

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

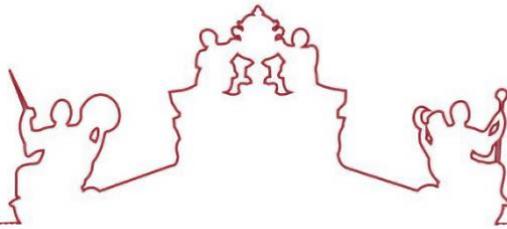
Métodos de deteção do glifosato e do ácido xiquímico em plantas do montado alentejano

Joaquim Pedro Mirão Caeiro

Orientador(es) | Dora Martins Teixeira
Isabel Brito

Évora 2022





Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

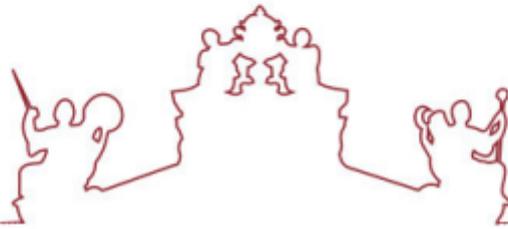
Métodos de deteção do glifosato e do ácido xiquímico em plantas do montado alentejano

Joaquim Pedro Mirão Caeiro

Orientador(es) | Dora Martins Teixeira
Isabel Brito

Évora 2022





A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ana Vitória Dordio (Universidade de Évora)

Vogais | Dora Maria Teixeira (Universidade de Évora) (Orientador)
Jorge Miguel Silva Faria (Universidade de Évora) (Arguente)

Agradecimentos

Queria deixar uma pequena marca de apreciação por todas as pessoas, que direta ou indiretamente me ajudaram durante esta fase deste percurso académico.

Em primeiro lugar, gostaria de exprimir a minha gratidão para com a orientadora, professora Dora Martins Teixeira. Queria agradecer por ter aceite ser minha orientadora, por todo o auxílio prestado durante a realização deste trabalho, mesmo quando as coisas não corriam bem, estava lá a assegurar que tudo corria como devia de ser no fim. Por tudo isto, a minha profunda gratidão e admiração;

Quero também agradecer à professora Isabel Brito, por me ter recomendado seguir este caminho, e também pelo auxílio prestado enquanto orientadora, não só de mestrado, mas também de licenciatura;

Sem esquecer, queria agradecer a todas as pessoas, que de alguma maneira, interagiram comigo durante a minha estadia pelo laboratório HERCULES. Gostaria de poder agradecer a todos de igual modo, mas a lista seria interminável, por isso, queria agradecer a todos os professores, doutores, funcionários e demais pessoas pertencentes à equipa que dá vida ao laboratório HERCULES;

À minha turma de mestrado, com quem passei estes últimos 2 anos;

Como é normal nestas etapas, levamos sempre alguém mais em conta, seja porque razões for. Quero estender este agradecimento à Teresa Gafanhoto, à Sofia Silva e em especial, ao João Nunes, pelos excelentes momentos proporcionados durante estes anos de mestrado, e que espero que continuem no futuro.

Quero agradecer ao Ricardo Gato, à Juliana Margalho e ao Rúben Santos por terem estado presentes durante esta etapa académica e que continuemos a seguir esta viagem juntos.

Sem menos importância, quero agradecer aos meus pais, por me apoiarem nas decisões que tomei, pelos caminhos que segui. Sem eles, não estaria aqui, e é a eles que dedico esta dissertação.

A todos, obrigado, e que tudo corra bem para todos nós.

Resumo

A colonização micorrízica pode ajudar a mitigar problemas de toxicidade de manganês (Mn) se a planta for precocemente colonizada por micélio extra-radicular (MER) intacto. Para o efeito, a planta que produz o MER (*Developer*) deve ser eliminada por herbicida. O objectivo deste trabalho foi verificar se ocorre transferência de metabolitos associados ao uso do herbicida (glifosato e xiquimato) entre a planta *Developer* e a cultura.

A análise foi realizada por Cromatografia Líquida com deteção por *Diode Array* e Espectrometria de Massa (LC-DAD-MS). Foram testados vários métodos de extração, sendo o mais eficiente para o glifosato, metanol:água (50:50, v/v) e para o xiquimato, acetonitrilo:água (50:50, v/v).

Em plantas de trigo, não foi detetado glifosato e a concentração de xiquimato não sofreu alterações significativas, o que sugere que não existe translocação deste composto via MER entre o *Developer* e a planta de cultivo.

