EtOH (B) sem aditivos. Essa

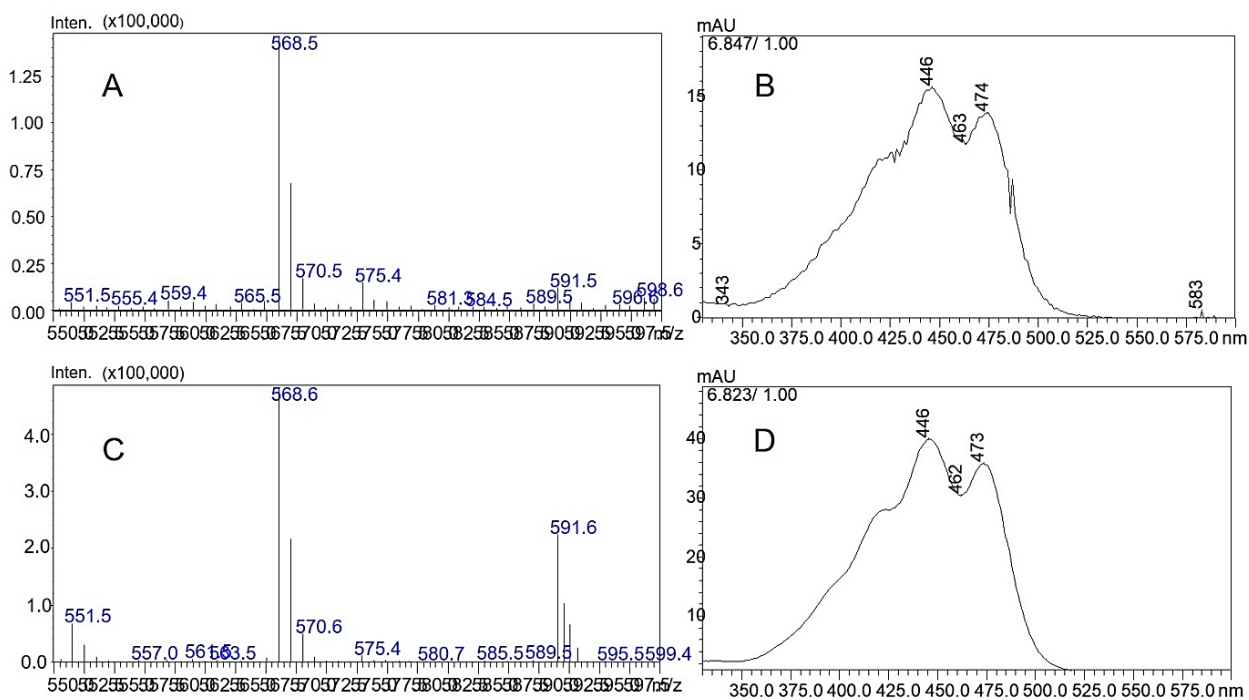
condição foi aplicada em triplicata, obtendo-se uma resolução de  $1,95 \pm 0,01$  entre zeaxantina e luteína, valor acima de 1,5 necessário para a quantificação adequada dos compostos. Finalmente, a identidade dos dois compostos dos picos monitorados foi confirmada pela injeção de padrões autenticados de zeaxantina e luteína, comparando seus tempos de retenção e espectros UV e MS com aqueles observados nas amostras de milho (Fig. 7-9). Além disso, a pureza desses picos nas amostras foi avaliada pela deconvolução dos picos correspondentes na amostra de milho, demonstrando que não houve coeluição de interferentes que poderia superestimar a quantificação de zeaxantina e luteína nas amostras de milho (Fig. 10). Um cromatograma representativo desta condição de separação otimizada pode ser visto na Figura 3C.



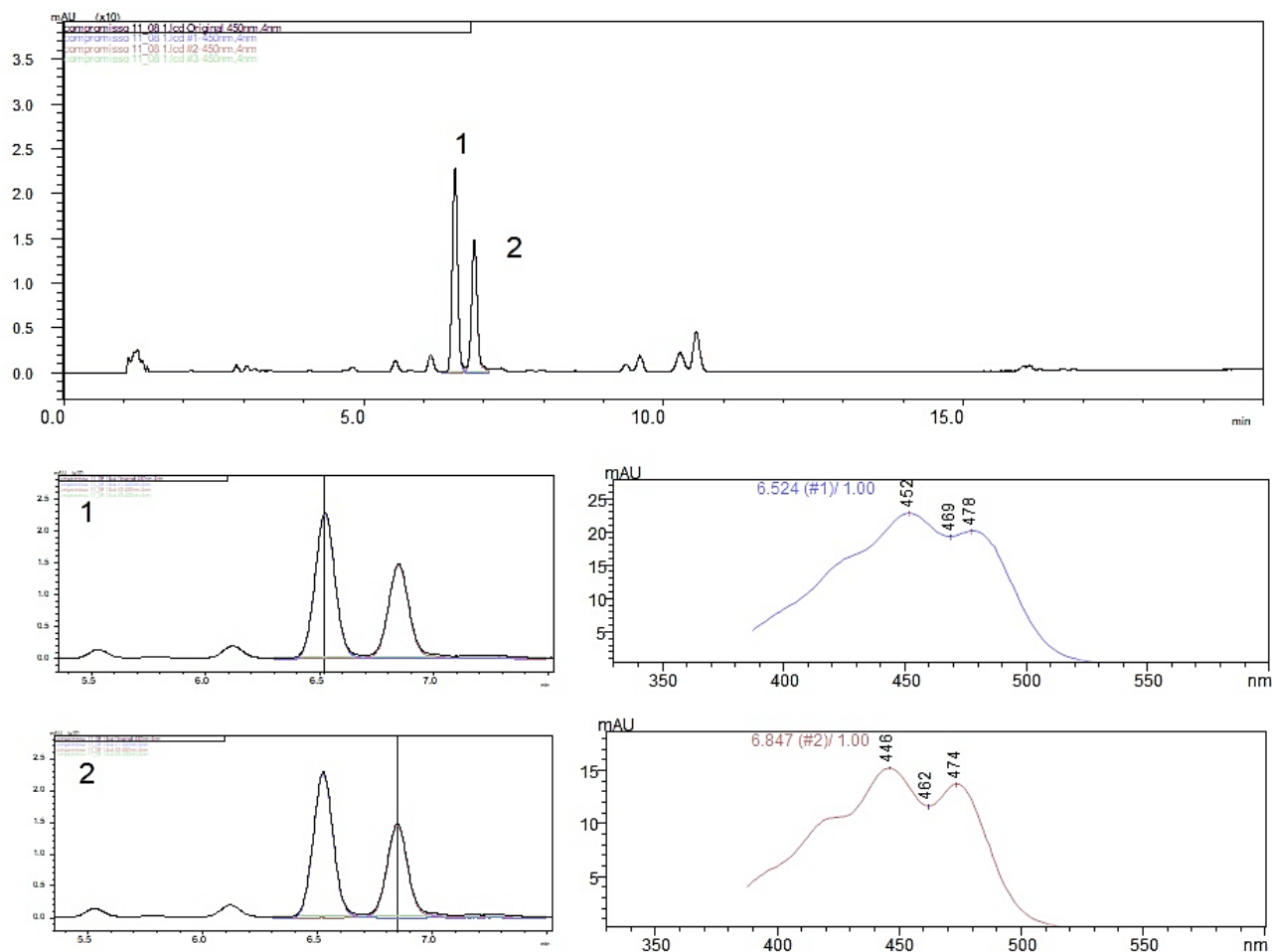
**Figura 7:** Comparação entre a amostra e os padrões de zeaxantina e luteína. (A) Cromatograma representativo UHPLC-PAD a 450 nm da amostra 2 (Tabela S1). (B) Cromatograma representativo UHPLC-PAD/UV a 451 nm de padrão de zeaxantina. (C) Cromatograma representativo UHPLC-PAD/UV a 446 nm de luteína padrão. Coluna C18 150 x 3,0 mm, 1,8  $\mu$ m (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA). Fases móveis: água (A) e etanol (B), no seguinte gradiente: 80-100% B (0-20, 30 min). Volume de injeção: 5  $\mu$ L. Temperatura de análise: 35°C.



**Figura 8:** (A) Espectro de massas e (B) Espectro de UV da zeaxantina na amostra 2 (Tabela 1). (C) Espectro de massas e (D) Espectros de UV do padrão analítico de zeaxantina.



**Figura 9:** (A) Espectro de massas e (B) Espectro de UV de luteína na amostra 2 (Tabela 1). (C) Espectro de massas e (D) Espectro de UV do padrão analítico de luteína.

