



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

IANAH DE SOUSA BRAGA MARCILON

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ABCÍSICO POR HPLC EM DIFERENTES
ESPÉCIES VEGETAIS

FORTALEZA

2025

IANAH DE SOUSA BRAGA MARCILON

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ABSCÍSIKO POR HPLC EM DIFERENTES ESPÉCIES
VEGETAIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Henrique de
Carvalho.

FORTALEZA
2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M266o Marcilon, Ianah de Sousa Braga.
Otimização da extração e condições cromatográficas para quantificação de ácido abscísico por HPLC em diferentes espécies vegetais / Ianah de Sousa Braga Marcilon. – 2025.
41 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.
Orientação: Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho.

1. ABA. 2. Fitormônio. 3. Cromatografia. 4. Estresse salino. I. Título.

CDD 661

IANAH DE SOUSA BRAGA MARCILON

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO E CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA
QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO ABCÍSICO POR HPLC EM DIFERENTES ESPÉCIES
VEGETAIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Biotecnologia do
Centro de Ciências da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de Bacharelado em Biotecnologia. Área
de concentração: Fisiologia vegetal.

Aprovada em 16/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Humberto Henrique de Carvalho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Isabelle Mary Costa Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus, pelo amparo.

Aos meus pais, por me guiarem com amor.

Ao meu irmão, por alegrar a vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por zelar por mim, em especial aos meus pais, Hamilton e Danielle, por me amarem incondicionalmente, incentivarem cada um dos meus sonhos e me ensinarem a ser quem eu sou; ao meu irmão, Arthur, por tornar os dias mais leves, preenchendo-os com muito carinho e boas risadas.

Ao meu namorado, Jonas, por me ouvir, me acalmar e me fazer sorrir nos momentos mais improváveis.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal, por possibilitar a realização dessa pesquisa e oferecer todo o suporte necessário.

Aos membros do LabFiVe, por me receberam de forma tão acolhedora e me ensinarem com atenção, especialmente, ao Professor Humberto, pela excelente orientação; à Isabelle, pelo cuidado e por me ensinar tanto, principalmente a manter a calma e comemorar as pequenas vitórias; ao Andel, a Carol e ao Luan, pela companhia, bom humor e parceria diária.

Aos amigos que fiz na graduação, por serem minha âncora nos momentos mais difíceis, por celebrarem comigo minhas conquistas e por me lembrarem todos os dias que eu não preciso passar por nada sozinha.

Aos amigos que fiz no colégio, por partilharem minhas alegrias, dividirem minhas tristezas e me ensinarem que tempo nenhum é capaz de abalar uma amizade sincera.

Aos meus irmãos em Cristo, por me aconselharem e me ajudarem a me manter firme no propósito de Deus, principalmente, nos momentos em que a vida ficou mais turbulenta.

RESUMO

O aumento populacional tem elevado a demanda global por alimentos, insumos agrícolas e soluções sustentáveis para garantir a segurança alimentar. Um dos maiores desafios da agricultura moderna é a dificuldade das plantas em se adaptar a estresses abióticos e completar seu ciclo, especialmente sob salinidade, agravada por práticas inadequadas de irrigação. Para manter a homeostase, as plantas ativam sinalizações específicas, como a modulação de fitormônios, sendo o ácido abscísico (ABA), um dos principais envolvidos. Dada sua importância nas respostas ao estresse, a quantificação do ABA torna-se uma ferramenta essencial em estudos fisiológicos, entretanto, as metodologias tradicionalmente utilizadas ainda enfrentam diversas limitações. Nesse contexto, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) se destaca como uma técnica acessível, por oferecer elevada sensibilidade, boa resolução e compatibilidade com compostos termolábeis. Em vista disso, o presente trabalho visa otimizar e unificar um método de quantificação de ABA por HPLC para diferentes amostras vegetais utilizando quantidades reduzidas de folha. Plantas (*Anacardium occidentale* L., *Solanum lycopersicum*, *Vigna unguiculata* e *Zea mays*) foram cultivadas em casa de vegetação e submetidas a estresse salino com NaCl 100 mM por sete dias. As folhas foram colhidas e diferentes métodos de extração de ABA, incluindo solventes e estratégias de ressuspensão foram avaliados e os extratos analisados por HPLC utilizando diferentes fases móveis e fluxos. O milho apresentou o maior rendimento após a extração, o que levou à sua seleção para análises posteriores, com quatro repetições por tratamento. As análises de HPLC mostraram diferenças específicas entre espécies na detecção de ABA e o método demonstrou forte linearidade ($R^2 = 0,9818$) para a curva padrão. Os níveis do fitormônio tenderam a aumentar sob estresse salino em folhas de milho; entretanto, o teste t indicou valor de $p \geq 0,05$, não evidenciando diferença estatisticamente significativa. De modo geral, o solvente, a composição e o fluxo da fase móvel, bem como as condições cromatográficas, foram cruciais para o desempenho, assim como a idade das amostras. As folhas de milho apresentaram os resultados mais consistentes, evidenciando uma tendência ao aumento dos níveis de ABA sob estresse salino. No entanto, análises adicionais são necessárias para aumentar a reprodutibilidade e reduzir a variabilidade entre as réplicas.

Palavras chave: ABA; fitormônio; cromatografia, estresse salino.

ABSTRACT

Population growth has increased the global demand for food, agricultural inputs, and sustainable solutions to ensure food security. One of the major challenges in modern agriculture is the difficulty plants face in developing and surviving under abiotic stresses, especially soil salinity, which is exacerbated by inadequate irrigation practices. To maintain homeostasis and adapt to these conditions, plants activate specific signaling pathways, including the modulation of phytohormones, with abscisic acid (ABA) being a key player. Given its importance in stress responses, quantification of ABA is an essential tool in physiological studies; however, traditional methodologies still face several limitations. In this context, high-performance liquid chromatography (HPLC) stands out as an available technique, offering high sensitivity, good resolution, and compatibility with thermolabile compounds. Therefore, the present study aimed to optimize and validate a method for ABA quantification by HPLC using small amounts of leaf tissue from different plant species. Plants (*Solanum lycopersicum*, *Vigna unguiculata*, and *Zea mays*) were grown in a greenhouse and subjected to saline stress with 100 mM NaCl for seven days. Leaves were harvested, and different ABA extraction methods—including solvents and resuspension strategies—were evaluated. Extracts were analyzed by HPLC using different mobile phases and flow rates. Maize yielded the highest ABA content and was selected for further analyses, with four replicates per treatment. HPLC analyses revealed species-specific differences in ABA detection. The method showed strong linearity ($R^2 = 0.9818$) for the standard curve. ABA levels tended to increase under saline stress in maize leaves. However, the t-test indicated a p-value > 0.05 , showing no statistically significant difference. Overall, solvent choice, mobile phase composition and flow rate, as well as chromatographic conditions and sample age, were crucial for method performance. Maize leaves exhibited the most consistent results, indicating a trend toward increased ABA levels under saline stress. However, further analyses are necessary to enhance reproducibility and reduce variability among replicates.

Keywords: ABA; phytohormone; chromatography, salt stress.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Material vegetal	18
3.2	Fluxograma do processo experimental	18
3.3	Extração do ABA	19
3.4	Identificação do ABA	20
3.5	Obtenção da curva padrão e quantificação do ABA	21
4	RESULTADOS	23
4.1	Comparativo das alterações no método de quantificação do ABA	23
4.2	Curva padrão e equação da reta	25
4.3	Obtenção de cromatogramas e quantificação do ABA em diferentes plantas ...	26
4.4	Comparação entre plantas de milho sob salinidade	29
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O aumento populacional elevou significativamente a demanda global por alimentos, insumos agrícolas e soluções urgentes para garantir a segurança alimentar sustentável (Varzakas e Smaoui, 2024). Esse cenário incita uma pressão crescente sobre os sistemas agrícolas, que precisam manter elevados níveis de produtividade, mesmo diante de condições ambientais desafiadoras (Müller, 2025). Alguns fatores externos têm contribuído para a limitação da produção agrícola em diversas regiões do mundo, tais como as mudanças climáticas, a degradação do solo, o uso excessivo de defensivos agrícolas e a irrigação inadequada (Fao, 2021; Ray et al., 2012; Tilman et al., 2002). Dito isso, o melhoramento genético (Zhang et al., 2017), o uso de bioestimulantes (Lana; Vasconcelos, 2015) e sistemas de irrigação mais eficientes (Jägermeyr et al., 2015) são exemplos das tecnologias que têm sido desenvolvidas a fim de superar esses entraves.

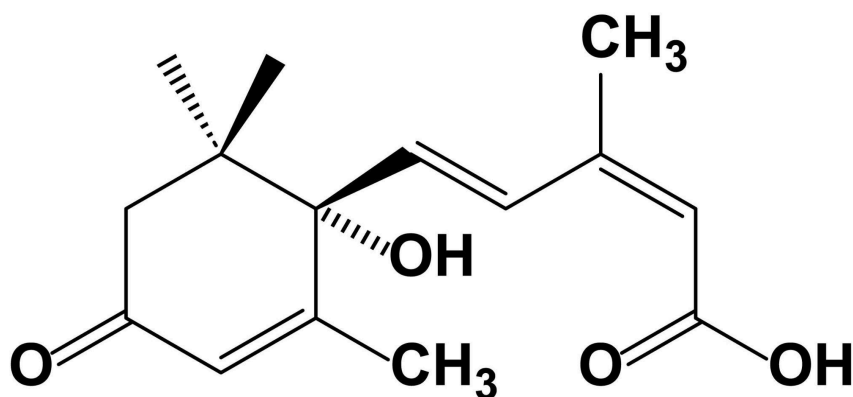
Um dos principais problemas encontrados na agricultura moderna é a dificuldade de desenvolvimento e sobrevivência das plantas frente a estresses abióticos (Zhu, 2016). Dentre os principais estresses abióticos que comprometem a produtividade agrícola, destaca-se a salinidade do solo, um problema que vem se agravando especialmente em áreas irrigadas de forma inadequada (FAO, 2021). Esse agravamento ocorre, sobretudo, quando a irrigação é realizada com água de má qualidade, ou sem manejo adequado de drenagem, o que favorece o acúmulo de sais no solo devido à evaporação da água, prejudicando a absorção hídrica pelas plantas. A salinização ocorre devido à baixa pluviosidade e acumulação de sais solúveis no solo, causada pela alta condutividade elétrica da água, drenagem deficiente, excesso de fertilizantes, além de processos naturais de intemperismo geológico (Rengasamy, 2006; Qadir et al., 2014). O aumento dos sais altera o potencial osmótico radicular, dificultando a absorção de água e nutrientes e afetando diretamente, assim, o metabolismo celular (Munns; Tester, 2008; Acosta-Motos et al., 2017). Essa condição provoca na planta um estresse oxidativo, comprometendo-a desde a germinação e estabelecimento da plântula até a produção de biomassa e frutos (Shrivastava; Kumar, 2015).