Abstract

Detection methods of glyphosate and shikimic acid in plants of the montado alentejano

Mycorrhizal colonization can help mitigate Mn toxicity problems if the plant is early colonized by intact extra-radicular mycelium (MER). For this purpose, the plant producing MER (*Developer*) must be eliminated by herbicide. The objective of this work was to verify whether transfer of metabolites associated with herbicide use (glyphosate and shikimate) occurs between the *Developer* plant and the crop.

The analysis was performed by Liquid Chromatography with Diode Array detection and Mass Spectrometry (LC-DAD-MS). The extraction method that proved most effective for glyphosate was the method using an extractant solution of methanol:water (50:50, v/v) and for shikimate was the method in which a solution of acetonitrile:water (50:50, v/v) is used.

In wheat plants no glyphosate or significant different amounts of shikimate were detected, suggesting that there is no translocation of the herbicide via MER between the *Developer* and the crop plant.

Índice Geral

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract.....	VI
Índice de abreviaturas	IX
Índice de figuras	XI
Índice de tabelas	XII
1. Introdução	13
1.1. Toxicidade dos solos em Portugal	13
1.2. Glifosato.....	16
1.2.1. Pequena introdução histórica	16
1.2.2. Absorção e movimento.....	17
1.2.3. Degradação.....	17
1.2.4. Modo de ação	18
1.2.5. Via metabólica do ácido xiquímico.....	18
1.2.6. Acumulação de ácido xiquímico na planta	20
1.3. Métodos para extração de metabolitos das plantas	21
1.3.1. Extração com fluídos pressurizados	23
1.3.2. Extração com fluídos supercríticos	24
1.3.3. Extração assistida por ultrassons.....	26
1.3.4. Extração assistida por micro-ondas	27
1.4. Métodos Cromatográficos.....	29
2. Objectivos.....	32
3. Materiais e Métodos	34
3.1. Reagentes e materiais específicos	34
3.2. Equipamentos.....	34
3.3. Procedimento Experimental.....	35
3.3.1. Ensaio das plantas	35
3.3.2. Otimização das condições de análise do glifosato e do xiquimato por HPLC-DAD-MS	35
3.3.2.1. Análise por HPLC-DAD-MS	35
3.3.2.2. Preparação das soluções padrão de glifosato e xiquimato e construção das retas de calibração	36
3.3.2.3. Validação do método analítico: Reprodutibilidade, Repetibilidade.....	36
3.3.3. Métodos de extração.....	37

3.3.3.1. Maceração das amostras	37
3.3.3.2. Método 1.....	37
3.3.3.3. Método 2.....	37
3.3.4. Ensaio de Recuperação	38
3.3.5. Amostras Experimentais	38
4. Apresentação e Discussão dos resultados.....	39
4.1. Ensaio das plantas	39
4.2. Identificação do Xiquimato e Glifosato por LC-DAD-MS	40
4.3. Validação do método analítico.....	47
4.4. Otimização dos métodos de extração.....	50
4.4.1. Glifosato	50
4.4.2. Xiquimato.....	53
4.5. Amostras Experimentais	56
5. Conclusão	59
Referências	60
Anexos.....	66

Índice de abreviaturas

- AMPA = Ácido aminometilfosfónico (do inglês *Aminomethylphosphonic Acid*)
- APCI = Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês: *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*)
- ATP = Adenosina Tri-fosfato (do inglês *Adenosine Triphosphate*)
- CS = Corismato Sintase (do inglês *Chorismate Synthase*)
- DAD = Detetor de *Diode Array* (do inglês: *Diode Array Detector*)
- DAHPS = 3-deoxi-D-arabinoheptulsonato-7-fosfato (do inglês *3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate*)
- DAHPS = 3-deoxi-D-arabinoheptulsonato-7-fosfato sintase (do inglês *3-Deoxy-D-arabino-heptulosonic acid 7-phosphate Synthase*)
- DHQ = ácido 3-desidroquinóico (do inglês *3-Dehydroquinic Acid*)
- DHS = ácido 3-desidroxiquímico (do inglês *3-Dehydroshikimic Acid*)
- EPSP = 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato (do inglês *5-enol-Pyruvyl-Shikimate-3-Phosphate*)
- EPSPS = 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato sintase (do inglês *5-enol-Pyruvyl-Shikimate-3-Phosphate Synthase*)
- ESI = Ionização por *Electrospray* (do inglês: *Electrospray ionisation*)
- FMA = Fungo Micorrízico Arbuscular
- GC-MS = Sistema de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (do inglês: *Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry*)
- HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography*)
- HPLC-DAD-MS = Sistema Acoplado de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Espectrometria de Massa e detecção por *Diode Array* (do inglês: *High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry and Diode Array Detection*)
- LC-MS = Cromatografia Líquida acoplada a espectrometria de massa (do inglês *Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*)
- LD = Limite de Detecção
- LQ = Limite de Quantificação
- MER = Micélio Extrarradicular
- MS = Espectrometria de massa (do inglês: *Mass Spectrometry*)
- ORN = *Ornithopus compressus L.*
- PEP = ácido fosfoenolpirúvico (do inglês *Phosphoenolpyruvic Acid*)