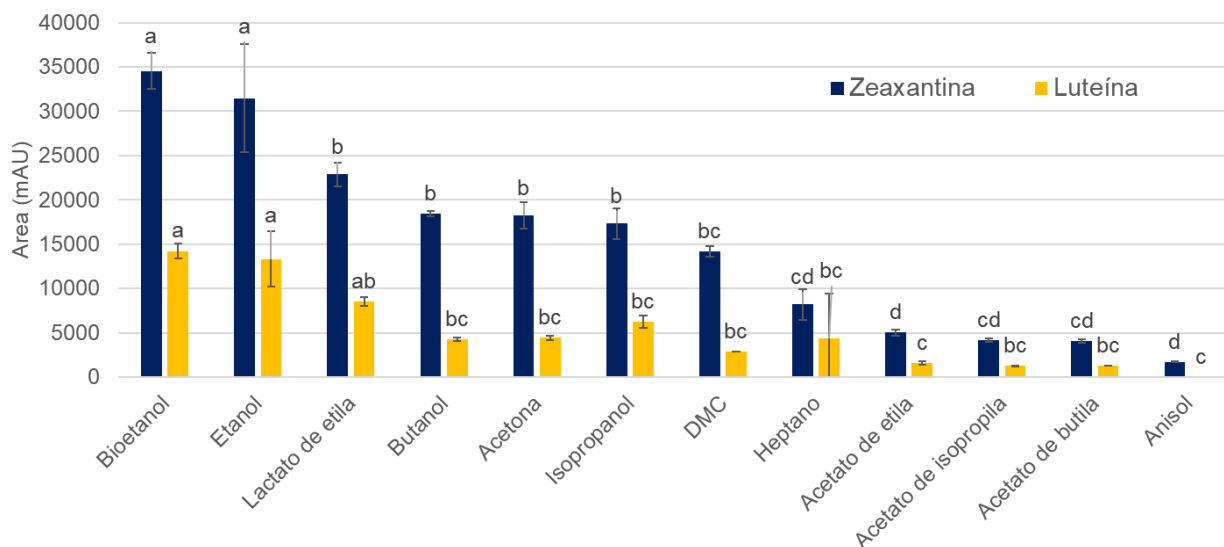


**Figura 10:** Cromatograma HPLC-PAD representativo de grão de milho (amostra 2, Tabela S1) o método desenvolvido neste trabalho (topo) seguido pelos picos deconvoluídos e espectros correspondentes: (1) zeaxantina e (2) luteína. Coluna C18 150 x 3,0 mm, 1,8  $\mu$ m (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA). Fases móveis: água (A) e etanol (B), no seguinte gradiente: 80-100% B (0-20, 30 min). Volume de injeção: 5  $\mu$ L. Temperatura de análise: 35°C.

### 4.3. Desenvolvimento de um novo procedimento para extração de zeaxantina e luteína

A primeira etapa no desenvolvimento de um processo de extração otimizado foi selecionar os solventes do guia CHEM21 (Prat et al., 2016). Doze solventes recomendados no guia foram selecionados com propriedades físico-químicas que pudessem facilitar a extração dos compostos alvo. As eficiências de extração foram monitoradas pelo método UHPLC-PAD previamente desenvolvido (subseção 3.3.2). Os resultados e as condições extrativas empregadas estão resumidos na Figura 10. O bioetanol grau alimentício 95% (obtido a partir do processo de fermentação da cana-de-açúcar) obteve a maior área média de pico para os compostos de interesse, seguido pelo etanol grau HPLC ( $\geq 99\%$ ). ANOVA com 95% de confiança, seguida de teste de Tukey, indicou a superioridade destes sobre os demais solventes; no entanto, a

superioridade do primeiro sobre o segundo não pôde ser confirmada nos experimentos realizados (Fig. 11).



**Figura 11:** Média das áreas dos picos de UHPLC-PAD a 450 nm de zeaxantina e luteína em grãos de milho (amostra 2) quando extraídos com diferentes solventes. Para cada composto, letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas entre os solventes de extração (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Extrações realizadas por maceração dinâmica, a 450 rpm, por 45 minutos, à temperatura de 30 °C, relação massa/solvente de 5 g:7,9 mL.

Como a maior diferença química entre o bioetanol e o etanol é o teor de água, levantou-se a hipótese de que um teor mais alto de água no EtOH poderia ter um impacto estatisticamente significativo na eficiência da extração. Assim, a porcentagem de água em EtOH foi selecionada como fator x1 na etapa de triagem de variáveis por planejamento fatorial fracionário (PFF) (Tabela 3). As outras variáveis incluídas no  $2^{5-1}$  PFF foram o tempo de extração (x2), temperatura (x3), proporção de massa de material vegetal para solvente (x4) e rotação (x5). Para eliminar conclusões errôneas devido a diferentes proporções massa/solvente, após as extrações e depois filtrações, os extratos obtidos nos níveis 0 e +1 de x4 foram diluídos com o mesmo solvente para que os resultados fossem comparáveis, eliminando o efeito da maior massa de material por volume de solvente.

**Tabela 3.** Planejamento Fatorial Fracionado 2<sup>5-1</sup> para otimizar as condições de extração de zeaxantina e luteína.

Experimento	Fatores					Resultados	
	x1 (% H <sub>2</sub> O em EtOH)	x2 (tempo de extração, min)	x3 (temperatura, °C)	x4 (massa material/ solvente, g/mL)	x5 (rotação , rpm, 5 = 1234)	Área corrigida pela massa de amostra	
						Zeaxantina	Luteína
1	-1 (0)	-1 (20)	-1 (30)	- 1 (3/7.9)	1 (1000)	20982	8932
2	1 (30)	-1 (20)	-1 (30)	- 1 (3/7.9)	- 1 (500)	26428	21082
3	-1 (0)	1 (60)	-1 (30)	- 1 (3/7.9)	- 1 (500)	23051	10240
4	1 (30)	1 (60)	-1 (30)	- 1 (3/7.9)	1 (1000)	42511	18809
5	-1 (0)	-1 (20)	1 (45)	- 1 (3/7.9)	- 1 (500)	29325	14137
6	1 (30)	-1 (20)	1 (45)	- 1 (3/7.9)	1 (1000)	95972	62605
7	-1 (0)	1 (60)	1 (45)	- 1 (3/7.9)	1 (1000)	45097	22282
8	1 (30)	1 (60)	1 (45)	- 1 (3/7.9)	- 1 (500)	106223	73977
9	-1 (0)	-1 (20)	-1 (30)	1 (5/7.9)	- 1 (500)	20110	8570
10	1 (30)	-1 (20)	-1 (30)	1 (5/7.9)	1 (1000)	36673	25553
11	-1 (0)	1 (60)	-1 (30)	1 (5/7.9)	1 (1000)	43247	29309
12	1 (30)	1 (60)	-1 (30)	1 (5/7.9)	- 1 (500)	23487	21487
13	-1 (0)	-1 (20)	1 (45)	1 (5/7.9)	1 (1000)	37868	19290
14	1 (30)	-1 (20)	1 (45)	1 (5/7.9)	- 1 (500)	61825	41883
15	-1 (0)	1 (60)	1 (45)	1 (5/7.9)	- 1 (500)	42612	21863
16	1 (30)	1 (60)	1 (45)	1 (5/7.9)	1 (1000)	65843	60900
PC1	0 (15)	0 (40)	0 (37.5)	0 (4/7.9)	0 (750)	130455	83886
PC2	0 (15)	0 (40)	0 (37.5)	0 (4/7.9)	0 (750)	129729	86925
PC3	0 (15)	0 (40)	0 (37.5)	0 (4/7.9)	0 (750)	147611	94242
PC4	0 (15)	0 (40)	0 (37.5)	0 (4/7.9)	0 (750)	139425	87748
PC5	0 (15)	0 (40)	0 (37.5)	0 (4/7.9)	0 (750)	135258	83860

Parâmetros fixados : faixa granulométrica (14-32 mesh), temperatura do forno da coluna (35°C), comprimento de onda de detecção (450 nm), vazão (0.45 mL/min) e volume de injeção (5 µL).

Conforme observado nos resultados do PFF, as melhores extrações foram aquelas no ponto central (Tabela 3). As variáveis x1 e x3 apresentaram os maiores efeitos entre as variáveis; no entanto, nenhuma variável foi significativa na faixa de valores testada. Para estudar ainda mais a influência das variáveis x1 e x3, um DCCR foi executado usando essas variáveis (Tabela 4).

**Tabela 4:** Planejamento Composto Central Rotacional para otimizar as condições de extração de zeaxantina e luteína.

Experimento	Factors		Results	
	x1 (% H <sub>2</sub> O in EtOH)	x3 (temperatura, °C)	Area Zeaxantina (y <sub>1</sub> )	Area Luteína (y <sub>2</sub> )
1	- 0.955 (4.5)	- 1 (34)	37705	18920
2	1 (26)	- 1 (34)	106286	67831
3	- 0.955 (4.5)	1 (56)	108607	69330
4	1 (26)	1 (56)	182426	125890
5	-1.364 (0)	0 (45)	49878	25714
6	1.410 (30.5)	0 (45)	134454	140
7	0 (15)	- 1.364 (30)	59682	33370
8	0 (15)	1.364 (60)	224408	147663
CP1	0 (15)	0 (45)	153084	101418
CP2	0 (15)	0 (45)	149288	96450
CP3	0 (15)	0 (45)	147987	96168
CP4	0 (15)	0 (45)	158631	103270
CP5	0 (15)	0 (45)	159679	102632

Parâmetros fixados : faixa granulométrica (14-32 mesh), temperatura do forno da coluna (35°C), comprimento de onda de detecção (450 nm), vazão (0.45 mL/min), volume de injeção (5 µL), rotação (500 rpm), tempo de extração (20 minutos), proporção material vegetal/volume de solvente (4g/7.9mL). A rotação, o tempo de extração e a proporção material vegetal/volume de solvente foram fixadas a partir do planejamento fatorial fracionado.