Para garantir sua homeostase, bem como, se aclimatar ao desequilíbrio causado pelas condições ambientais desfavoráveis, as plantas desencadeiam uma série de sinalizações específicas e respostas fisiológicas complexas (Peleg; Blumwald, 2011;

Tiwari et al., 2017), que implicam em alterações na expressão de genes (Yoshida et al., 2014), produção de metabólitos primários e secundários (Batista et al., 2019) e, especialmente, na modulação dos níveis de fitormônios, que desempenham papéis-chave na regulação de respostas ao estresse (Verma et al., 2016). Esses reguladores endógenos atuam na sinalização celular, ativando vias de defesa, regulando o crescimento e ajustando processos como a transpiração, o controle estomático e a senescência foliar (Ali et al., 2024). Além disso, podem ser usados como monitoramento de biomarcadores de estresse (Gupta et al., 2020), que por sua vez é uma técnica que tem se destacado como uma estratégia promissora para detectar precocemente a resposta das plantas a condições adversas, possibilitando intervenções mais rápidas e precisas.

O ácido abscísico (ABA) é um importante fitormônio, sintetizado a partir de precursores da rota dos terpenos, principalmente, em folhas senescentes (Cardoso et al., 2020), órgão que possui por sua vez as maiores concentrações desta molécula. Sua estrutura apresenta características anfipáticas (Figura 1), desempenhando um papel crucial na regulação de etapas do desenvolvimento vegetal, incluindo a inibição da germinação precoce e da transição para a fase reprodutiva (Wei et al., 2025), a indução de mecanismos de dormência e proteção contra dessecação (Zhang et al., 2022), além de participar do acúmulo de substâncias de reserva, como proteínas e lipídeos (Akhiyarova et al., 2021). Ademais, o ácido abscísico (ABA) está diretamente envolvido nas respostas das plantas a diversos estresses abióticos, especialmente aqueles que envolvem alterações no potencial hídrico, como seca e salinidade. Nesses contextos, sua concentração tende a aumentar significativamente, atuando como sinalizador na modulação de respostas fisiológicas e moleculares que contribuem para a adaptação ao estresse, como a ativação de genes de tolerância ao estresse, a inibição do crescimento radicular e a regulação do fechamento estomático (Nguyen et al., 2024). Essa inibição do crescimento radicular em ambientes salinos reduz a exposição das raízes a regiões altamente salinizadas do solo, minimizando o acúmulo tóxico de íons como o sódio (Na^+) e o cloro (Cl^-) (Huang et al., 2021). Por outro lado, a regulação estomática ajuda a conservar água e a controlar a entrada de íons tóxicos pela via radicular, contribuindo para a manutenção do balanço hídrico da planta sob condições adversas (Haverroth et al., 2023).

Figura 1 - Estrutura química do ácido abscísico - $C_{15}H_{20}O_4$ (ABA).



Fonte: Extraído de Mo et al. (2024), *Frontiers in Plant Science*.

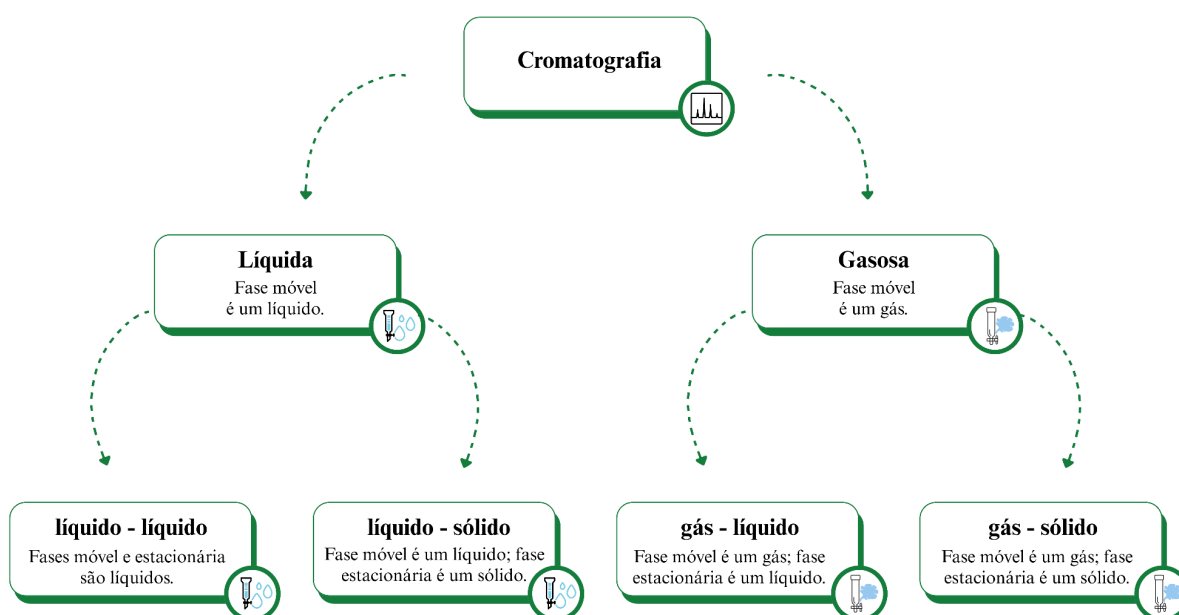
Dada a importância do ABA nas respostas às condições ambientais desfavoráveis e que auxiliam na sobrevivência da planta, sua quantificação é fundamental para responder perguntas chave, como por exemplo: Como o sinal ambiental altera concentrações endógenas do ABA? Quais ações consecutivas ocorrem para a aclimação ao ambiente? O entendimento do metabolismo do ABA frente a diferentes tipos de estímulos ambientais contribuem para o entendimento dos mecanismos envolvidos na resposta ao estresse (Verslues, 2016). Além disso, a quantificação de reguladores endógenos, como o ABA, contribui para a seleção de genótipos com melhor desempenho sob estresse, implicando diretamente na manutenção da produtividade em condições adversas. Ao identificar níveis críticos de ABA associados à tolerância ou sensibilidade ao estresse, é possível direcionar estratégias de manejo e melhoramento genético que minimizem perdas produtivas e otimizem a eficiência fisiológica das culturas. (Hossain et al., 2022).

Diversas metodologias têm sido empregadas para otimizar a extração e detecção desse fitormônio, como extrações com solventes distintos, técnicas assistidas por ultrassom, espectrofotometria e métodos cromatográficos, geralmente acoplados à espectrometria de massas (Lee et al., 2023; Pan et al., 2023). No entanto, apesar de amplamente empregadas, tais abordagens apresentam limitações significativas, como alto custo, protocolos experimentais complexos e restrições quanto à detecção em larga escala e equipamentos cada vez mais sofisticados e caros (Bordin et al., 2015; Chen et al., 2013). Além disso, os altos níveis de complexidade das matrizes vegetais, podem interagir

diretamente com o ABA comprometendo a obtenção de resultados confiáveis e precisos (Nambara; Marion-poll, 2005).

Para a separação e análise de compostos bioativos em matrizes complexas, como extratos vegetais, a cromatografia representa uma das técnicas mais eficientes e consolidadas na atualidade (Snyder; Kirkland; Dolan, 2011). Esse método fundamenta-se em princípios físico-químicos de separação dos componentes de uma amostra, no qual os compostos presentes nas amostras são fracionados por meio de suas respectivas interações com a fase estacionária (Silva; Borges, 2017). A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido, enquanto a fase móvel pode ser líquida ou gasosa (Figura 2), característica que implica, diretamente, no tipo de cromatografia a ser realizada (Poole, 2012). Na cromatografia gasosa, a separação ocorre com uma fase móvel gasosa que carrega compostos voláteis por uma coluna capilar com fase estacionária líquida ou sólida, sendo ideal para substâncias termicamente estáveis e voláteis (Collins et al., 2013). Já na cromatografia líquida, a fase móvel consiste em um líquido (água, metanol, acetonitrila, hexano, dentre outros) que permeia uma coluna preenchida com material estacionário (geralmente sílica), promovendo a separação com base em polaridade, interação hidrofóbica ou carga iônica (Gondim; Moura; Rocha, 2021), conforme ilustrado na Figura 2.

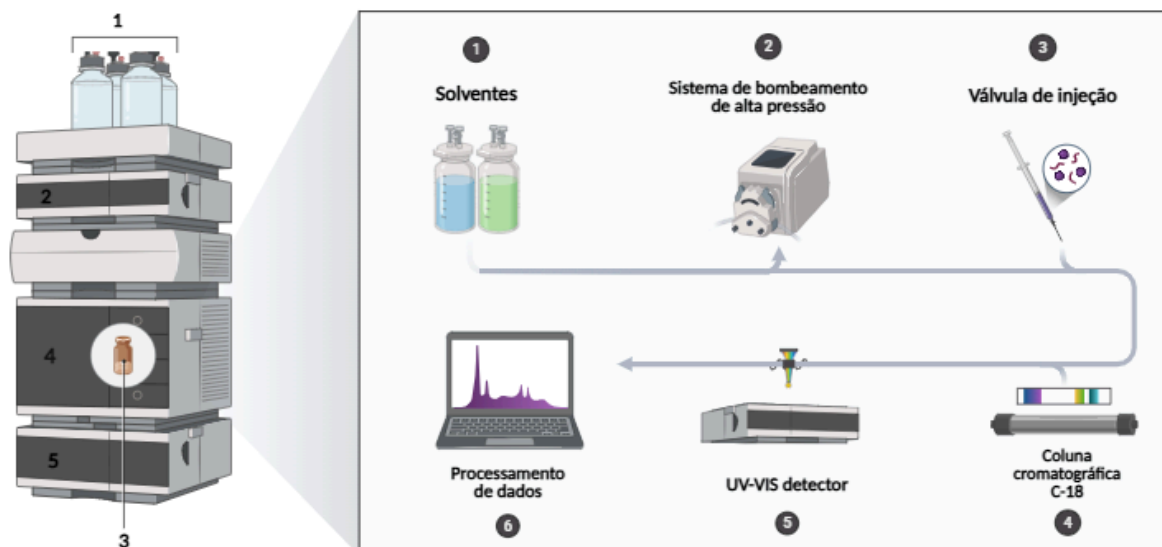
Figura 2 - Diagrama explicativo da classificação dos tipos de cromatografia conforme a combinação entre as fases móvel e estacionária.