PLE = Extração através de Líquidos Pressurizados (do inglês *Pressurized Liquid Extraction*)

Q-TOF = Quadrupolo – Tempo de Voo (do inglês: *Quadrupole - Time of Flight*)

ROS = Espécies Reativas de Oxigénio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

S3P = Xiquimato-3-fosfato (do inglês *Shikimate-3-Phosphate*)

SFE = Extração através de fluídos supercríticos (do inglês: *Supercritical Fluid Extraction*)

SIM = Monitorização de um Único Ião (do inglês: *Single Ion Monitoring*)

SK = Xiquimato Cinase (do inglês *Shikimate Synthase*)

SRM = Monitorização de uma Única Reação (do inglês: *Single Reaction Monitoring*)

TOF = Tempo de Voo (do inglês: *Time of Flight*)

TR = Tempo de Retenção

Índice de figuras

Figura 1	Estrutura química do Glifosato (esquerda) e do seu metabolito AMPA (direita).	Pág. 16
Figura 2	Mapa detalhado da via metabólica do Xiquimato.	Pág. 19
Figura 3	Esquema representativo de um sistema de extração através de líquidos pressurizados.	Pág. 23
Figura 4	Equipamento de extração através de fluídos supercríticos.	Pág. 24
Figura 5	Esquema de 2 métodos de utilização de ultrassons.	Pág. 26
Figura 6	Sistemas de extração assistida por micro-ondas.	Pág. 28
Figura 7	Sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-DAD-MS)	Pág. 29
Figura 8	Exemplo de cromatograma fornecido pelo detetor DAD obtido para uma solução padrão de glifosato	Pág. 39
Figura 9	Exemplo de cromatograma Full MS obtido para uma solução padrão de glifosato	Pág. 40
Figura 10	Espectro UV-Vis. obtido para o pico com Tr 4.3 min para o glifosato	Pág. 41
Figura 11	A) Espectro MS obtido para o pico com Tr 4,5 min (Glifosato) versus B) Espectro MS obtido para o glifosato	Pág. 42
Figura 12	Exemplo de cromatograma fornecido pelo detetor DAD obtido para uma solução padrão de xiquimato	Pág. 43
Figura 13	Exemplo de cromatograma tipo Full MS obtido para uma solução padrão de xiquimato	Pág. 44
Figura 14	Espectro UV-Vis. obtido para o pico com Tr 5 min para o xiquimato	Pág. 44
Figura 15	A) Espectro MS obtido para o pico com Tr 5,8 min para o xiquimato versus B) Espectro MS2 de referência do xiquimato	Pág. 45
Figura 16	Reta de calibração para o Xiquimato	Pág. 47
Figura 17	Reta de calibração para o Glifosato	Pág. 47
Figura 18	Exemplo de cromatograma Full MS de uma amostra obtida utilizando um dos métodos de extração testado para o Glifosato	Pág. 50
Figura 19	Exemplo de cromatograma SIM de uma amostra obtida utilizando um dos métodos de extração testados para o Glifosato	Pág. 50
Figura 20	Eficiência da taxa de extração dos diferentes métodos para o glifosato	Pág. 51
Figura 21	Exemplo de cromatograma Full MS de uma amostra obtida utilizando um dos métodos de extração testado para o xiquimato	Pág. 53
Figura 22	Exemplo de cromatograma SIM de uma amostra obtida utilizando um dos métodos de extração testados para o xiquimato	Pág. 53
Figura 23	Eficiência da taxa de extração dos diferentes métodos para o xiquimato	Pág. 54
Figura 24	Exemplo de cromatograma Full MS de uma amostra real de trigo	Pág. 55
Figura 25	Concentrações (mg L^{-1}) de xiquimato detetado nas amostras após extração	Pág. 56