No início do planejamento do DCCR, foi obtido um modelo matemático para cada resposta monitorada (áreas de zeaxantina e luteína) (Equações 2 e 3):

$$y_1 = 148032,69 + 35038,85x_1 + 48145,14x_3 - 33632,91x_1^2 \quad R^2 = 0,947 \text{ (Equação 2)}$$

$$y_2 = 95786,75 + 26679,36,22x_1 + 34239,73x_3 - 21862,52x_1^2 \quad R^2 = 0,955 \text{ (Equação 3)}$$

A condição ótima para o composto de zeaxantina é 20,7% de água em etanol (x1) e 60 °C (x3), com uma área prevista de 222828. Por outro lado, a condição ideal para a luteína é 21,8% de água em etanol (x1) e 60 °C (x3), com uma área prevista de 151296. A condição de compromisso é 21,4% de água em etanol (x1) e 60 °C para temperatura (x3), com áreas previstas de 223716 e 150629 para zeaxantina e luteína, respectivamente. Todos eles foram testados em quadruplicata. Para a zeaxantina, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as três condições (Tabela 5). Para a luteína, as condições com 20,7% e

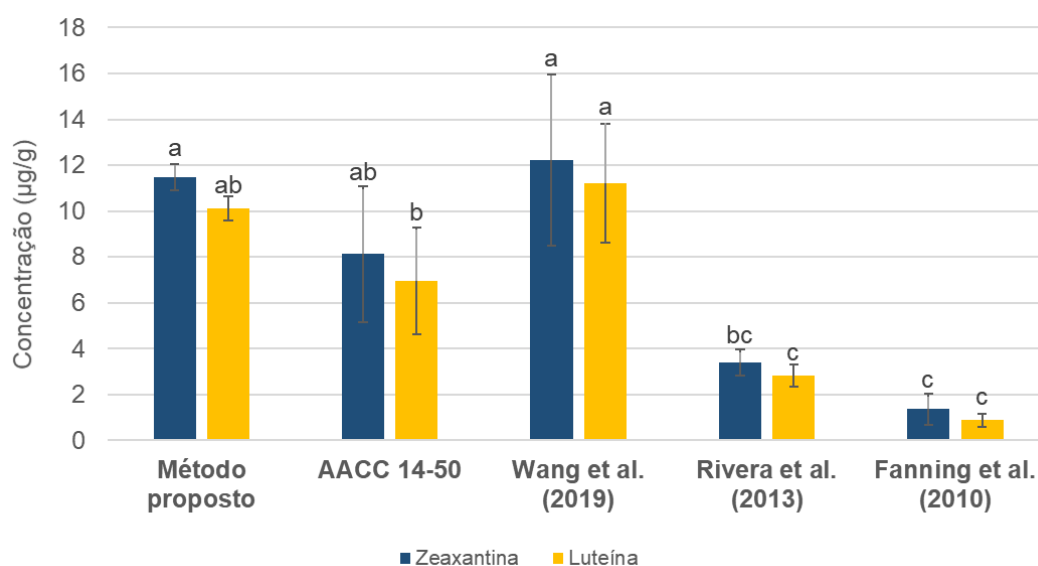
21,4% de água em etanol foram superiores às aquelas com 21,8% de água, todas a 60 °C (Tabela 5). Em outras palavras, qualquer um dos dois primeiros pode ser considerado ótimo.

**Tabela 5:** Condições ótimas para zeaxantina, luteína e condição compromisso, respectivamente.

Porcentagem de água em etanol	Área média zeaxantina	Área média luteína
20.7	239624 ± 5827 (a)	161967 ± 2481 (a)
21.8	226860 ± 11240 (a)	153229 ± 5498 (b)
21.4	236620 ± 6008 (a)	162132 ± 3457 (a)

Letras diferentes para as médias das áreas indicam diferenças estatisticamente significativas entre as condições de extração (teste de Tukey,  $p < 0,05$ )

O método de extração otimizado (21,4% de água em etanol a 60 °C) foi então comparado com o método oficial AACC 14-50, bem como três métodos selecionados da literatura. Os métodos comparativos foram escolhidos para um conjunto diversificado de abordagens (diferentes técnicas de extração, número de etapas e tipos de solventes) para uma comparação abrangente. Para a zeaxantina, a ANOVA com 95% de confiança seguida pelo teste de Tukey não indicou diferenças significativas entre o novo método aqui otimizado, o método oficial AACC 14-50 e o método de Wang et al. (2019), sendo o primeiro e o último estatisticamente superiores aos demais (Fig. 11). Para a luteína, não houve diferenças estatisticamente significativas entre o método aqui otimizado e o AACC 14-50, assim como entre o primeiro e o de Wang et al. (2019) (Fig. 11). Novamente, esses três foram superiores aos métodos de Rivera et al. (2013) e Fanning et al. (2010) (Fig. 12).



**Figura 12:** Comparação entre o novo método proposto, o método oficial AACC 14–50 e os métodos comparativos. As médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).


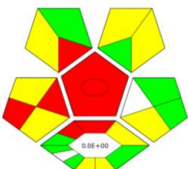

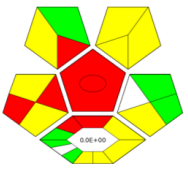



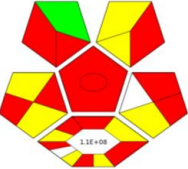

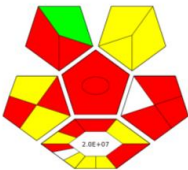
#### **4.4. Expandindo a comparação entre procedimentos de quantificação de zeaxantina e luteína**

O procedimento analítico aqui apresentado pela primeira vez, desde a preparação da amostra até a análise de UHPLC, também foi comparado com o método de referência (AACC 14-50) e os três métodos comparativos para seu “greenness” usando três métricas complementares: Analytical Greenness Calculator (AGREE) (Pena-Pereira, Wojnowski, & Tobiszewski, 2020), HPLC-Environmental Assessment Tool (HPLC-EAT) (Gaber, Törnvall, Kumar, Ali Amin, & Hatti-Kaul, 2011) e Índice de Procedimento Analítico Verde Complementar (ComplexGAPI) (Płotka-Wasyłka & Wojnowski, 2021). A métrica AGREE quantifica os impactos dos procedimentos analíticos de acordo com os doze Princípios da Química Analítica Verde (GAC) (Gałuszka, Migaszewski, & Namieśnik, 2013) atribuindo pontuação para cada um. Em seguida, combina as doze pontuações geradas em uma pontuação final que varia de 0 a 1 (pior e melhor resultado possível, respectivamente), que é mostrada no centro de um pictograma. Por outro lado, a métrica HPLC-EAT, na qual a menor pontuação calculada indica o método mais verde, considera as massas de todos os solventes usados durante o procedimento analítico, bem como seus impactos relativos de Segurança, Saúde e Meio Ambiente (SHE) retirados do guia Chem21 (Prat et al., 2016). Finalmente, a métrica ComplexGAPI também é baseada nos atributos GAC, mas complementa as outras duas métricas adicionando parâmetros adicionais de um processo realizado antes do próprio procedimento analítico (por exemplo, coleta de amostras, preservação, armazenamento). O software gratuito fornecido pelos autores gera um pictograma final em forma de hexágono. Cada campo do hexágono gerado corresponde a um aspecto diferente do processo descrito e é colorido de verde se certos requisitos forem atendidos (Płotka-Wasyłka & Wojnowski, 2021).

Os resultados dessa análise são apresentados na Tabela 6, que também indica alguns pontos fortes e fracos de cada procedimento. Todas as três métricas indicaram que o procedimento analítico aqui desenvolvido teve o menor impacto ambiental (Tabela 6). O novo procedimento utiliza apenas solventes benignos (isto é, os de baixa toxicidade e água e etanol biodegradáveis) tanto na preparação da amostra quanto na separação por UHPLC-PAD, o que favoreceu o novo procedimento em ambas as métricas, conforme esperado. Outros fatores a seu favor foram o tempo necessário para processar todo o procedimento e a miniaturização do

procedimento com menor consumo de solventes, entre outros. Os cálculos para AGREE e ComplexGAPI são fornecidos na Tabela 7 e na Tabela 8.

**Tabela 6:** Impactos ambientais estimados do novo procedimento proposto e dos métodos comparativos, e alguns de seus pontos fortes e fracos para a quantificação de zeaxantina e luteína.

Método	AGREE <sup>a</sup>	HPLC-EAT <sup>b</sup>	ComplexGAPI	Pontos fortes	Pontos fracos
Método proposto		53		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração e separação altamente eficientes</li> <li>- Apenas dois solventes recomendados para todo o procedimento</li> <li>- Menos passos para a preparação da amostra               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Miniaturização (UHPLC)</li> </ul> </li> <li>- Maior rendimento de amostra</li> <li>- DPR muito mais baixo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Um instrumento UHPLC é necessário</li> </ul>
AACC 14-50		128		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração altamente eficiente</li> <li>- Apenas três solventes recomendados para todo o procedimento</li> <li>- Menos passos para a preparação da amostra</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Procedimento longo (18 horas para a extração)</li> </ul>
Wang et al. (2019)		208		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração e separação altamente eficientes</li> <li>- Separação isocrática</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Solventes problemáticos/perigosos</li> <li>- Procedimento longo (90 min)</li> <li>- Mais etapas</li> </ul>
Rivera et al. (2013)		97		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixa quantidade de amostra</li> <li>- Alto rendimento da amostra</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração ineficiente</li> <li>- Não há separação entre zeaxantina e luteína.</li> <li>- Solventes problemáticos/perigosos</li> <li>- Muitas etapas</li> </ul>
Fanning et al. (2010)		212		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Separação eficiente.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Extração ineficiente</li> <li>- Solventes perigosos</li> <li>- Procedimento longo</li> <li>- Coluna C30 (incomum)</li> <li>- Mais etapas</li> </ul>

<sup>a</sup> Quanto maior a pontuação, mais verde é o método. Todas as entradas e pontuações para cada parâmetro são fornecidas na Tabela 7.

<sup>b</sup> Quanto menor a pontuação, mais verde é o método.

Cálculos baseado nos dados reportados nos artigos originais.

DPR = Desvio padrão relativo.

**Tabela 7:** Cálculos da métrica AGREE com pesos padrão para cada procedimento de preparação de amostra antes da injeção no sistema UHPLC-PAD/UV.