Fonte: Elaborada pela autora.

No contexto da cromatografia líquida, destaca-se a cromatografia líquida de alta performance (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), na qual as interações entre o analito e a fase estacionária são otimizadas por meio de um controle preciso de pressão e temperatura, possibilitando sensibilidade e resolução na separação e quantificação de compostos (Snyder; Kirkland; Dolan, 2011), respectivamente, identificar pequenas quantidades do analito e separar compostos semelhantes. Diante disso, a HPLC se destaca como uma técnica indicada, especialmente, para amostras moderadamente polares e termolábeis, como o ABA, tendo em vista a versatilidade na escolha de fases móveis, compatibilidade com diferentes detectores e capacidade de operar em condições térmicas moderadas, evitando a degradação do analito (Pan et al., 2023). Para que a técnica de HPLC funcione de forma eficiente, seu sistema (Figura 3) é composto por um conjunto de elementos fundamentais, tais como o reservatório de solventes, o sistema de bombeamento de alta pressão, a válvula de injeção, a coluna cromatográfica, o detector e o sistema de aquisição e processamento de dados (Snyder; Kirkland; Dolan, 2011, conforme ilustrado na Figura 3. O solvente da fase móvel é conduzido desde o reservatório até a coluna por meio de uma bomba mecânica, passando previamente pelo injetor, onde a amostra é introduzida no fluxo do sistema e encaminhada para a coluna (Gondim; Moura; Rocha, 2021). A separação ocorre ao longo da coluna por meio de interações entre analito e matriz, e os compostos eluídos são detectados com base em propriedades físico-químicas específicas, como absorbância, fluorescência ou índice de refração (Borges, 2017). A informação gerada pelo detector é convertida em um sinal elétrico, o qual é processado pelo software conveniente e apresentado na forma de um gráfico denominado cromatograma que representa o sinal capturado de acordo com o tempo de retenção, ou seja, com a velocidade que este percorreu a coluna (Poole, 2012).

Figura 3 - Componentes do equipamento de HPLC (*High Performance Liquid Chromatograph*).



Fonte: Elaborada pela autora.

A aplicação do método de HPLC na quantificação de ABA associada à uma coluna C18 é comumente utilizada dada a elevada seletividade (Fu et al., 2011), curta duração das análises e, principalmente, pela eliminação da necessidade de derivatização, etapa onerosa e frequentemente obrigatória na técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS - *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*), e posteriormente a volatilização da matriz utilizando calor (Kim et al., 2019). Tendo em vista que esse fitormônio é um composto termolábil, sua exposição a altas temperaturas pode causar degradação significativa (Taiz et al., 2017), comprometendo, assim, o processo de identificação e, conseqüentemente, de quantificação do composto (Gomez-Cadenas et al., 2014). Sendo assim, a escolha da HPLC baseia-se, principalmente, na preservação da estabilidade química do composto frente às diversas técnicas analíticas disponíveis que comprometem a integridade de substâncias termolábeis como o ABA (Kim et al., 2019).

Por outro lado, os métodos analíticos tradicionalmente empregados na quantificação de fitormônios, como o ABA, frequentemente requerem técnicas de microextração, concentração, enriquecimento (Zhang et al., 2024), além de grandes quantidades de material vegetal para atingir limites de detecção compatíveis com a sensibilidade de detectores como o espectrofotômetro UV-visível (Smith et al., 2021). Embora existam abordagens alternativas, como ensaios imunológicos do tipo ELISA e técnicas de imunofluorescência, essas metodologias apresentam limitações quanto à especificidade, reprodutibilidade e

aplicabilidade em análises quantitativas de alta precisão. Tecnologias emergentes, como biossensores, também vêm sendo exploradas, mas ainda carecem de validação para uso em larga escala. Dessa forma, os métodos cromatográficos, especialmente quando acoplados à espectrometria de massas, permanecem como os mais robustos e confiáveis para a quantificação precisa de ABA em matrizes vegetais complexas.

Diante do exposto, e considerando a necessidade de métodos analíticos mais acessíveis e compatíveis com a natureza instável de fitormônios como o ácido abscísico, o presente trabalho visa padronizar parâmetros do preparo das amostras, bem como de condições cromatográficas que podem minimizar a degradação do composto durante a análise, assegurando confiabilidade nos dados obtidos por HPLC e, assim, possibilitar a quantificação do ABA a partir de quantidades reduzidas de biomassa de diferentes espécies vegetais.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Otimizar e validar um método de quantificação de ácido abscísico (ABA) por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) para diferentes amostras vegetais utilizando pequenas quantidades de folha.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar e preparar amostras de diferentes espécies vegetais, para análise de ácido abscísico (ABA).
- Padronizar um protocolo de extração de ácido abscísico (ABA) adequado a diferentes espécies, com baixas quantidades de amostra.
- Adaptar métodos existentes de quantificação de ABA por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando pouco material vegetal.
- Validar o método proposto quanto à sensibilidade, precisão, exatidão e reprodutibilidade em diferentes espécies vegetais.
- Comparar os níveis de ABA analisados em milho sob estresse salino.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

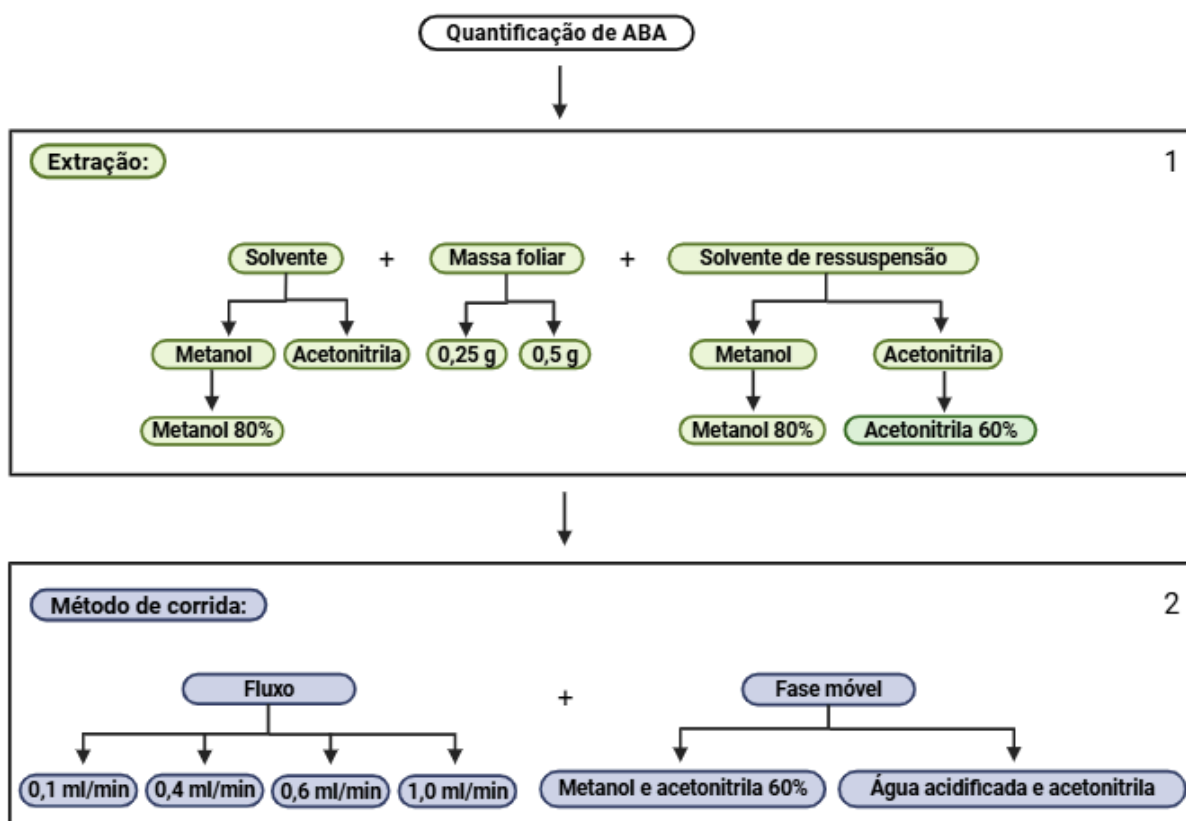
3.1 Material vegetal

Foram utilizadas amostras foliares de quatro espécies vegetais: *Solanum lycopersicum* L. (tomateiro), *Vigna unguiculata* L. (feijão-caupi), *Zea mays* L. (milho) e *Anacardium occidentale* L. (cajueiro). As amostras de tomate, feijão e milho foram coletadas de plantas cultivadas na casa de vegetação do Laboratório de Fisiologia Vegetal (LabFiVe), sob condições controladas (vermiculita e hidroponia). No que concerne às folhas de cajueiro, estas foram obtidas de um espécime localizado no Campus do Pici, não pertencente a um cultivo experimental.

3.2 Fluxograma do processo experimental

Para os procedimentos experimentais adotados no estudo foi seguido o fluxograma (Figura 4) que ilustra os parâmetros testados para otimizar a extração e quantificação do ABA, em amostras de material fresco de folha. Inicialmente, foi realizada a coleta em nitrogênio líquido, bem como seu armazenamento em *ultrafreezer* até sua pulverização onde, em sequência, foram testadas condições variadas de extração, incluindo o uso de solventes orgânicos distintos (metanol, metanol 80%, acetonitrila e acetonitrila 60%). Além disso, diferentes estratégias de ressuspensão do extrato concentrado também foram avaliadas. Após o processo de extração completo, os extratos foram analisados por HPLC, etapa na qual avaliou-se a influência de diferentes composições cromatográficas, fluxo (0.1 ml¹, 0.4 ml¹, 0.6 ml¹ e 1.0 ml¹) e fase móvel (metanol+acetonitrila e água acidificada 0,1% com ácido acético+acetonitrila), na eficiência da separação e detecção do ABA.