Índice de tabelas

Tabela 1	Métodos de extração de produtos naturais	Pág. 22
Tabela 2	Reagentes utilizados durante o procedimento experimental	Pág. 33
Tabela 3	Material específico utilizado durante o procedimento experimental	Pág. 33
Tabela 4	Equipamentos utilizados durante o procedimento experimental	Pág. 33
Tabela 5	Eficiências de extração, em percentagem, dos diferentes métodos de extração para o glifosato	Pág. 51
Tabela 6	Eficiências de extração, em percentagem, dos diferentes métodos de extração para o xiquimato	Pág. 52
Tabela 7	Concentrações de xiquimato (mg L^{-1}) extraídas das amostras experimentais	Pág. 56

1. Introdução

1.1. Toxicidade dos solos em Portugal

Os Cambissolos são o grupo de referência de solos mais representativo de Portugal. São geralmente caracterizados por terem uma textura grosseira, maioritariamente compostos argiloarenosos, uma pequena capacidade de troca de catiões, pouca matéria orgânica, reduzida capacidade de retenção de água e com uma forte acidez (Carvalho *et al.*, 2015).

A homeostase dos iões metálicos nas plantas é de extrema importância, e é por isso estritamente regulada pela planta, ainda para mais, tendo em conta as condições do solo onde as plantas se estão a desenvolver. Caso este equilíbrio seja perturbado, pode levar à degradação da planta, reduzindo a sua biomassa ou podendo em casos mais severos, levar à morte da mesma. O metabolismo do oxigénio na planta e metais de transição estão interligados com os mecanismos redox cruciais à sua regulação. As formas reduzidas do oxigénio provenientes dos processos de oxidação essenciais às células, podem ser ativadas por estes metais, como por exemplo, o ferro (Fe) e o cobre (Cu), que levam à geração de radicais hidroxilo, sendo o resultado mais provável, a morte celular (Briat, J. F., & Lebrun, M. (1999)).

Outros metais, como por exemplo o manganês (Mn), são essenciais ao funcionamento da planta, mas podem agir em detrimento desta se as concentrações forem demasiado elevadas. Pode interferir com a absorção de outros elementos minerais, também necessários ao correto funcionamento da planta, como por exemplo, o cálcio (Ca), magnésio (Mg), Fe e P (El-Jaoual, T., & Cox, D. A. (1998)). O decréscimo do pH nos solos, isto é, o aumento da acidez dos solos, leva a um aumento da solubilidade dos metais tóxicos, o que por sua vez leva a um acréscimo da biodisponibilidade dos mesmos por absorção pela planta (Fässler *et al.*, 2010).

A toxicidade de Mn é o principal factor que reduz a produtividade nos Cambissolos derivados de rochas graníticas (Carvalho, 1987). A biodisponibilidade de Mn depende do pH dos solos, do potencial redox (Eh), da temperatura e da humidade. Estes factores podem aumentar a concentração de manganês no solo para níveis tóxicos, quer individualmente, quer em conjunto, através de efeitos sinérgicos entre si (George *et al.*, 2011).

O Mn é um micronutriente essencial para a maioria dos organismos. No caso das plantas participa na formação estrutural de proteínas fotossintéticas e de enzimas. Um défice deste micronutriente é comprometedor da função dos cloroplastos, pois afeta processos importantes na fotossíntese. Um excesso provoca também problemas no sistema fotossintético da planta (Millaleo *et al.*, 2010). Não só pode provocar danos na maquinaria fotossintética da planta, como também pode alterar o correto funcionamento de enzimas, absorção, translocação e utilização de vários elementos minerais (Ca, Mg, Fe e P), o que leva a um aumento do stress oxidativo (Millaleo *et al.*, 2010).

Esta toxicidade é normalmente associada a solos ácidos ($\text{pH} < 5,5$) e outros solos que tenham sido temporariamente alagados. Isto resulta numa redução de oxigénio do solo suficiente para converter óxidos de manganês que sejam moderadamente solúveis, para uma forma mais facilmente absorvível pelas plantas (Mn^{2+}) (Brito *et al.*, 2014).

A rizosfera das plantas (região de contacto entre o solo e as raízes das plantas) pode provocar uma diminuição do pH devido há libertação de H^+ ou de ácidos orgânicos, que podem originar a formação de Mn^{2+} (Qadir *et al.*, 2013). A comunidade microbiana também pode oxidar ou reduzir Mn, aumentando a quantidade disponível para absorção pelas plantas, dependendo do tipo de solo onde esta comunidade esteja inserida.