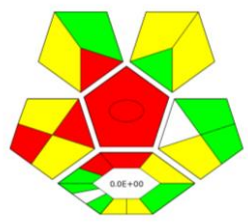
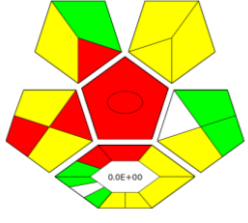
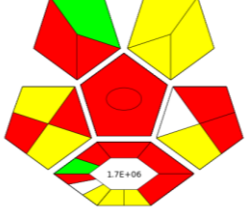
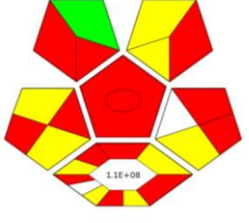
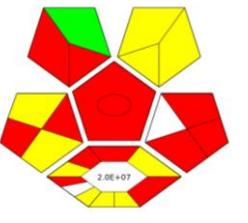
Procedimento/Parametro	Método proposto	AACC 14-50	Wang et al. (2019)	Rivera et al. (2013)	Fanning et al. (2010)
1. Procedimento de amostragem	Tratamento externo de amostras com número reduzido de etapas	Tratamento externo de amostras com número reduzido de etapas	Tratamento externo de amostras com grande número de etapas	Tratamento externo de amostras com grande número de etapas	Tratamento externo de amostras com grande número de etapas
2. Tamanho da amostra	2 g	8 g	1 g	0.1 g	1.5 g
3. Posição do aparelho analítico	Off-line	Off-line	Off-line	Off-line	Off-line
4. Passos distintos	1. moagem do milho 2. separação de partículas 3. pesagem 4. extração sólido-líquido 5. filtração com seringa 6. Análise por UHPLC	1. moagem do milho 2. separação de partículas 3. pesagem 4. extração sólido-líquido 5. filtração com seringa 6. Análise por UHPLC	1. moagem do milho 2. separação de partículas 3. pesagem 4. extração sólido-líquido 5. filtração 6. 2 <sup>nd</sup> extração sólido-líquido 7. filtração com seringa 8. Análise por UHPLC	1. moagem do milho 2. separação de partículas 3. pesagem 4. extração sólido-líquido 5. filtração 6. extração líquido-líquido 7. evaporação do solvente 8. ressuspensão do resíduo seco 9. filtração com seringa 10. Análise por UHPLC	1. moagem do milho 2. separação de partículas 3. pesagem 4. extração sólido-líquido 5. extração líquido-líquido 6. centrifugação 7. 2 <sup>nd</sup> extração líquido-líquido 8. 2 <sup>nd</sup> centrifugação 9. 3 <sup>rd</sup> extração líquido-líquido 10. 3 <sup>rd</sup> centrifugação 11. 4 <sup>th</sup> extração líquido-líquido 12. 4 <sup>th</sup> centrifugação 13. 5 <sup>th</sup> extração líquido-líquido 14. 5 <sup>th</sup> centrifugação 15. evaporação do solvente 16. ressuspensão do resíduo seco 17. filtração com seringa 18. Análise por UHPLC
5. Grau de automatização	Semi-automático e minituarizado	Semi-automático e minituarizado	Semi-automático e minituarizado	Semi-automático e minituarizado	Semi-automático e minituarizado
6. Agente de derivatização	nenhum	nenhum	nenhum	nenhum	nenhum
7. Quantidade de resíduo	0 ml (somente água e etanol são usados e não tratados como resíduo químico, já que são	0 ml (somente água, etanol e butanol são usados e não tratados como resíduo químico, já que são	49 mL of acetonitrila:diclorometano 95:5 (v/v)	15 mL metanol:acetate de etila 6:4 (v/v); 15 mL hexano:éter dietílico 9:1 (v/v); 40 mL of solução aquosa; 0.9 mL of	15 mL of hexano; 3 mL metanol:diclorometano 1:1 (v/v); 69 mL of metanol-ammonium acetate 9.2:0.8 (v/v) + methyl tert-butyl ether.

	biodegradáveis e de baixa toxicidade)	biodegradáveis e de baixa toxicidade)		acetonitrila:metanol:acetona; 6.76 mL of acetonitrila: metanol 7:3 (v/v). Total: 77.46 mL	Total: 87 mL
8.1 Número de analitos em uma única análise	2	2	2	2	2
8.2 Amostra analisada por hora	- 20 min extração - 5 min filtração - 30 min para condicionamento da coluna UHPLC - 30 min análise por UHPLC  0.70 amostra/hora	- 20 min saturação do solvente - 1 min vortex - 18 horas extração - 5 min filtração - 30 min condicionamento da coluna UHPLC - 30 min análise por UHPLC  0.05 amostra/hora	- 45 min extração - 5 min filtração - 45 min extração - 5 min filtração - 29 min condicionamento da coluna UHPLC - 20 min condicionamento da coluna UHPLC  0.39 amostra/hora	- 20 min extração - 5 min banho de gelo - 10 min extração líquido-líquido - 20 min rota-evaporador - 5 min filtração - 14.6 min condicionamento da coluna e análise por UHPLC  0.80 amostra/hora	- 10 min extração - 15 min centrifugação (5x 3 min) - 20 min rota-evaporador - 5 min filtração - 69 min condicionamento da coluna e análise por UHPLC  0.50 amostra/hora
9 Técnica mais intensiva em energia usada	UHPLC	UHPLC	UHPLC	UHPLC	UHPLC
10 Tipo de reagentes	Todos os reagentes são obtidos de fontes renováveis (etanol).	Todos os reagentes são obtidos de fontes renováveis (etanol e n-butanol)	Alguns reagentes são obtidos de fontes renováveis (etanol). Reagentes de fontes não renováveis também são usados (acetonitrila e diclorometano).	Alguns reagentes são obtidos de fontes renováveis (etanol, metanol, ethyl acetate e acetona). Reagentes de fontes não renováveis também são usados (hexano, acetonitrila, e éter dietílico).	Alguns reagentes são obtidos de fontes renováveis (etanol e metanol). Reagentes de fontes não renováveis também são usados (hexano, diclorometano, e methyl tert-butyl ether).
11 O método envolve solventes tóxicos?	Não	Não	Sim, 49 mL acetonitrila: diclorometano 95:5 (v/v).	Sim, um total de 77.46 mL de metanol, hexano, acetona, acetonitrila, ethyl acetate e éter dietílico.	Sim, um total of 87 mL of metanol, hexano, ammonium acetate, diclorometano, e methyl tert-butyl ether.
12 Ameaças que não podem ser evitadas	Altamente inflamável	- Altamente inflamável - Corrosivo	- Tóxico para a vida aquática - Altamente inflamável	- Tóxico para a vida aquática - Altamente inflamável - Explosivo	- Tóxico para a vida aquática - Altamente inflamável
Pontuação final	0.65	0.62	0.39	0.37	0.38

**Tabela 8:** Cálculos da métrica ComplexGAPI com pesos padrão para cada procedimento de preparação de amostra.

Procedimento/Parametro	Método proposto	AACC 14-50	Wang et al. (2019)	Rivera et al. (2013)	Fanning et al. (2010)
<b>Preparação da amostra e análise</b>					
Preparação da amostra					
1. Coleta	Off-line	Off-line	Off-line	Off-line	Off-line
2. Preservação	Químico ou físico	Químico ou físico	Químico ou físico	Químico ou físico	Químico ou físico
3. Transporte	Necessário	Necessário	Necessário	Necessário	Necessário
4. Armazenagem	Sob condições normais	Sob condições normais	Sob condições normais	Sob condições normais	Sob condições normais
5. Tipo de metodo	Extração necessária	Extração necessária	Extração necessária	Extração necessária	Extração necessária
6. Escala da extração	Macro-extração	Macro-extração	Macro-extração	Macro-extração	Macro-extração
7. Solventes/reagentes usados	Solventes/reagentes verdes	Solventes/reagentes verdes	Solventes/reagentes não-verdes	Solventes/reagentes não-verdes	Solventes/reagentes não-verdes
8. Tratamento adicional	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
<b>Reagentes e solventes</b>					
9. Quantidade	< 10 mL (< 10 g)	10-100 mL (10-100 g)	10-100 mL (10-100 g)	10-100 mL (10-100 g)	10-100 mL (10-100 g)
10. Perigo para saúde	Moderadamente tóxico, pode causa incapacitação temporária; NFPA = 2 ou 3	Moderadamente tóxico, pode causa incapacitação temporária; NFPA = 2 ou 3	Moderadamente tóxico, pode causa incapacitação temporária; NFPA = 2 ou 3	Moderadamente tóxico, pode causa incapacitação temporária; NFPA = 2 ou 3	Moderadamente tóxico, pode causa incapacitação temporária; NFPA = 2 ou 3
11. Risco à segurança	Maior inflamabilidade NFPA, pontuação de instabilidade de 0 ou 1. Sem perigos especiais	Highest NFPA flammability, instabilidade score of 0 or 1. No special hazards	Maior inflamabilidade NFPA ou pontuação de instabilidade é 2 ou 3, ou um perigo especial está envolvido	A pontuação mais alta de inflamabilidade ou instabilidade da NFPA é 4	Maior inflamabilidade NFPA ou pontuação de instabilidade é 2 ou 3, ou um perigo especial está envolvido
<b>Instrumentation</b>					
12. Energia	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
13. Risco ocupacional	Hermitização do processo analítico	Hermitização do processo analítico	Emissão de vapores para a atmosfera	Emissão de vapores para a atmosfera	Emissão de vapores para a atmosfera
14. Resíduo	< 1 mL (< 1 g) Foram usados apenas água e EtOH e não precisam ser tratados como resíduo químico	< 1 mL (< 1 g) Foram usados apenas água, butanol e EtOH e não precisam ser tratados como resíduo químico	> 10 mL 49 mL of ACN-DCM 95:5 (v/v) da fase móvel	> 10 mL Quantidade total de resíduo: 77.66 mL.	> 10 mL Quantidade total de resíduo: 87 mL.
15. Tratamento do resíduo	Degradação, passivação	Degradação, passivação	Degradação, passivação	Degradação, passivação	Sem tratamento