Figura 4 - Fluxograma do processo experimental para uniformização do método de quantificação do ABA. 1. Parâmetros alterados no processo de extração do ABA; 2. Parâmetros alterados no método de corrida cromatográfica.



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Extração do ABA

Inicialmente, foram pesadas massas de 0,25 g e 0,5 g de material previamente macerado em nitrogênio líquido, as quais foram transferidas para microtubos de 2 mL devidamente identificadas. Em seguida, foram adicionados 1.500 µL de solvente orgânico grau HPLC em cada amostra, evitando a metabolização do analito. Nessa etapa foram testadas três opções de solvente, sendo elas: acetonitrila pura, metanol puro e metanol 80%, diluído em água ultrapura.

Considerando a fotossensibilidade do ABA (Gao et al., 2016), cujos efeitos da luz incluem oxidação e degradação estrutural do composto, todas as etapas do processo de extração foram realizadas sob condições de proteção das amostras contra luz direta, a fim de preservar a integridade do analito. Além disso, para esse procedimento foram testadas

múltiplas condições experimentais baseadas em três variáveis principais: o tipo de solvente extrator, a quantidade de massa fresca foliar utilizada por amostra (0,25 g e 0,5 g) e o solvente de ressuspensão após secagem do extrato metanol, metanol 80%, acetonitrila e acetonitrila 60% (Pan et al., 2010; Fu et al., 2011).

As amostras foram então homogeneizadas em vórtex durante 10 segundos e posteriormente centrifugadas a 8.000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado e filtrado utilizando filtros de seringa em politetrafluoretileno (PTFE) hidrofílico, com porosidade de 0,22 µm, a fim de garantir a remoção completa de resíduos sólidos, e impurezas. Do extrato filtrado, 1.000 µL foram transferidos para novos microtubos, sendo então submetidos à evaporação completa sob vácuo em *speed vacuum* por aproximadamente 2 horas, até a remoção integral do solvente. Após o processo de secagem, as amostras foram ressuspensas em 100 µL do solvente orgânico grau HPLC respectivo a fase móvel de início da corrida cromatográfica, sendo elas: metanol puro, acetonitrila pura e acetonitrila 60%, diluída em ácido acético 0,1% (v/v água ultrapura). Em sequência, as amostras foram, novamente, agitadas em vórtex por 10 segundos e, em seguida, submetidas a rápida centrifugação (*spindown*) para eliminação de bolhas e partículas remanescentes. Por fim, 80 µL do conteúdo de cada amostra foram transferidos para *inserts* de vidro posicionados em *vials* âmbar e levados para injeção no HPLC.

3.4 Identificação do ABA

As análises cromatográficas foram conduzidas utilizando um sistema Shimadzu LC-20AD Prominence acoplado a um detector UV-vis, com uma coluna C18 HR-ODS, 250 mm x 3.0 mm (Shimadzu), sendo 'C18' uma coluna de fase reversa com cadeias de 18 átomos de carbono ligadas à sílica, conferindo caráter apolar e favorecendo a separação de compostos ideal para compostos anfipáticos como o ABA. O equipamento foi ajustado para leituras no comprimento de onda de 270 nm, que corresponde ao comprimento de absorção do ABA. Além disso, o modo de corrida foi feito utilizando eluição em gradiente, possibilitando a substituição gradual entre as fases móveis, a fim de garantir um tempo de retenção estável e picos mais definidos nas amostras testadas. Ao longo do processo de desenvolvimento do método de corrida, foram testadas diferentes condições cromatográficas, visando otimizar a

separação, o tempo de retenção e a intensidade de sinal do ABA. Os testes foram baseados na alteração de duas variáveis, principalmente: fluxo e fases móveis empregadas, utilizando como base metodologias anteriormente registradas na literatura (Nakurte et al., 2012; Silva et al., 2006).

Para o fluxo da fase móvel, foram avaliadas quatro velocidades distintas: 0,1 mL/min, 0,4 mL/min, 0,6 mL/min e 1,0 mL/min, com o objetivo de verificar a influência destas na resolução do pico cromatográfico. Tais valores foram escolhidos com base em estudos prévios que utilizaram fluxos entre 0,3 e 0,6 mL/min para quantificação de ABA por HPLC, visando boa resolução e sensibilidade (Qi et al., 2021; Zhang et al., 2024). As faixas extremas (0,1 e 1,0 mL/min) foram testadas para avaliar os limites operacionais da coluna utilizada. Quanto à composição da fase móvel, foram avaliadas duas combinações distintas, sendo elas: (1) Metanol grau HPLC e acetonitrila 60%, diluída em ácido acético 0,1% (v/v água ultrapura); (2) Acetonitrila grau HPLC e água acidificada 0,1% (v/v ácido acético). Em cada uma das combinações, a troca entre os solventes foi programada no *software* do equipamento (LC solution), de acordo com o gradiente testado (Tabela 1). O volume de injeção para todas as análises foi de 30 µL, com a temperatura da coluna em 30 °C, e um tempo total de corrida de 20 minutos por amostra. Após as corridas com os extratos puros, foi realizada a adição de ABA como padrão interno nas amostras vegetais. O aumento da área e a consistência no tempo de retenção entre os cromatogramas das amostras e das amostras com padrão interno foram usados para a confirmação da detecção do composto de interesse, descartando o efeito matriz.

Tabela 2 - Comparação das diferentes combinações experimentais testadas para otimização da extração e separação de ácido abscísico (ABA) por cromatografia líquida de alta performance (HPLC do inglês High Performance Liquid Chromatography), utilizando amostras de milho (*Zea mays*).

Tempo (min)	Água acidificada 0,1% (Concentração)	Acetonitrila (Concentração)
1	90%	10%
2	80%	20%
5	70%	30%
10	55%	45%
15	0%	100%
20	Parada	Parada

Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 Obtenção da curva padrão e quantificação do ABA

A quantificação do ABA foi realizada com base na curva padrão previamente construída a partir de soluções preparadas em concentrações conhecidas do fitormônio de alta pureza analítica (90769-25MG; (+)-Absciscic acid; Supelco). O padrão foi previamente solubilizado em acetonitrila grau HPLC para preparo da solução estoque concentrada de ABA (100 ng/mL), e mantida sob refrigeração a 4 °C, protegida da luz, a fim de preservar a estabilidade do analito. A partir da solução estoque de ABA (100 ng/mL), foi preparada uma solução intermediária de 10 ng/mL, a fim de reduzir erros de pipetagem durante o preparo dos padrões mais diluídos. A curva de calibração foi composta por dez pontos: 0; 0,5; 1; 2; 3,5; 5; 7,5; 10; 17,5 e 25 ng/mL. As soluções de 0 a 10 ng/mL foram obtidas por diluições seriadas da solução intermediária (10 ng/mL), enquanto os pontos de 17,5 e 25 ng/mL foram preparados diretamente a partir da solução estoque (100 ng/mL). Todas as diluições foram realizadas com acetonitrila grau HPLC, totalizando 1 mL por ponto da curva.

Cada solução foi homogeneizada em vórtex, transferidos 100 µL para *inserts* em *vials* e, em seguida, injetadas no sistema HPLC, utilizando volume de injeção de 30 µL. A curva padrão foi construída a partir da relação entre a área dos picos cromatográficos e as concentrações pré-estabelecidas. Assim, a inclinação da reta foi utilizada para determinar a

equação linear $y=ax+b$, bem como o coeficiente R^2 para verificar a confiabilidade do modelo.

Para investigar diferenças na concentração ABA em condições de estresse foram analisadas quatro amostras de milho submetidas a 100 mM de NaCl por 15 dias e quatro amostras de milho em condições controladas (Clark, 1975), totalizando, oito amostras. As análises foram baseadas na comparação das áreas dos picos cromatográficos correspondentes ao ABA, obtidas a partir dos cromatogramas gerados pelo sistema HPLC, e posterior realização de um teste t de Student ($t \geq 0.05$) utilizando o software Microsoft Excel®.

4 RESULTADOS

4.1 Comparativo das alterações no método de quantificação do ABA

Nas análises de 1 a 4 (0,25g), independentemente das alterações entre os solventes de ressuspensão e fluxos de 0,1 e 0,4 mL/min, não foi observado pico correspondente ao ABA (pico não detectável), bem como, foi percebido um tempo de retenção muito curto (Tabela 2). Nas análises 5 e 6 (0,25g), o aumento do fluxo para 0,6 mL/min resultou na formação de picos baixos e distorcidos, demonstrando melhora parcial na resposta, mas sem uma resolução satisfatória. As análises 7 e 8 (0,25g), com o fluxo mais elevado de 1,0 mL/min, voltaram a apresentar tempo de retenção curto e ausência de sinal detectável, sugerindo perda de eficiência na separação. A utilização de 0,5 g de massa foliar nas análises 9 e 10 promoveu alterações consideráveis na resposta cromatográfica, sendo o ensaio 10 o que apresentou o primeiro pico de resolução razoável, ainda que alargado, o que indica identificação do ABA em maior quantidade, mas com baixa resolução. Os ensaios 11 a 14 tornaram a ser realizados com 0,25g de massa foliar e mantiveram as demais condições, entretanto, o solvente de extração foi alterado para metanol 80%, e os fluxos de 0,4 a 0,6 mL/min foram, novamente, testados, porém os picos permaneceram baixos e distorcidos, sem melhoria significativa. Por fim, a análise 15, que utilizou acetonitrila como solvente de extração e ressuspensão, juntamente com alteração das fases móveis utilizadas, sendo estas compostas por água acidificada 0,1% e acetonitrila, foi a única amostra a apresentar um pico bem definido, indicando que a alteração das fases móveis apresentou um impacto significativo no potencial de separação da molécula. Diante disso, esse método de extração e parâmetros de corrida foram considerados com o melhor desempenho cromatográfico entre todos os testes realizados e utilizados nas análises subsequentes.

Tabela 2 - Comparação das diferentes combinações experimentais testadas para otimização da extração e separação de ácido abscísico (ABA) por cromatografia líquida de alta performance (HPLC do inglês High Performance Liquid Chromatography), utilizando amostras de milho (Zea mays).