As plantas possuem várias estratégias para controlar a quantidade de Mn absorvido: redução na absorção e translocação de Mn por parte da planta ou sequestro e compartimentação de Mn, preferencialmente nos vacúolos das células. Podem ainda formar-se complexos que retiram o Mn do vacúolo, tricomas e outras vesículas, distribuindo-o de forma mais homogénea pelos tecidos foliares e/ou observar-se o aumento da produção de antioxidantes capazes de degradar ROS (El-Jaoual & Cox, 1998; Schützendübel & Polle, 2002, Blamey *et al.*, 2018; Faria *et al.*, 2020).

Uma das possíveis soluções para contrariar a toxicidade do solo em Mn é a aplicação de calcário dolomítico ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$). Como este calcário contém na sua constituição magnésio (Mg), vai aumentar a razão magnésio/manganês, reduzindo a toxicidade para as plantas, pois de acordo com Carvalho *et al.*, (2015), a razão entre o $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ é mais importante nos efeitos tóxicos do manganês, do que a quantidade absoluta de Mn^{2+} existente no solo. É, no entanto, uma solução dispendiosa e envolve uma aplicação correta de calcário de acordo com as necessidades do solo. Estão a ser desenvolvidos métodos e estratégias mais amigas do ambiente e também mais baratas.

O recurso ao efeito bioprotetor de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) nativos são uma alternativa biológica viável quando comparadas com a normal correção química do solo. Além de terem menores consequências ambientais, são mais económicos e proporcionam ainda vantagens adicionais como seja a proteção contra outros stresses abióticos e bióticos ou a aquisição facilitada de nutrientes. De acordo com Nogueira *et al.*, (2004), a micorrização por si só não é completamente responsável pela diminuição da toxicidade de Mn. O estímulo de bactérias oxidantes de Mn e supressão de bactérias reductoras de Mn presentes na micorrizosfera das plantas micorrizadas mostraram ser também um fator importante na diminuição da toxicidade do Mn em plantas colonizadas. A razão Mg/Mn é outro importante fator, no entanto, vários autores afirmam que o desenvolvimento das micorrizas não afecta a acumulação de Mg (Cardoso *et al.*, 2003; Alloush & Clark, 2001).

Em 2014, Brito *et al.*, mostraram que quando a colonização de FMA é precocemente iniciada a partir de MER intacto, as plantas de trigo, altamente sensíveis à toxicidade de Mn ficavam protegidas contra aquela toxicidade. Os autores verificaram que MER pode ser previamente desenvolvido no solo pelo crescimento por uma planta micotrófica e resistente à toxicidade de Mn (planta *Developer*). A colonização por MER, desde que mantido intacto, é mais eficiente e começa mais cedo do que através de outras fontes de inóculo (esporos e fragmentos de raiz colonizados). Os autores verificaram ainda que, o tipo de *Developer* utilizado influenciava o grau de proteção conferido ao trigo contra a toxicidade de Mn, pondo em evidência a existência de uma diversidade funcional dentro da população nativa de FMA e a forma de manifestar pela escolha do *Developer* (Brígido *et al.* 2017).

A estratégia de micorrização precoce associada ao ERM intacto previamente desenvolvido no solo por uma planta *Developer* foi testada para a bio-proteção de várias culturas contra stresses bióticos e abióticos tendo-se revelado eficiente (Goss *et al.*, 2017; Brito *et al.*, 2021). A sua implementação em condições de campo implica o controlo da planta *Developer* pelo uso de herbicida uma vez que o recurso à mobilização do solo para esse efeito não é viável, pois a destruição da rede de ERM compromete a sua capacidade de colonização micorrízica precoce e o efeito bio-protector que está associado é perdido.

A eliminação das plantas *Developer* por corte também não é viável pois o seu recrescimento iria implicar competitivamente com a cultura que lhe sucederá. Pelas

características que apresenta, o uso de glifosato para o controlo da planta *Developer* de forma a que o MER não seja perturbado, constitui uma opção adequada.

Existem evidências sobre a transferência de metabolitos entre plantas micorrizadas pela mesma rede de MER (Heap and Newman, 1980). Considerando que o controlo da planta *Developer* deverá ser feito com herbicida e que a planta a proteger estará a determinada altura ligada a ela pela rede de MER no solo, é possível que ocorra transferência de herbicida entre ambas. Esta questão está na base do presente estudo, pois é fundamental dispor de ferramentas e procedimentos analíticos que permitam quantificar e avaliar esta possível transferência de glifosato entre as duas plantas para que a implementação em condições de campo da estratégia de bio-protecção pela micorrização precoce possa ser adequada. (ex. tempo de espera entre aplicação do glifosato para controlo do *Developer* e sementeira da cultura a proteger).