Tipo de método					
Tipo de análise	Qualitativo e quantitativo	Qualitativo e quantitativo	Qualitativo e quantitativo	Qualitativo e quantitativo	Qualitativo e quantitativo
<b>Pre-análise</b>					
Rendimento e condições					
I. Rendimento	0.00213 %	0.00151 %	0.00234 %	0.00062 %	0.00022%
II. Temperatura/tempo	Temperatura ambiente , >1 h, Aquecimento, <1 h Resfriamento <0 °C	Temperatura ambiente , >1 h, Aquecimento, <1 h Resfriamento <0 °C	Aquecimento, <1 h Resfriamento <0 °C	Temperatura ambiente , >1 h, Aquecimento, <1 h, Resfriamento <0 °C	Temperatura ambiente , >1 h, Aquecimento, <1 h, Resfriamento <0 °C
<b>Relação com economia verde</b>					
III. Número de regras atendidas	5-6	3-4	1-2	1-2	1-2
<b>Reagentes e solventes</b>					
IVa. Risco à saúde	Moderadamente tóxico, pode causa incapacitação temporária; NFPA = 2 or 3 (etanol)	Moderadamente tóxico, pode causa incapacitação temporária; NFPA = 2 or 3 (etanol e butanol)	Moderadamente tóxico, pode causa incapacitação temporária; NFPA = 2 or 3 (DMC e acetonitrila)	Moderadamente tóxico, pode causa incapacitação temporária; NFPA = 2 or 3	Moderadamente tóxico, pode causa incapacitação temporária; NFPA = 2 or 3 (hexano, metanol e MTBE)
IVb. Risco à segurança	Maior inflamabilidade NFPA ou pontuação de instabilidade é 2 ou 3, ou um perigo especial está envolvido	Maior inflamabilidade NFPA ou pontuação de instabilidade é 2 ou 3, ou um perigo especial está envolvido	Maior inflamabilidade NFPA ou pontuação de instabilidade é 2 ou 3, ou um perigo especial está envolvido	A pontuação mais alta de inflamabilidade ou instabilidade da NFPA é 4 (éter dietílico)	Maior inflamabilidade NFPA ou pontuação de instabilidade é 2 ou 3, ou um perigo especial está envolvido
<b>Instrumentação</b>					
Va. Configuração técnica	Configuração comum (agitador)	Configuração comum (vortexer)	Configurações adicionais/semi-avanzadas instrumentos usados (ultrassom)	Configurações adicionais/semi-avanzadas instrumentos usados (rota-evaporador)	Configurações adicionais/semi-avanzadas instrumentos usados (centrifugação, rotaevaporador)
Vb. Energia	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
Vc. Risco ocupacional	Hermetização do processo analítico	Hermetização do processo analítico	Emissão de vapores para a atmosfera	Emissão de vapores para a atmosfera	Emissão de vapores para a atmosfera
<b>Processamento e purificação</b>					

VIa. Processamento de produtos finais, purificação	Nenhum ou processo simples (filtração)	Nenhum ou processo simples (filtração)	Nenhum ou processo simples (filtração)	Purificação padrão Technique (extração líquido-líquido)	Purificação padrão Technique (extração líquido-líquido)
VIb. Pureza	0.00213 %	0.00151 %	0.00234 %	0.00062 %	0.00022%
<b>E-factor</b>					
VII. E-factor input E-factor = (massa total de resíduo do processo)/(massa de produto total)	E-factor = 0 Foram usados somente produtos químicos que não precisam de tratamento como resíduo químico	E-factor = 0 Foram usados somente produtos químicos que não precisam de tratamento como resíduo químico	E-factor = (massa de ACN e DCM from fase móvel)/ (massa de zeaxantina e luteína por grama de grãos de milho)  E-factor = (36.6 g ACN + 3.25 g DCM)/(23.44 x 10 <sup>-6</sup> g of zeaxantina e luteína)  E-factor = 1699477.53	E-factor = (massa de MeOH + ethyl acetate + hexano + éter dietílico + aqueous solution from liquid extração + ACN + metanol + acetona + ACN + MeOH from fase móvel) g/ massa de zeaxantina e luteína por grama de grãos de milho  E-factor = (6.84 + 5.4 + 9.45 + 1.05 + 40 + 0.33 + 1.14 + 0.23 + 3.4 + 1.46 + 0.6) g/(0.622 x 10 <sup>-6</sup> of zeaxantina e luteína)g  E-factor = 111141479.09	E-factor = (massa de hexano + MeOH + DCM + MeOH + H <sub>2</sub> O + MTBE)/massa de zeaxantina e luteína por grama de grãos de milho  E-factor = (10.5 + 1.2 + 2 + 35.2 + 3.87 + 14.42)g/ 3.36 x 10 <sup>-6</sup> g  E-factor = 19984732.14
Resultado					

O uso de EtOH e suas misturas com água oferece a possibilidade de análises sem gerar resíduos tóxicos, possibilitando assim o uso de instrumentação fora dos limites tradicionais dos laboratórios, inclusive em ambientes sensíveis ou áreas em desenvolvimento, onde o descarte de resíduos químicos não está bem estabelecido ou é muito caro (Welch et al., 2010). Além disso, o EtOH possui várias propriedades físicas vantajosas para cromatografia líquida em geral (baixa volatilidade, miscibilidade com água e comprimento de onda de corte UV em 210 nm), conforme demonstrado neste e em estudos anteriores.

#### 4.5. Validação do novo procedimento analítico

Os resultados da etapa de validação do novo método analítico, desde a extração até a análise por UHPLC-PAD, estão resumidos na Tabela 9, enquanto os detalhes completos desses testes são apresentados nas Tabelas 10-13. O método apresentou alta linearidade ( $R^2 > 0,990$ ) para os padrões de zeaxantina e luteína (Tabela 9). A sensibilidade do método foi evidenciada pelo baixo LOQ e LOD (Tabela 9). Para o tempo de retenção ( $t_R$ ), o maior DPR foi na etapa de precisão instrumental para zeaxantina (0,79%, Tabela 9 e Tabela 10). Para a área do pico, o Desvio Padrão Relativo (DPR) mais alto foi observado na precisão entre dias para a luteína (8,36%, Tabela 9 e Tabela 11).

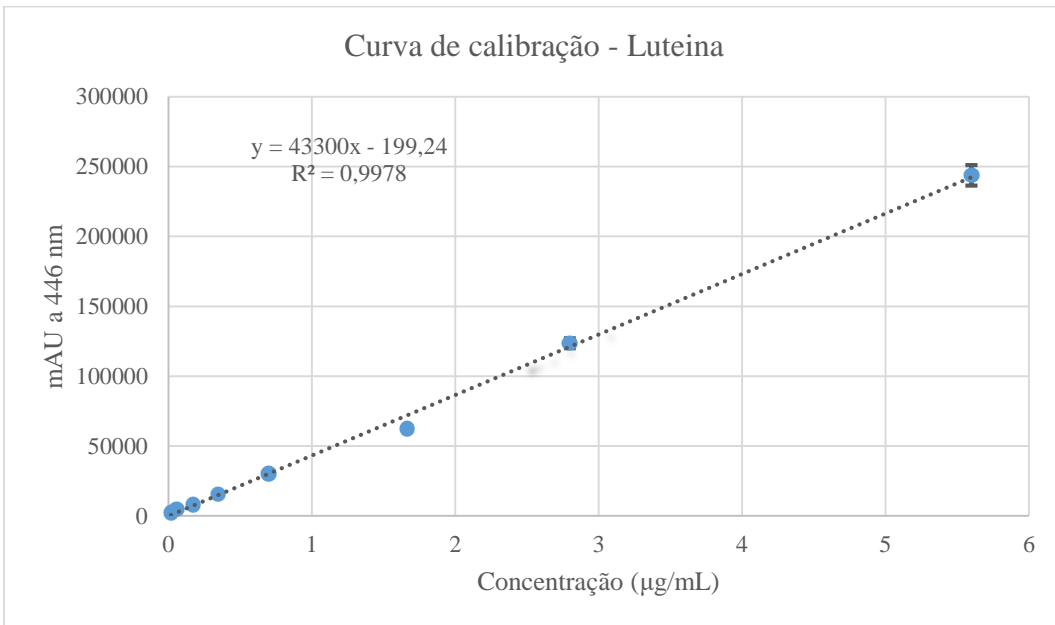
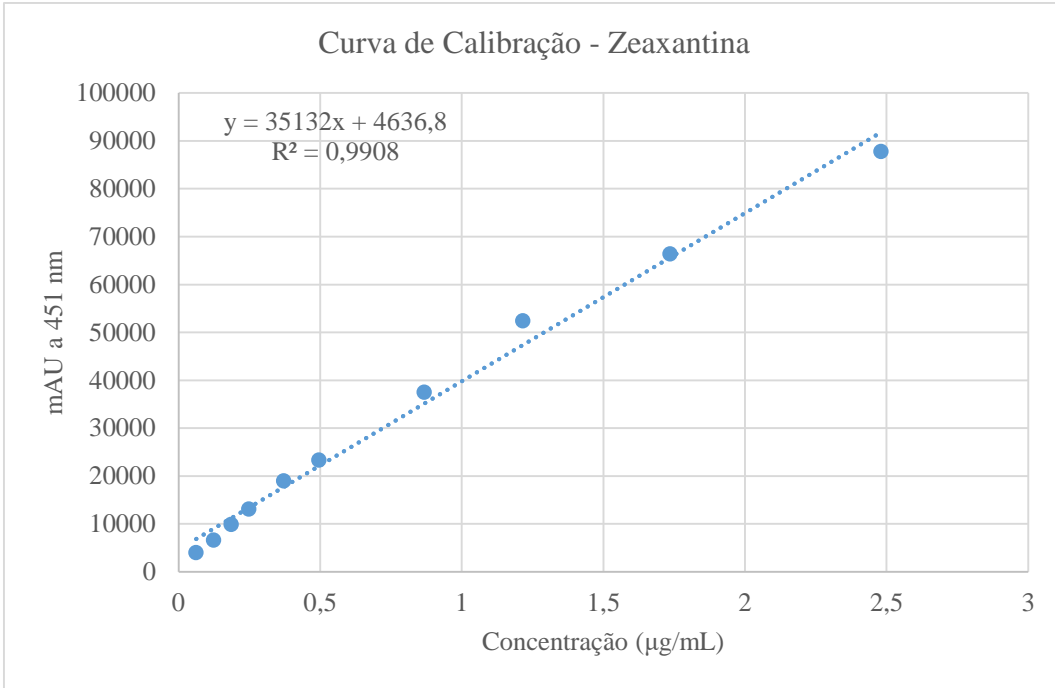
**Tabela 9:** Parâmetros da validação e resultados resumidos para o procedimento desenvolvido<sup>a</sup>.