Nº	Solvente de extração	Massa Foliar (g)	Solvente de ressuspensão	Fase móvel	Fluxo (ml/min)	Observações
1	Metanol	0,25	Metanol	Metanol + Acetonitrila 60%	0,1	Pico não detectável
2	Metanol	0,25	Acetonitrila	Metanol + Acetonitrila 60%	0,1	Pico não detectável
3	Metanol	0,25	Metanol	Metanol + Acetonitrila 60%	0,4	Pico não detectável
4	Metanol	0,25	Acetonitrila	Metanol + Acetonitrila 60%	0,4	Pico não detectável
5	Metanol	0,25	Metanol	Metanol + Acetonitrila 60%	0,6	Pico baixo e não definido
6	Metanol	0,25	Acetonitrila	Metanol + Acetonitrila 60%	0,6	Pico baixo e distorcido
7	Metanol	0,25	Metanol	Metanol + Acetonitrila 60%	1,0	Pico não detectável
8	Metanol	0,25	Acetonitrila	Metanol + Acetonitrila 60%	1,0	Pico não detectável
9	Metanol	0,5	Metanol	Metanol + Acetonitrila 60%	0,6	Pico baixo e não definido
10	Metanol	0,5	Acetonitrila	Metanol + Acetonitrila 60%	0,6	Pico médio e não definido
11	Metanol 80%	0,25	Acetonitrila	Metanol + Acetonitrila 60%	0,4	Pico baixo e não definido
12	Metanol 80%	0,25	Acetonitrila	Metanol + Acetonitrila 60%	0,4	Pico baixo e não definido
13	Metanol 80%	0,25	Acetonitrila	Metanol + Acetonitrila 60%	0,6	Pico baixo e não definido
14	Metanol 80%	0,25	Acetonitrila	Metanol + Acetonitrila 60%	0,6	Pico baixo e não definido
15	Acetonitrila	0,25	Acetonitrila	Água acidificada 0,1% + Acetonitrila	0,6	Pico intenso e definido

Fonte: Elaborada pela autora.

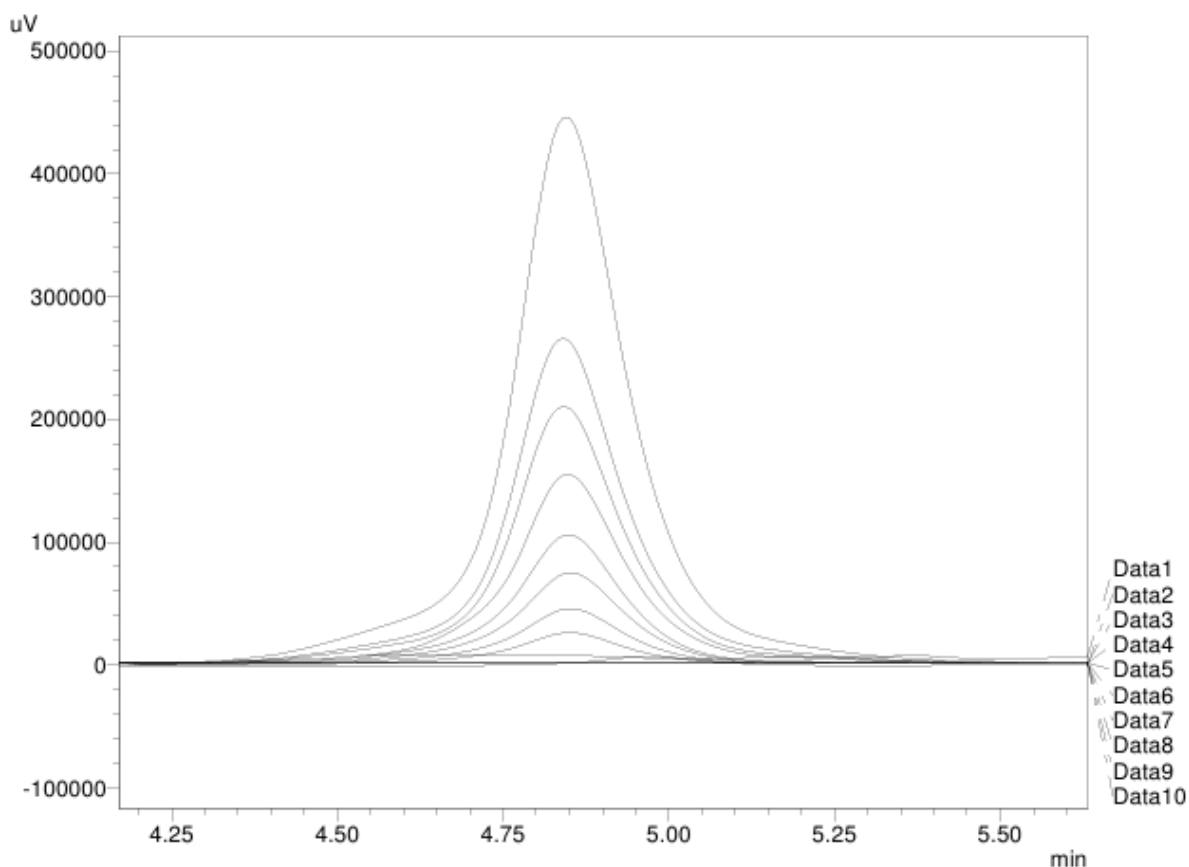
Legenda: As observações referem-se à qualidade do pico cromatográfico obtido sob cada condição. "Pico não detectável" indica ausência de sinal detectável; "pico baixo e não definido" refere-se a sinal fraco com

formato assimétrico; “pico definido” corresponde ao melhor desempenho observado, com sinal bem definido e centrado no tempo de retenção esperado para o ABA.

4.2 Curva padrão e equação da reta

A curva padrão apresentou uma relação linear entre concentrações conhecidas de ABA que variaram de 0 a 25 ng/mL e a área do pico cromatográfico de cada uma das amostras (Figura 5). A análise dos cromatogramas indicou o aumento da área dos picos de acordo com o aumento da concentração com um tempo de retenção em torno de 4,8 minutos. A equação da reta foi $Y = 226951x + 121618$, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9818, indicando excelente linearidade e que a função pode ser usada confiavelmente para cálculo de concentração ($R^2 > 0.95$). O valor de R^2 permite a quantificação precisa do ABA nas amostras, bem como, garante confiabilidade ao método (Figura 6).

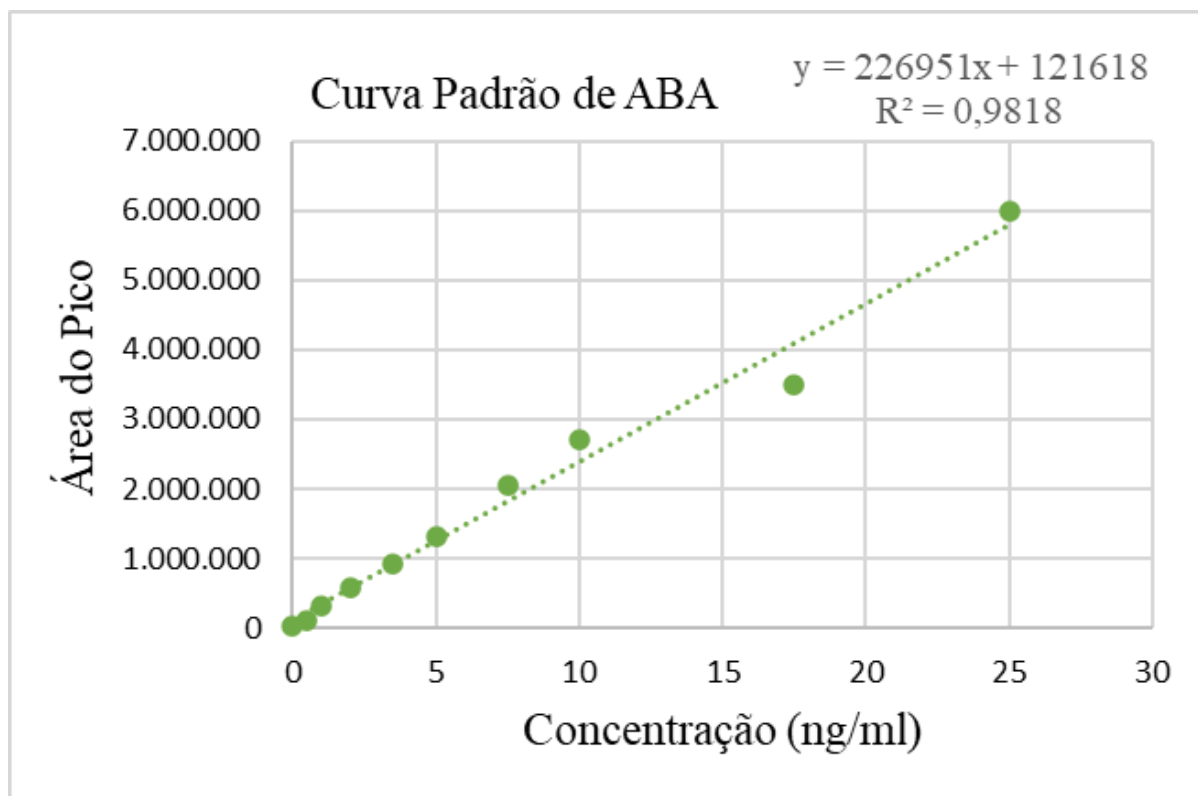
Figura 5 - Cromatogramas sobrepostos das soluções padrão de ABA em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Data 1 - Ponto 1 (0 ng/ml) ; Data 2 - Ponto 2 (0,5 ng/ml) ; Data 3 - Ponto 3 (1,0 ng/ml) ; Data 4 - Ponto 4 (2,0 ng/ml) ; Data 5 - Ponto 5 (3,5 ng/ml) ; Data 6 - Ponto 6 (5,0 ng/ml) ; Data 7 - Ponto 7 (7,5 ng/ml) ; Data 8 - Ponto 8 (10,0 ng/ml) ; Data 9 - Ponto 9 (17,5 ng/ml) ; Data 10 - Ponto 10 (25,0 ng/ml).

Figura 6 - Representação gráfica da curva padrão de ABA.



Fonte: Elaborada pela autora.

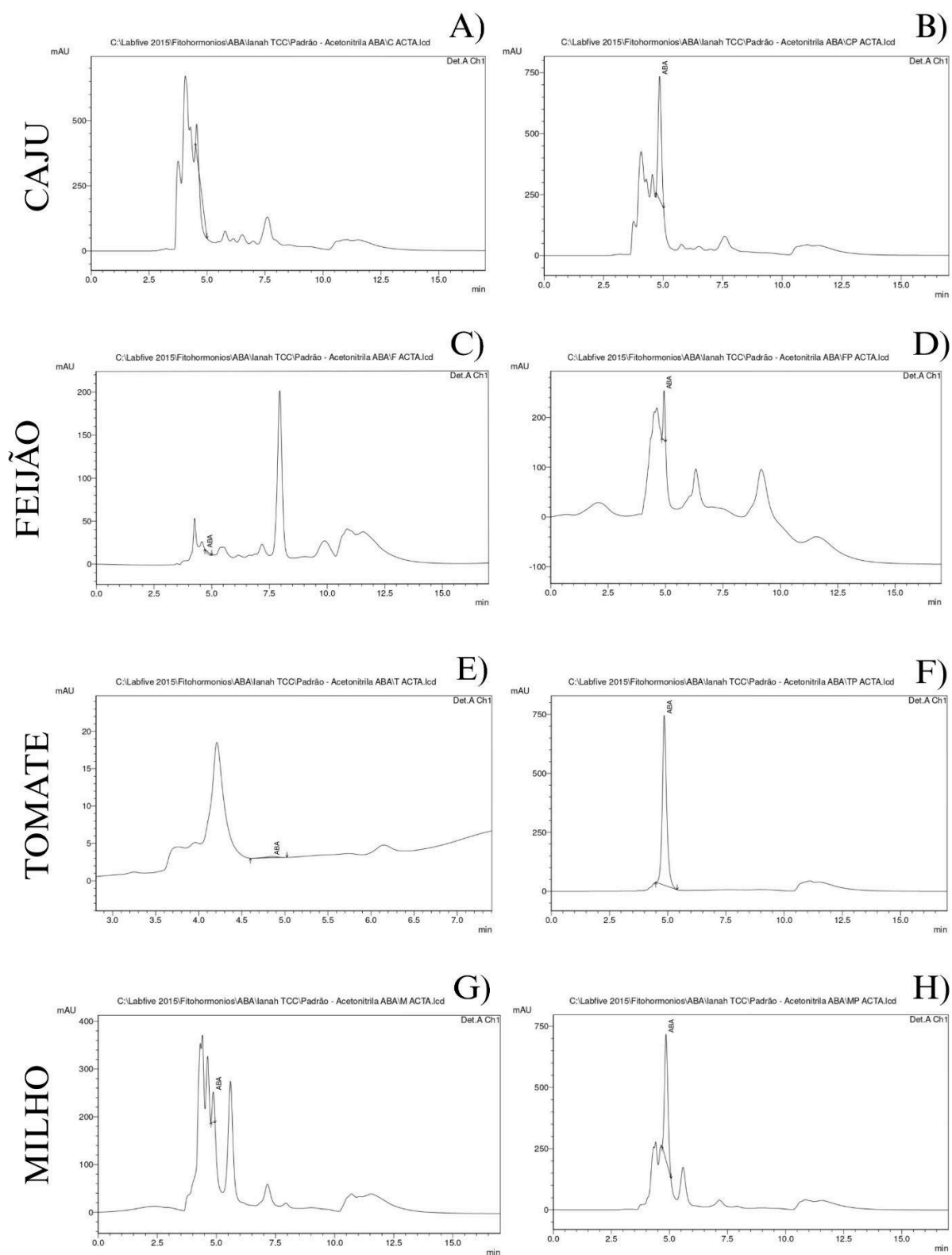
Legenda :Curva padrão do ácido abscísico (ABA) obtida a partir de concentrações crescentes 0; 0,5; 1; 2; 3,5; 5; 7,5; 10; 17,5 e 25 ng/mL do fitormônio (Eixo X) e área do pico cromatográfico (Eixo Y).

4.3 Obtenção de cromatogramas e quantificação do ABA em diferentes plantas

Amostras de diferentes vegetais foram extraídas de acordo com a combinação de métodos citada anteriormente (Tabela 1). Os cromatogramas obtidos para as diferentes espécies vegetais revelaram variações significativas na resposta cromatográfica à separação do ABA, antes e após a co-injeção do padrão de ácido abscísico (ABA). Em folhas de *Anacardium occidentale* (cajuero), não foi observado um pico compatível com o tempo de retenção do ABA na amostra pura, e mesmo após a co-injeção o sinal permaneceu fraco e

sobreposto a interferentes, indicando, assim, concentração extremamente baixa do fitormônio ou forte inibição causada pelo efeito da amostra (Figura 7A e 7B). Nas amostras de folhas de *Vigna unguiculata* L. (feijão-caupi), o cromatograma inicial apresentou perfil desorganizado, com diversos picos fora do tempo de retenção esperado; após a co-injeção com o padrão, foi observado um pico compatível com o ABA, mas ainda sobreposto a interferências, possivelmente agravadas pela imaturidade das folhas utilizadas (Figura 7C e 7D). Em *Solanum lycopersicum* (tomate), observou-se um pico discreto no tempo de retenção característico do padrão, porém com área muito baixa, a co-injeção resultou em aumento expressivo da intensidade, confirmando a presença do composto, entretanto em baixa concentração (Figura 7E e 7F). Por fim, em *Zea mays* (milho), foi identificado o melhor desempenho cromatográfico, com pico aparente, no tempo de retenção esperado, embora apresentado com um eixo de base fora do desejado. Após a co-injeção, identificou-se um pico de ABA mais intenso e bem definido (Figura 7G e 7H). No entanto, mesmo com bom desempenho, é notório a interferência da matriz vegetal, dificultando a separação total do sinal do ABA.

Figura 7 - Cromatogramas representativos da detecção de ácido abscísico (ABA) por HPLC nas diferentes espécies vegetais analisadas, antes e depois da co-injeção com o padrão de ABA.



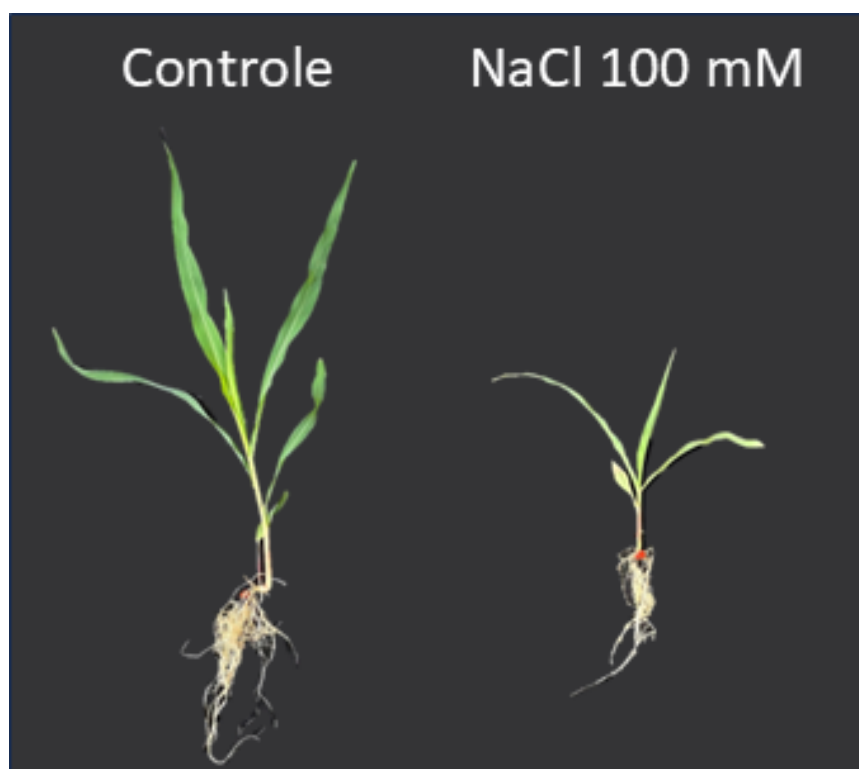
Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: A) Amostra de caju; B) Amostra de caju com adição de padrão interno; C) Amostra de feijão; D) Amostra de feijão com padrão interno; E) Amostra de tomate; F) Amostra de tomate com padrão interno; G) Amostra de milho; H) Amostra de milho com padrão interno; Entre as espécies avaliadas, apenas tomate (*Solanum lycopersicum*) e milho (*Zea mays*) apresentaram pico cromatográfico correspondente ao de ABA.

4.4 Comparação entre plantas de milho sob salinidade

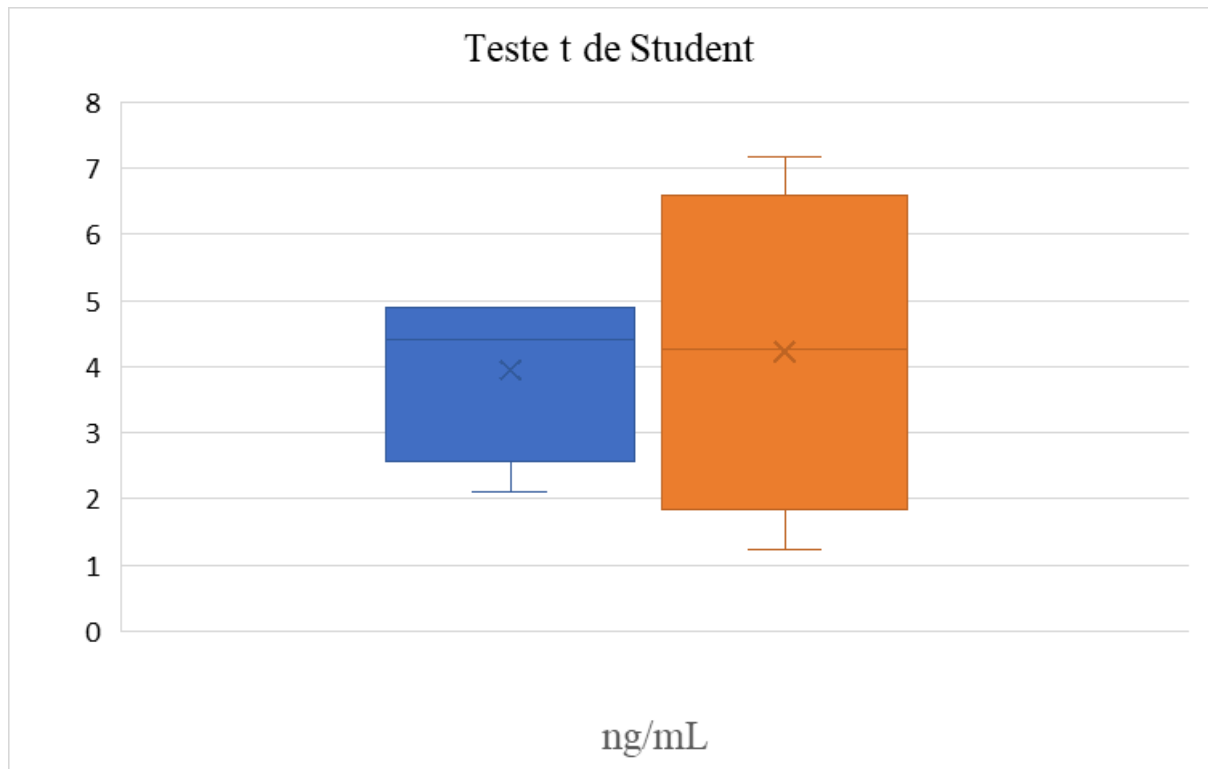
As amostras de milho submetidas ao estresse salino apresentaram significativas alterações morfológicas, típicas de estresse abiótico, como sinais visíveis de estresse, redução do crescimento vegetativo, menor desenvolvimento radicular e amarelecimento das folhas, quando comparadas às plantas controle (Figura 8). Contudo, ao analisar as áreas dos picos cromatográficos de ABA, não foi observada diferença estatística entre os grupos (teste $t \geq 0.05$).