Parâmetro	Zeaxantina		Luteína	
Faixa de linearidade ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.0038 - 2.479 <sup>b</sup>		0.0094 - 22.4 <sup>c</sup>	
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.0038		0.0094	
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.0618		0.0188	
	Área do pico (DPR, %)	$t_R$ (DPR, %)	Área do pico (DPR, %)	$t_R$ (DPR, %)
Precisão instrumental	1.11	0.79	0.67	0.77
Precisão intra-dia	5.88	0.09	6.75	0.09
Precisão entre dias	7.66	0.26	8.36	0.25
Precisão intermediárias	6.44	0.13	6.03	0.12
Estabilidade	4.70	0.58	3.08	0.57

<sup>a</sup> os detalhes dos testes são apresentados nas Tabelas 10-13.

<sup>b</sup> Equação zeaxantina :  $y = 35132x + 4636.8$  ( $R^2 = 0.9908$ ).

<sup>c</sup> Equação luteína:  $y = 43300x - 199.24$  ( $R^2 = 0.9978$ ).



**Figura 13:** Curvas de calibração para zeaxantina e luteína.

**Tabela 10:** Precisão instrumental UHPLC-PAD (nove injeções consecutivas do mesmo extrato)

Injeção	Zeaxantina		Luteína	
	Área	t <sub>R</sub>	Área	t <sub>R</sub>
1	188802	7,453	131866	7,727
2	186442	7,455	130784	7,728
3	186105	7,427	131432	7,701
4	186947	7,392	131372	7,664
5	185236	7,371	130830	7,642
6	184836	7,351	130300	7,623
7	183384	7,332	129696	7,603
8	182528	7,313	129452	7,585
9	182989	7,302	129657	7,573
Média	185252,1	7,377333	130598,8	7,649555556
Desvio padrão	2056,189	0,05814	872,6451	0,059122989
Desvio padrão relativo (%)	1,109941	0,788089	0,668188	0,772894427

**Tabela 11:** Precisão intra-dia e entre dias (quatro extratos foram preparados e injetados cada dia)

Extração n°	Dia de extração e análise por UHPLC-PAD	Zeaxantina		Luteína	
		Area	t <sub>R</sub> (min)	Area	t <sub>R</sub> (min)
1	1	190698.00	7.26	137826.00	7.54
2	1	174886.00	7.26	126239.00	7.53
3	1	166249.00	7.27	119459.00	7.54
4	1	172805.00	7.26	128859.00	7.53
Média dia 1		176159.50	7.26	128095.75	7.53
DP dia 1		10367.58	0.01	7600.47	0.01
DPR (%) dia 1		5.88	0.06	5.93	0.07
5	2	199087.00	7.29	139263.00	7.56
6	2	194530.00	7.30	138132.00	7.57
7	2	184966.00	7.30	129644.00	7.57
8	2	190124.00	7.30	137720.00	7.57
Média dia 2		192176.75	7.30	136189.75	7.57
DP dia 2		6041.47	0.01	4412.32	0.01
DPR (%) dia 2		3.14	0.06	3.24	0.06
9	3	165656.00	7.30	114023.00	7.57
10	3	172906.00	7.31	121269.00	7.58
11	3	172897.00	7.30	123046.00	7.57
12	3	153545.00	7.30	105871.00	7.57
Média dia 3		166251.00	7.30	116052.25	7.57
DP dia 3		9133.36	0.01	7829.49	0.01
DPR (%) dia 3		5.49	0.09	6.75	0.09
Média dias 1-3		178195.75	7.29	126779.25	7.56
DP dias 1-3		13656.10	0.02	10604.66	0.02
DPR (%) dias 1-3		7.66	0.26	8.36	0.25

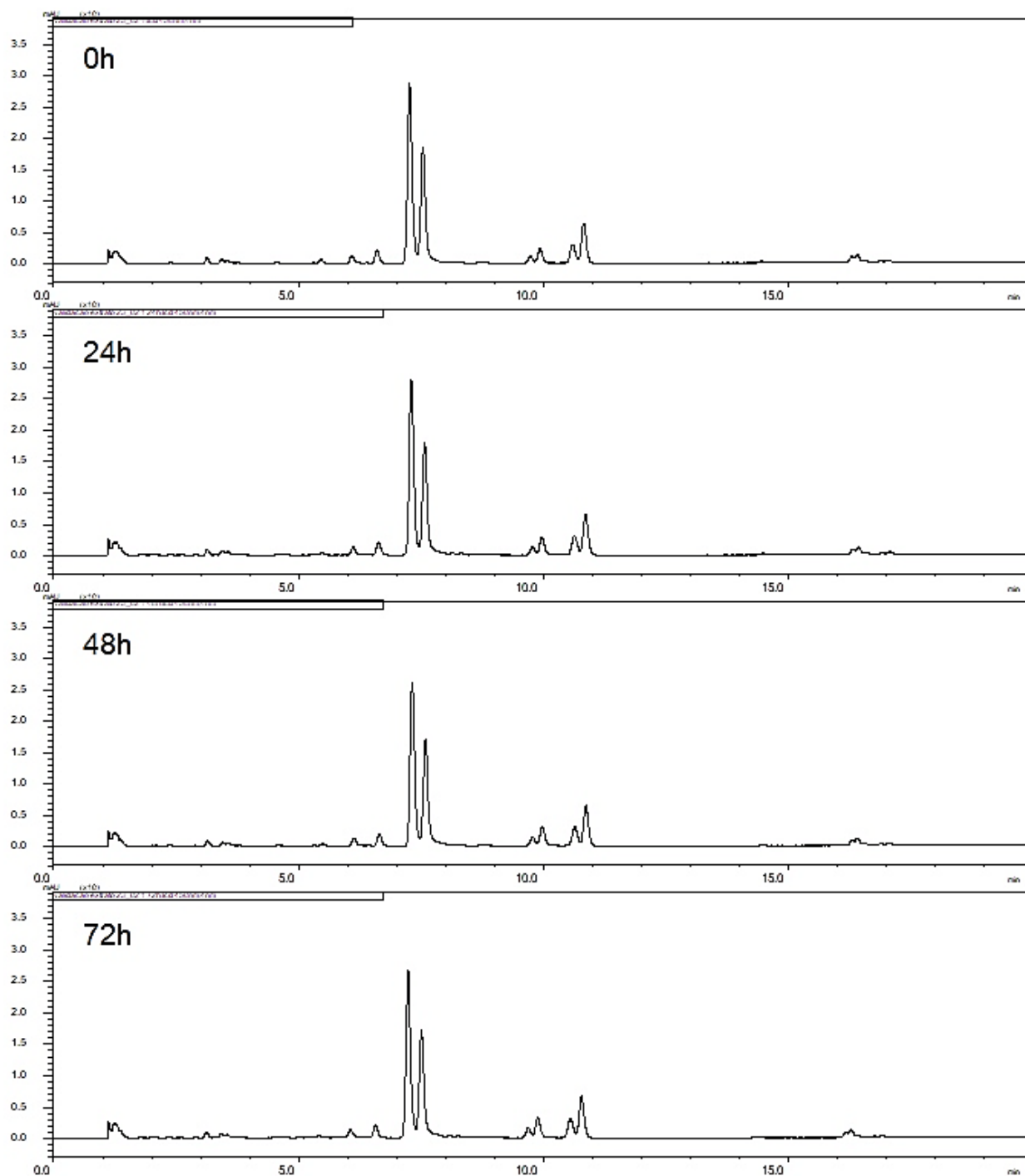
**Tabela 12:** Precisão intermediária.

Extração n°	Dia de análise	Analista	Planta:solvente (g/mL)	Zeaxantina		Luteína	
				t <sub>R</sub> (min)	Conc. (µg/g)	t <sub>R</sub> (min)	Conc. (µg/g)
1	1	BRL	1.5:3.95	7.29	10.90	7.56	6.56
2	1	BRL	1.5:3.95	7.30	10.67	7.57	6.59
3	1	BRL	1.5:3.95	7.30	10.14	7.57	6.14
4	2	AMC	2.0:3.95	7.30	10.24	7.57	6.57
5	2	AMC	2.0:3.95	7.29	11.02	7.56	6.97
6	2	AMC	2.0:3.95	7.30	11.19	7.57	6.84
7	3	LAC	2.5:3.95	7.33	8.92	7.59	5.65
8	3	LAC	2.5:3.95	7.31	10.30	7.58	6.38
9	3	LAC	2.5:3.95	7.31	10.41	7.58	6.50
Média				7.30	10.42	7.57	6.47
DP				0.01	0.67	0.01	0.39
DPR (%)				0.13	6.44	0.12	6.03

**Tabela 13:** Estabilidade de três extratos mantidos à 25 °C no escuro, injetado ao longo de 72 h.

Extrato n°/hora <sup>a</sup>	Zeaxantina		Luteína	
	Area	t <sub>R</sub> (min)	Area	t <sub>R</sub> (min)
Extrato 1_0 h	190698	7.26	137826	7.54
Extrato 1_24 h	181983	7.30	134814	7.57
Extrato 1_48 h	171547	7.32	128713	7.59
Extrato 1_72 h	175028	7.23	130800	7.50
Média	179814	7.28	133038.30	7.55
DP	8454.09	0.04	4074.04	0.04
DPR (%)	4.70	0.51	3.06	0.49
Extrato 2_0 h	174886	7.26	126239	7.53
Extrato 2_24 h	167733	7.31	122732	7.59
Extrato 2_48 h	163705	7.32	121790	7.59
Extrato 2_72 h	165194	7.23	121776	7.50
Média	167879.50	7.28	123134.30	7.55
DP	4958.19	0.04	2117.63	0.04
DPR (%)	2.95	0.58	1.72	0.57
Extrato 3_0 h	166249	7.27	119459	7.54
Extrato 3_24 h	156146	7.31	114125	7.58
Extrato 3_48 h	151412	7.32	111996	7.59
Extrato 3_72 h	151695	7.26	111987	7.52
Média	156375.50	7.29	114391.80	7.56
DP	6930.18	0.03	3524.70	0.03
DPR (%)	4.43	0.43	3.08	0.43