Figura 8 - Comparação visual entre plantas de milho (*Zea mays*) cultivadas em condições controle e sob estresse salino induzido por NaCl (100 mM).



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 9 - Representação gráfica da diferença estatística entre amostras de milho (*Zea mays*) cultivadas em condições controle e sob estresse salino induzido por NaCl (100 mM).



Fonte: Elaborada pela autora.

Legenda: Não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos (teste $t = 0,8512$).

5 DISCUSSÃO

A diversidade entre as metodologias existentes para quantificação de ABA é uma questão notável na literatura (Nakurte et al., 2012; Pan et al., 2010; Zhang et al., 2024; Mo et al., 2024). Fato esse que reflete tanto a complexidade das matrizes vegetais, caracterizadas por uma grande diversidade de compostos orgânicos, como fenólicos, açúcares, pigmentos e lipídios (Pan et al., 2010; Novak e Ljung, 2014), quanto a necessidade de variação nos métodos cromatográficos para identificar com precisão cada uma delas. Com base nisso, mudanças nas técnicas de extração, escolha de solventes utilizados na etapa de ressuspensão, alteração nas fases móveis e condições de corrida variam significativamente entre artigos, refletindo diretamente na eficiência e sensibilidade do método (Forcat et al., 2008; Zhang et al., 2024).

Durante a etapa de extração, a escolha do solvente revelou-se um parâmetro importante para a resolução do pico, dado o potencial extrator de cada um e afinidade pelo fitormônio. A utilização de acetonitrila grau HPLC como solvente principal, tanto na extração quanto na ressuspensão, apresentou maior eficiência, quando comparada ao uso de metanol ou misturas hidroalcoólicas. Essa observação é amplamente embasada na literatura por estudos que destacam a acetonitrila como solvente superior na extração de fitormônios devido à sua menor polaridade e maior compatibilidade com fases móveis comumente utilizadas em HPLC (Pan, 2015; Forcat, 2016). Além disso, foi observada uma melhora significativa na resolução dos picos cromatográficos ao utilizar uma fase móvel composta por água ultrapura acidificada com ácido acético 0,1% (v/v), em gradiente com acetonitrila, quando comparada ao uso de metanol em gradiente com acetonitrila 60%. Essa escolha metodológica foi fundamentada em estudos que revelam que o metanol, apesar de amplamente utilizado como componente de fase móvel, apresenta elevada força eluente, o que pode reduzir o tempo de retenção do ABA, comprometendo a separação adequada do composto em meio a uma matriz complexa (Santner, 2015; Novak, 2016). A utilização de uma fase inicial menos orgânica, como a água acidificada, seguida de um aumento gradual da concentração de acetonitrila, demonstra maior retenção do ABA na coluna, e a melhora na separação dos analitos, possibilitando a obtenção de picos mais definidos e com maior reprodutibilidade (Liu, 2017). Sendo assim, o uso de um método de gradiente equilibrado, no que concerne a polaridade e força eluente demonstrou-se mais satisfatório para a análise cromatográfica do ABA.

No que diz respeito à quantificação do ABA endógeno, a construção da curva padrão foi um aspecto primordial para garantir a precisão do método. Embora a literatura aponte valores superiores a 0,99 como ideais para métodos cromatográficos de quantificação hormonal (Zadraznik, 2021), a curva construída apresentou boa linearidade ($R^2 = 0,9818$) entre a faixa de concentração de 0,5 a 25 $\mu\text{g/mL}$, bem como, foi construída sem a exclusão de nenhum ponto experimental, o que garante a representatividade dos dados, o que também pode ser observado pela sobreposição dos picos obtidos (Figura 5). Ademais, a reta linear obtida permite a quantificação confiável do ABA nas amostras vegetais avaliadas, mantendo-se dentro de um padrão aceitável de qualidade analítica.

As diferenças observadas entre as espécies vegetais analisadas foram de extrema relevância para a escolha dos parâmetros utilizados no método de extração e corrida do ABA. No caju, foi observada ausência de pico detectável do ABA, tanto na amostra pura, como na amostra com o padrão interno, resposta essa que pode ser atribuída principalmente à complexidade da matriz vegetal (Alves et al., 2023). As folhas do caju apresentam elevada concentração de compostos secundários, como flavonóides e outros metabólitos antioxidantes, além de uma estrutura celular complexa, com alto teor de lignina, que dificultam a extração eficiente do fitormônio (Rodrigues, 2020). De forma similar, o feijão também demonstrou ausência de pico detectável do ABA, isso pode ter sido influenciado pela idade das folhas utilizadas um fator influente nesse resultado. Folhas jovens tendem a apresentar maiores teores de compostos fenólicos, açúcares solúveis e outras substâncias que atuam como interferentes na extração e na detecção do fitormônio (Zhou, 2017), além de menor concentração de ABA endógeno, maior atividade enzimática e estrutura celular menos organizada, o que pode dificultar a liberação eficiente do ABA. Dessa forma, a ausência de sinal detectável reforça a importância da padronização do estágio de desenvolvimento das folhas. Já o tomate e o milho apresentaram picos detectáveis de ABA, entretanto, com intensidades distintas. No tomate, a matriz vegetal menos lignificada e com menor complexidade favoreceu a recuperação do fitormônio, facilitando sua extração e análise cromatográfica (Müller, 2020). No entanto, a baixa massa foliar utilizada na extração, bem como a presença de variados compostos secundários, comprometem a intensidade do sinal detectado. Já no milho, embora a mesma massa tenha sido empregada, a intensidade do pico foi consideravelmente maior. Isso pode ser atribuído à maior concentração endógena de ABA nas folhas de milho e à composição da matriz, que favorece a extração do hormônio e reduz a interferência de compostos supressores de sinal (Zhou, 2017). Nesse contexto, é importante

ressaltar que a utilização de pequenas quantidades de massa foliar impõe limitações à aplicação de ajustes baseados exclusivamente no aumento da biomassa. No caso do tomate, apesar de apresentar pico com linha de base estável, a intensidade do sinal de 6 mAU sugere que o acréscimo de massa seja capaz de intensificar o sinal (Kanno et al., 2010), entretanto, essa estratégia não se alinha à proposta metodológica do trabalho. Em contrapartida, embora a amostra de milho, tenha apresentado eixo de base fora do padrão desejado, a intensidade do sinal na faixa de ~ 300 mAU indica que a distorção observada na base do pico pode ser corrigida por meio do aprimoramento do método cromatográfico (Gao et al., 2016), como etapas de purificação mais intensas, sem a necessidade de alterar a quantidade de amostra, característica que se adequa melhor a abordagem sugerida no presente estudo. Portanto, as diferenças na resposta cromatográfica entre as duas espécies, mesmo sob mesmas condições de extração, massa foliar e corrida, refletem as particularidades fisiológicas e químicas de cada planta, evidenciando a importância de se considerar a natureza da matriz vegetal na interpretação dos resultados.

O comportamento de plantas de milho (*Zea mays*) submetidas à salinidade é cercado por uma diversidade de efeitos amplamente relatados na literatura (Zörb. et al., 2019), como alterações morfológicas, redução no crescimento vegetativo, inibição da absorção de nutrientes e aumento de fitormônios relacionados ao estresse, como o ABA (Nguyen et al., 2024). No entanto, apesar da diferença visual marcante entre as plantas de milho sob estresse salino e o grupo controle, a análise das áreas dos picos cromatográficos de ABA não apresentaram diferença estatística significativa entre os grupos (teste $t \geq 0.05$), sugerindo que o estresse salino não promoveu um aumento detectável do fitormônio (Figura 9). Tal resultado pode estar relacionado à limitação do sistema de detecção (UV- Visível) do equipamento utilizado, o qual pode ter comprometido a capacidade de quantificação de ABA em baixas concentrações (Duan. et al., 2020).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a otimização de um método eficiente para a detecção de ABA em *Zea mays* (milho) e *Solanum lycopersicum* (tomate), demonstrando aplicabilidade em matrizes vegetais com características fisiológicas distintas. A escolha do solvente com potencial extrator ideal, o ajuste na fase móvel utilizada e a determinação das condições de corrida, revelaram-se fatores determinantes no bom desempenho do método. Além disso, a linearidade obtida na curva padrão, associada à boa reprodutibilidade dos picos em espécies como milho e tomate, garantiu a confiabilidade do protocolo aplicado. A aplicação do método a amostras de milho submetidas ao estresse salino, comparadas ao grupo controle por meio de teste t de Student, não revelou diferenças estatisticamente significativas na concentração de ABA, sugerindo que, nas condições analisadas, o estresse não induziu acúmulo detectável do fitormônio. Ademais, a ausência de pico detectável em amostras foliares de caju e feijão, indicam limitações relevantes no tocante à complexidade das diferentes matrizes e ao estágio de desenvolvimento foliar, reforçando a necessidade de ajustes específicos para cada tipo de material vegetal. Esses resultados evidenciam que, mesmo sob condições padronizadas, a resposta cromatográfica pode variar significativamente devido às características fisiológicas e bioquímicas peculiares de cada amostra. Embora o método tenha se mostrado eficiente para a detecção do ABA em diferentes espécies vegetais, sua capacidade de quantificação ainda foi limitada, possivelmente em função da baixa sensibilidade do detector utilizado. Diante disso, recomenda-se que estudos futuros explorem estratégias de purificação, para remoção de interferentes, principalmente para matrizes mais complexas, bem como o uso de detectores mais sensíveis ou métodos acoplados, como LC-MS, para aumentar a seletividade e reduzir os limites de detecção em espécies com baixa concentração do fitormônio. Ademais, a avaliação de diferentes estágios de desenvolvimento foliar e a ampliação do número de espécies analisadas podem fornecer uma visão mais abrangente da dinâmica do ABA em tecidos vegetais.

REFERÊNCIAS

- HOSSAIN, M. A. et al. Role of ABA in the regulation of root architecture under abiotic stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 44, n. 7, p. 1–14, 2022.
- NGUYEN, H. C. et al. Absciscic acid: a central regulator of plant abiotic stress responses. *Plant Stress*, v. 9, 2024.
- VERMA, V.; RAVINDRAN, P.; KUMAR, P. P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2016.
- ZHU, J. K. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, v. 167, n. 2, p. 313–324, 2016.
- ALVES, P. C. et al. UPLC-QTOF-MSE-based metabolic profile to screening candidates of biomarkers of dwarf-cashew clones resistant and susceptible to anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 34, n. 11, p. 1652–1668, 2023.
- BATISTA, V. C. V. et al. Salicylic acid modulates primary and volatile metabolites to alleviate salt stress-induced photosynthesis impairment on medicinal plant *Egletes viscosa*. *Environmental and Experimental Botany*, v. 167, p. 103870, 2019.
- FU, J.; SUN, X.; WANG, J.; CHU, J.; YAN, C. Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Science Bulletin*, v. 56, p. 355–366, 2011.
- MO, W. et al. Unveiling the crucial roles of absciscic acid in plant physiology: implications for enhancing stress tolerance and productivity. *Frontiers in Plant Science*, v. 15, 2024.

NAKURTE, I.; KEISA, A.; ROSTOKS, N. Development and validation of a reversed-phase liquid chromatography method for the simultaneous determination of indole-3-acetic acid, indole-3-pyruvic acid, and abscisic acid in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2012.

PAN, X.; WELTI, R.; WANG, X. Quantitative analysis of major plant hormones in crude plant extracts by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Nature Protocols*, v. 5, n. 6, p. 986–992, 2010.

SANTNER, A.; CALDERON-VILLALOBOS, L. I. A.; ESTELLE, M. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, v. 5, n. 5, p. 301–307, 2012.

GAO, F. et al. Photoprotectant improves photostability and bioactivity of abscisic acid under UV radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 158, p. 99–104, 2016.

SILVA, E. A. A. et al. Determinação dos teores de ácido abscísico durante a fase de maturação de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 28, n. 3, p. 63–70, 2006.

AKHIYAROVA, G. et al. The role of ABA in plant adaptation to drought and salinity stress. *Plants*, v. 10, n. 8, p. 1933, 2021.

ALI, J. et al. Harnessing phytohormones: advancing plant growth and defence strategies for sustainable agriculture. *Physiologia Plantarum*, v. 176, n. 3, 2024.

CARDOSO, A. A. et al. Biossíntese, transporte e mecanismos de sinalização do ácido abscísico em plantas. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 18, n. 2, p. 83–97, 2020.

FAO. The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW) – systems at breaking point. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Roma, 2021.

GUPTA, A. et al. Role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in stress management. *Plant Cell Reports*, v. 39, n. 12, p. 1553–1572, 2020.

HAVERROTH, M. et al. Estresses ambientais e suas influências na fisiologia vegetal: uma abordagem sobre estresses hídricos e térmicos. *Revista Agropecuária Catarinense*, v. 36, n. 2, p. 41–46, 2023.

HUANG, H. et al. Comparative transcriptome analysis reveals regulatory mechanisms of abscisic acid-mediated salt tolerance in *Populus euphratica*. *Tree Physiology*, v. 41, n. 2, p. 183–200, 2021.

JÄGERMEYR, J. et al. Integrated crop water management might sustainably halve the global food gap. *Environmental Research Letters*, v. 10, n. 2, p. 025002, 2015.

MÜLLER, C. The changing landscape of food production. *Nature Sustainability*, v. 8, p. 234–240, 2025.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, v. 59, p. 651–681, 2008.

PELEG, Z.; BLUMWALD, E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, n. 3, p. 290–295, 2011.

QADIR, M. et al. Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Natural Resources Forum*, v. 38, n. 4, p. 282–295, 2014.

RENGASAMY, P. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 5, p. 1017–1023, 2006.

SHRIVASTAVA, P.; KUMAR, R. Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 22, n. 2, p. 123–131, 2015.

TIWARI, S. et al. Stress responsive microRNAs in plants: roles in stress regulation and adaptation. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, 2017.

VARZAKAS, T.; SMAOUI, S. Global food security and sustainability issues: the road to 2030 from nutrition and sustainable healthy diets to food systems change. *Foods*, v. 13, n. 2, p. 306, 2024.

WEI, Y. S. et al. Mechanisms of abscisic acid (ABA)-mediated plant defense responses: an updated review. *Plant Stress*, v. 15, 2025.

YOSHIDA, T. et al. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 21, p. 133–139, 2014.

ZHANG, D. P. et al. Advances in the roles of ABA in response to stress. *Journal of Plant Physiology*, v. 219, p. 85–96, 2022.

ZHANG, J. et al. Crop improvement for stress tolerance: achievements and prospects. *The Plant Genome*, v. 10, n. 3, 2017.

BORDIN, D. et al. Estratégias analíticas aplicadas à quantificação de hormônios vegetais. *Química Nova*, v. 38, n. 9, p. 1229–1237, 2015.

BORGES, C. F. Fundamentos de cromatografia líquida e suas aplicações. *Revista Científica da FAMINAS*, v. 13, n. 2, p. 151–164, 2017.

CHEN, H. et al. Recent advances in methods for determination of phytohormones by chromatography and mass spectrometry. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, v. 45, p. 25–45, 2013.

COLLINS, C. H. et al. Fundamentos de cromatografia gasosa. *Química Nova na Escola*, v. 35, n. 2, p. 112–118, 2013.

GONDIM, D. M.; MOURA, E. F.; ROCHA, R. L. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): fundamentos, instrumentação e aplicações. *Revista Brasileira de Educação em Ciências e Saúde*, v. 4, n. 1, p. 63–79, 2021.

ACOSTA-MOTOS, J. R. et al. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy*, v. 7, n. 1, p. 18, 2017.

LEE, H. et al. Recent trends in mass spectrometric analysis of abscisic acid: challenges and perspectives. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 42, p. 175–190, 2023.

NAMBARA, E.; MARION-POLL, A. Absciscic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, v. 56, p. 165–185, 2005.

PAN, X. et al. Analytical approaches to plant hormones: recent advances and future perspectives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 415, p. 2095–2112, 2023.

POOLE, C. F. Gas chromatography. **Elsevier**, Amsterdam, 2012.

SILVA, J. M.; BORGES, M. F. Introdução à cromatografia: fundamentos e aplicações. *Caderno de Química*, v. 28, n. 1, p. 89–101, 2017.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. Wiley, Hoboken, 2011.

VERSLUES, P. E. ABA and cytokinins: challenge and opportunity for plant stress research. *Plant Molecular Biology*, v. 91, p. 629–640, 2016.

GARCIA, M.; LEE, S. Analytical limitations in phytohormone detection from low-biomass samples. *Plant Methods*, v. 18, p. 112–121, 2022.

GOMEZ-CADENAS, A. et al. Hormonal interplay in salt stress tolerance in citrus. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, n. 21, p. 5995–6006, 2014.

KIM, J. et al. Advances in derivatization techniques for GC–MS-based metabolomics. *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*, v. 118, p. 706–716, 2019.

SMITH, A. M. et al. UV-visible detection limits and sensitivity in phytohormone quantification. *Analytical Letters*, v. 54, n. 10, p. 1607–1617, 2021.

WANG, Y. et al. Miniaturized analytical systems for plant hormone quantification. *Plant Methods*, v. 19, p. 56–66, 2023.

ZHANG, J. et al. High-Performance Liquid Chromatographic quantification of the plant hormone abscisic acid at ppb levels in plant samples after a single immunoaffinity column cleanup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 72, n. 20, p. 11794–11803, 2024.

CHEN, L.; YE, W. Chromatographic techniques in plant hormone analysis. *Journal of Analytical Science and Technology*, v. 8, 2017.

FORCAT, S. et al. Signaling roles of abscisic acid in roots. *Plant Signaling & Behavior*, v. 3, n. 8, p. 591–593, 2008.

LIU, T. et al. Chromatographic separation techniques for plant hormone analysis: a review. *Journal of Chromatography B*, v. 1060, p. 286–295, 2017.

MULLER, M. Hormone profiling in tomato plants: insights into tissue specificity and developmental regulation. *Plant Physiology Reports*, v. 25, p. 224–233, 2020.

RODRIGUES, M. D. Potencial bioativo das folhas de cajueiro-anão: uma análise fitoquímica e farmacológica. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 22, n. 1, p. 12–20, 2020.

SILVA, E. A. A.; BRAGA, E. A.; BRITO, K. M.; VINECKY, F.; ANDRADE, A. C. Determinação dos teores de ácido abscísico durante a fase de maturação de sementes de *Coffea arabica* e *Coffea canephora*. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 28, n. 3, p. 63–70,

2006.

ZHOU, M. B. Tissue-specific hormonal balance and metabolism during plant stress responses. *Plant Cell Reports*, v. 36, n. 8, p. 1235–1246, 2017.

ZADRAZNIK, T. Advances in plant hormone quantification by chromatography techniques. *Journal of Plant Physiology*, v. 256, 2021.

DUAN, L. et al. Challenges in quantifying low-abundance plant hormones: detection limits and matrix effects. *Plant Methods*, v. 16, p. 1–13, 2020.

ZÖRB, C.; SCHMIDT, C.; HANITZ, J. Salinity stress in maize: effects on growth, nutrient uptake, and metabolic processes. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 39, p. 16, 2019.