<sup>a</sup> A partir do horário da primeira injeção (0 h)

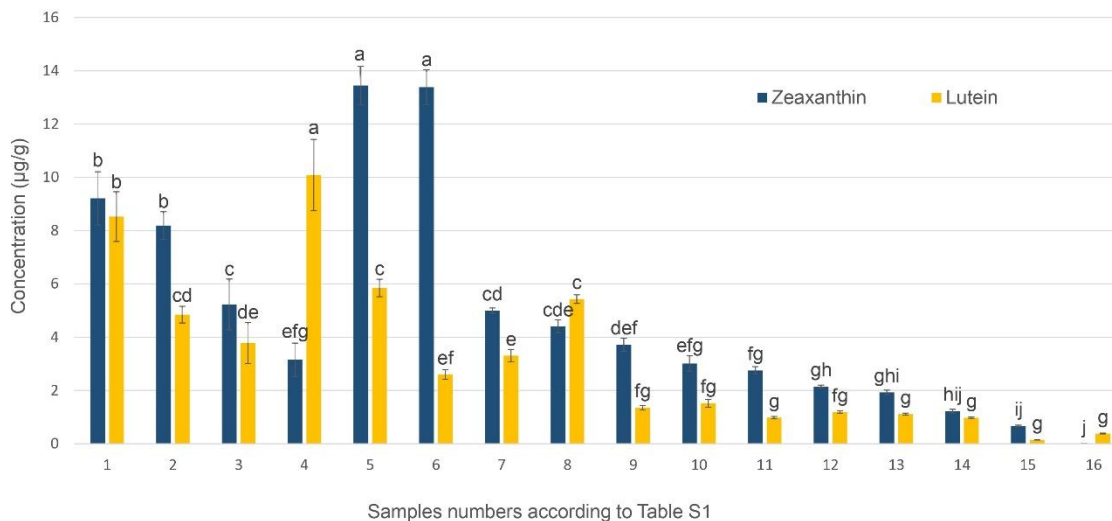


**Figura 14:** Cromatogramas de UHPLC-PAD a 450 nm da injeção de um extrato representativo em 0, 24, 48 e 72 h após a preparação. O extrato foi mantido no escuro e a 25 °C. Coluna C18 150 x 3,0 mm, 1,8 µm (Zorbax Eclipse XDB-C18, Agilent, EUA). Fases móveis: água (A) e etanol (B), no seguinte gradiente: 80-100% B (0-20, 30 min). Volume de injeção: 5 µL. Temperatura de análise: 35°C.

Os resultados da validação analítica são compatíveis com os observados para amostras complexas (Song, Carlson, Valenzuela, Chao, & Pathipaka, 2022; Sartori et al., 2022; Machado et al., 2018), evidenciando a qualidade do método desenvolvido. O método UHPLC-PAD também foi seletivo para zeaxantina e luteína devido à pureza espectral confirmada pela deconvolução dos picos correspondentes na amostra de milho (Fig. 9). Além disso, as amostras apresentaram boa estabilidade, com DPR para a área do pico e  $t_R$  abaixo de 5% (Fig. 14 e Tabela 12).

#### 4.6. Aplicação do novo método para diferentes amostras de grão de milho

O procedimento analítico otimizado e validado foi aplicado a diferentes amostras de grãos de milho, tanto comerciais quanto tradicionais, selecionados por pequenos agricultores ao longo do tempo. As amostras de milho 5 e 6 (13,45 e 13,39  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente), ambas variedades tradicionais cultivadas por pequenos agricultores, apresentaram as maiores concentrações de zeaxantina, superando os grãos de milho de marca comercial (Fig. 15-16 e Tabela 14). Para a concentração de luteína, os grãos que apresentaram os melhores resultados foram a amostra 4 e a amostra 1, ambas comerciais (10,08  $\mu\text{g/g}$  8,53  $\mu\text{g/g}$ , respectivamente - Fig. 13).



**Figura 15.** Quantificação de zeaxantina e luteína em diferentes amostras em base seca.

**Tabela 14:** Quantificação de zeaxantina e luteína em diferentes amostras de grão de milho.

Amostra	Concentração zeaxantina ( $\mu\text{g/g}$ )	Concentração luteína ( $\mu\text{g/g}$ )
1. Amostra comercial 1	$9.21 \pm 0.99$	$8.53 \pm 0.94$
2. Amostra comercial 2	$8.19 \pm 0.52$	$4.84 \pm 0.31$
3. Amostra comercial 3	$5.22 \pm 0.95$	$3.78 \pm 0.77$
4. Grão de milho variedade BM888 (FCA –UNESP)	$3.15 \pm 0.63$	$10.08 \pm 1.34$
5. Milho crioulo de grão roxo com casca roxa	$13.45 \pm 0.72$	$5.84 \pm 0.33$
6. Milho crioulo de grão amarelo (EPAGRI – SC)	$13.39 \pm 0.65$	$2.60 \pm 0.18$
7. Milho crioulo de grão avermelhado com casca amarela	$4.99 \pm 0.10$	$3.31 \pm 0.23$
8. Milho crioulo de grão rajado com casca amarela	$4.40 \pm 0.25$	$5.43 \pm 0.16$
9. Milho crioulo de grão rajado com casca vermelha	$3.72 \pm 0.24$	$1.35 \pm 0.08$
10. Milho crioulo de grão amarelo e preto com casca avermelhada	$3.01 \pm 0.28$	$1.51 \pm 0.15$
11. Milho crioulo de grão amarelo com casca vermelha	$2.75 \pm 0.14$	$0.98 \pm 0.04$
12. Milho crioulo de grão amarelo com casca amarela	$2.14 \pm 0.05$	$1.19 \pm 0.04$
13. Milho crioulo de grão amarelo com casca avermelhada	$1.93 \pm 0.09$	$1.11 \pm 0.04$
14. Milho crioulo de grão roxo com casca vermelha	$1.22 \pm 0.07$	$0.98 \pm 0.03$
15. Milho crioulo de grão vermelho com casca amarela	$0.66 \pm 0.03$	$0.14 \pm 0.00$
16. Milho crioulo de grão roxo (Ibitiboca – MG)	-	$0.38 \pm 0.02$



**Figura 16:** Amostras de milho crioulo.

Os valores obtidos para as concentrações de zeaxantina (0,66 a 13,45  $\mu\text{g/g}$ ) e luteína (0,14 a 10,08  $\mu\text{g/g}$ ) em base seca em grãos de milho são consistentes com os relatados na literatura (0,05 a 3,75  $\mu\text{g/g}$  para zeaxantina e 1,98 a 27,93  $\mu\text{g/g}$  para luteína) (Kurilich & Juvik, 1999; Scott & Eldridge, 2005). Portanto, milho e derivados podem ser as principais fontes de zeaxantina, em comparação com outras fontes de xantofilas. Na farinha de milho, obtida a partir da moagem de grãos de milho secos, foram observados valores entre 5,31 e 9,40  $\mu\text{g/g}$  de zeaxantina e entre 0,01 e 2,10  $\mu\text{g/g}$  de luteína (Murillo, Meléndez-Martínez, & Portugal, 2010; Perry, Rasmussen, & Johnson, 2009).

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstram que um método altamente eficiente, simples, reprodutível e verde foi alcançado para a quantificação de zeaxantina e luteína em grãos de milho. Uma ampla comparação considerando os parâmetros tradicionais de extração e separação (por exemplo, extração de zeaxantina e luteína e eficiências de separação, erro experimental e rendimento da amostra) em conjunto com parâmetros ambientais (por exemplo, consumo de solvente e energia e impacto ambiental dos produtos químicos envolvidos) demonstra a vantagem do método proposto para a quantificação de zeaxantina e luteína sobre o método de referência AACC 14-50 e três outros métodos comparativos selecionados para cobrir uma variedade de abordagens (por exemplo, diferentes técnicas de extração, número de etapas, solventes). O método proposto foi aplicado a 16 amostras de grãos de milho, demonstrando a variabilidade das concentrações de zeaxantina e luteína em grãos de milho de diferentes origens, dois dos quais com teores de protetor ocular de zeaxantina acima de 13 µg/g. Estas variedades poderiam ser selecionadas para a produção ampliada de milho rico neste tipo de componente. Por ser altamente eficiente e utilizar apenas água e etanol compatível com alimentos, o procedimento apresentado poderia ser escalado para escala industrial e servir de base para a purificação dessas importantes substâncias bioativas para a produção de extratos enriquecidos a serem incorporados em formulações nutracêuticas.

## REFERÊNCIAS

- AACC INTERNATIONAL. Determination of Pigments. In: **AACC International Approved Methods**. [s.l.] AACC International, 2009.
- ALFONSI, K. et al. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. **Green Chem.**, v. 10, n. 1, p. 31–36, 2008.
- ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2–8, set. 2015.
- ARMENTA, S. et al. Green extraction techniques in green analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 248–253, 2019.
- BERNSTEIN, P. S. et al. Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 50, p. 34–66, 2016.
- BONE, R. A. et al. Analysis of the macular pigment by HPLC: Retinal distribution and age study. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 29, n. 6, p. 843 – 849, 1988.
- BONE, R. A. et al. Stereochemistry of the human macular carotenoids. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 34, n. 6, p. 2033 – 2040, 1993.
- CALVO, M. M. Lutein: a valuable ingredient of fruit and vegetables. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 7–8, p. 671–696, 2005.
- CAO, W. et al. Higher dietary carotenoid intake associated with lower risk of hip fracture in middle-aged and elderly Chinese: A matched case-control study. **Bone**, v. 111, n. October 2017, p. 116–122, 2018.
- CAPELLO, C.; FISCHER, U.; HUNGERBÜHLER, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. **Green Chem.**, v. 9, n. 9, p. 927–934, 2007.
- CARASEK, E. et al. Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1640, p. 461944, 2021.
- CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: Concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8615–8627, 2012.
- CHEW, E. Y. et al. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. **Jama**, v. 309, n. 19, p. 2005–2015, 2013.
- CLARKE, C. J. et al. Green and Sustainable Solvents in Chemical Processes. **Chemical Reviews**, 2018.
- D'AMATO, R. et al. Zea mays L. Grain: Increase in Nutraceutical and Antioxidant Properties Due to Se Fortification in Low and High Water Regimes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 25, p. 7050–7059, 2019.
- DE CAMPO, C. et al. Incorporation of zeaxanthin nanoparticles in yogurt: Influence on

physicochemical properties, carotenoid stability and sensory analysis. **Food Chemistry**, v. 301, n. July, p. 125230, 2019.

DE LA GUARDIA, M.; GARRIGUES, S. The Concept of Green Analytical Chemistry. In: **Handbook of Green Analytical Chemistry**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2012. p. 1–16.

DE OLIVEIRA SARTORI, L. et al. An efficient, fast, and green procedure to quantify  $\alpha$ - and  $\beta$ -acids and xanthohumol in hops and their derived products. **Food Chemistry**, v. 373, p. 131323, 2022.

ESPINO, M. et al. Trends in Analytical Chemistry Natural designer solvents for greening analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 126–136, 2016.

FANNING, K. J. et al. Screening sweetcorn for enhanced zeaxanthin concentration. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 1, p. 91–96, 2010.

FUNARI, C. S. et al. Reaction of the Phytochemistry Community to Green Chemistry: Insights Obtained Since 1990. **Journal of Natural Products**, 13 jan. 2023.

GABER, Y. et al. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 2021, 2011.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, out. 2013.

GARCIA, J. C. et al. Aspectos econômicos da produção e utilização do milho. In: **Embrapa Milho e Sorgo**. [s.l.: s.n.].

GUILLARME, D. et al. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part II: Gradient experiments. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 2, p. 430–440, fev. 2008.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). 2005.

INGLETT, G. E. Kernel structure, composition, and quality. In: **Inglett, G. E. Corn: culture, processing, products**. [s.l.: s.n.]. v. v. 1970.

JUNGHANS, A.; SIES, H.; STAHL, W. Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2001.

KAN, B. et al. Dietary carotenoid intake and osteoporosis : the National Health and Nutrition Examination Survey , 2005 – 2018. **Archives of Osteoporosis**, p. 1–8, 2022.

KHACHIK, F. et al. Transformations of selected carotenoids in plasma, liver, and ocular tissues of humans and in nonprimate animal models. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 2002.

KHACHIK, F.; BERNSTEIN, P. S.; GARLAND, D. L. Identification of lutein and zeaxanthin oxidation products in human and monkey retinas. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 1997.

KOEL, M. **Do we need Green Analytical Chemistry?** Green Chemistry. **Anais...2016**

- KONSTANTOPOULOU, M. A.; KROKOS, F. D.; MAZOMENOS, B. E. Chemical composition of corn leaf essential oils and their role in the oviposition behavior of *Sesamia nonagrioides* females. **Journal of chemical ecology**, v. 30, n. 11, p. 2243–56, nov. 2004.
- KORANY, M. A. et al. Green chemistry: Analytical and chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 40, n. 16, p. 839–852, 2017.
- KURILICH, A. C.; JUVIK, J. A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 1948–1955, 1999.
- LI, N. et al. Green leafy vegetable and lutein intake and multiple health outcomes. v. 360, n. April, 2021.
- MACHADO, K. N. et al. A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.). **Food Chemistry**, v. 239, p. 180–188, jan. 2018.
- MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of Natural Medicines**, v. 74, n. 1, p. 1–16, 2020.
- MOLDOVEANU, S.; DAVID, V. Chapter 1 - Preliminaries to Sample Preparation. In: MOLDOVEANU, S.; DAVID, V. (Eds.). **Modern Sample Preparation for Chromatography**. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 3–32.
- MROWICKA, M. et al. **Lutein and Zeaxanthin and Their Roles in Age-Related Macular Degeneration—Neurodegenerative Disease Nutrients**, 2022.
- MURILLO, E.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; PORTUGAL, F. Screening of vegetables and fruits from Panama for rich sources of lutein and zeaxanthin. **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 167–172, set. 2010.
- MUZUMDAR, S.; FERENCZI, K. Nutrition and youthful skin. **Clinics in Dermatology**, v. 39, n. 5, p. 796–808, 2021.
- NUSS, E. T.; TANUMIHARDJO, S. A. Maize: A Paramount Staple Crop in the Context of Global Nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 417–436, 17 ago. 2010.
- NUSSBAUM, J. J.; PRUETT, R. C.; DELORI, F. C. Historic perspectives. Macular yellow pigment. The first 200 years. **Retina (Philadelphia, Pa.)**, v. 1, n. 4, p. 296–310, 1981.
- O'HARE, T. J.; FANNING, K. J.; MARTIN, I. F. Zeaxanthin biofortification of sweet-corn and factors affecting zeaxanthin accumulation and colour change. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 572, p. 184–187, 2015.
- PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Circular Técnica, 75-EMBRAP A. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006.
- PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE—Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 21 jul. 2020.
- PENG, Y. et al. Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in *Lycium* fruits (*Fructus Lycii*). **Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 60, n. 4, p. 161–164, dez. 2005.

PERRY, A.; RASMUSSEN, H.; JOHNSON, E. J. Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 1, p. 9–15, 2009.

PISANELLI, G.; OLIVEIRA, R. DE. **Universidade Estadual De Campinas Avaliação De Milho E Derivados De Milho Como Fontes**. [s.l.: s.n.].

PŁOTKA-WASYLKA, J. et al. Chapter 9 Green Chromatography: State-of-the-art{,} Opportunities and Future Perspectives. In: **Challenges in Green Analytical Chemistry (2)**. [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2020. p. 255–276.

PRAT, D. et al. CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. **Green Chemistry**, 2015.

PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chemistry**, v. 16, n. 10, p. 4546–4551, 2014.

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, n. 1, p. 105–112, 20 abr. 2014.

REVILLA, P. et al. Traditional Foods From Maize (*Zea mays* L.) in Europe. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 7 jan. 2022.

RIVERA, S. M. et al. Fast quantitative method for the analysis of carotenoids in transgenic maize. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 22, p. 5279–5285, 2013.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Food Carotenoids: Chemistry, Biology and Technology**. [s.l.: s.n.].

RODRIGUEZ-CONCEPCION, M. et al. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in lipid research**, v. 70, p. 62–93, 2018.

RULES, D. et al. IUPAC IUPAC-IUB for. v. 10, n. 26, p. 4827–4837, 1971.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, n. April 2017, p. 90–103, 2018.

SCOTT, C. E.; ELDRIDGE, A. L. Comparison of carotenoid content in fresh, frozen and canned corn. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, n. 6, p. 551–559, 2005.

SHEN, Y.; CHEN, B.; VAN BEEK, T. A. Alternative solvents can make preparative liquid chromatography greener. **Green Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 4073–4081, 2015.

SILVA, M. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 669, 2010.

SIYUAN, S.; TONG, L.; LIU, R. H. Corn phytochemicals and their health benefits. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 3, p. 185–195, 2018.

SMITH, R. M. Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1–2, p. 3–27, 2003.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Basic Concepts and the Control of Separation. In: **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2009. p. 19–86.

SOMMERBURG, O. et al. Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. **British Journal of Ophthalmology**, v. 82, n. 8, p. 907–910, 1998.

SONG, L. et al. Development of a validated method for rapid quantification of up to sixteen cannabinoids using ultra-high-performance liquid chromatography diode-array detector with optional electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1670, p. 462953, maio 2022.

SUTTON, A. T. et al. Natural deep eutectic solvents as the major mobile phase components in high-performance liquid chromatography — searching for alternatives to organic solvents. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, p. 3705–3713, 2018.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIK, J. Greener organic solvents in analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 1–4, jun. 2017.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIKA, J.; PENA-PEREIRA, F. Environmental risk – based ranking of solvents by the combination of multimedia model and multi-criteria decision analysis. **Green Chemistry**, v. 19, p. 1034–1042, 2017.

TÖRÖK, B.; DRANSFIELD, T. Green Chemistry: Historical Perspectives and Basic Concepts. In: **Green Chemistry: An Inclusive Approach**. [s.l.: s.n.].

WALD, G. Human Vision and the Spectrum. **Science**, v. 101, n. 2635, p. 653–658, 1945.

WANG, L. et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and purification of zeaxanthin and lutein in corn gluten meal. **Molecules**, v. 24, n. 16, 2019.

WELCH, C. J. et al. Greening analytical chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 667–680, jul. 2010.

WILSON, L. M. et al. The Effect of Lutein/Zeaxanthin Intake on Human Macular Pigment Optical Density: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Advances in Nutrition**, v. 12, n. 6, p. 2244–2254, 2021.

YAO, Y. The Roles of Carotenoid Consumption and Bioavailability in Cardiovascular Health. 2021.

ZAFAR, J. et al. Biochemical and immunological implications of lutein and zeaxanthin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, 2021.

ZUNIGA, K. E.; BISHOP, N. J.; TURNER, A. S. Dietary lutein and zeaxanthin are associated with working memory in an older population. **Public Health Nutrition**, v. 24, n. 7, p. 1708–1715, 2021.