1.2. Glifosato

O glifosato é um herbicida de largo-espectro, sistémico, pós-emergência, muito utilizado atualmente, tanto em zonas cultivadas, como em zonas não cultivadas (Gorga *et al.*, 2020). Existem diversas marcas comerciais, sendo uma das mais conhecidas, o Roundup®. É eficaz contra infestantes que não lhe sejam resistentes (Ferreira, 2009). Atua no enzima 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), inibindo a sua atividade competitivamente, consequentemente levando há morte da planta, por não conseguir sintetizar aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano, que são essenciais ao seu desenvolvimento (Gomes *et al.*, 2014).

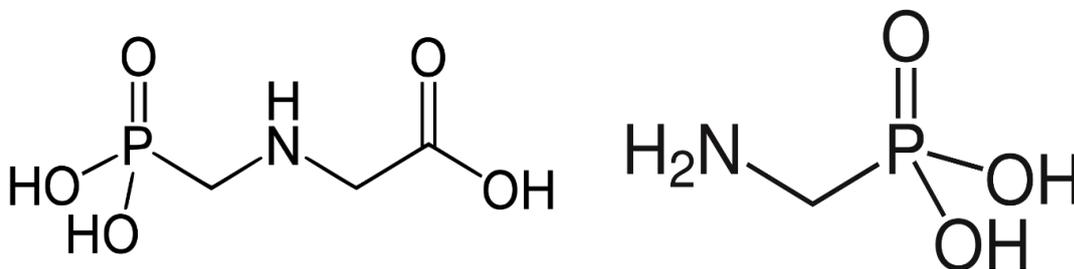


Figura 1: Estrutura química do glifosato (Esquerda) e do seu metabolito AMPA (direita)

1.2.1. Pequena introdução histórica

Glifosato, (nome IUPAC: N-(fosfometil)glicina) foi sintetizado pela primeira vez pelo químico suíço Henry Martin, em 1950, que trabalhava para a empresa farmacêutica, Cilag

(Franz *et al.*, 1997). No entanto, pelo facto de não ser farmacologicamente funcional, não foi publicado (Dill *et al.*, 2010).

Em 1970, John E. Franz, com a ajuda da empresa Monsanto, sintetizou e testou o glifosato como um possível herbicida. Foi patenteado pouco tempo depois, e a sua utilização como herbicida comercial terá começado por essa altura (Grossbard E and Atkinson D, 1985).

1.2.2. Absorção e movimento

Estudos realizados sobre a absorção e movimento do glifosato em plantas demonstram que é rapidamente absorvido após aplicação (Caseley *et al.*, 1985; Kirkwood *et al.*, 2000). Existem diferenças de espécie para espécie, na taxa de absorção foliar, que demonstram a sua suscetibilidade ao glifosato. O método de transporte mais provável é a difusão pela cutícula da planta (O Duke, S., & B Powles, S. (2008). Esta absorção pode ser alterada por diversos fatores, como a idade ou espécie da planta, condições ambientais e a concentração da aplicação do herbicida (Monquero *et al.*, 2004).

As propriedades físico-químicas inerentes ao glifosato permitem que este seja transportado facilmente pelo floema da planta. A sua afinidade elevada com o floema, ficando mais tempo dentro deste sistema, e também com locais em crescimento na planta, permitem uma boa distribuição sistémica (Bromilow & Chamberlain, 2000; Kirkwood *et al.*, 2000).

É facilmente adsorvido pelas partículas do solo, permanecendo inativo até à sua degradação completa. Esta adsorção é influenciada pela presença de catiões específicos no solo, como Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , entre outros. Possui uma rápida e elevada taxa de adsorção a óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, e com a matéria orgânica presente no solo. Existem diversos mecanismos para a ligação ao solo, como ligação à fração oxídica do solo, adsorção electrostática aos minerais da argila e a formação de pontes de hidrogénio com a matéria orgânica do solo (Lamelas, 2020).

1.2.3. Degradação

A rota primária de degradação do glifosato é a comunidade microbiana do solo e água. Esta degradação pode acontecer por duas vias químicas, uma delas produz AMPA (ácido aminometilfosfónico, metabolito principal), encontrado em solos tratados com glifosato, e a outra via química produz sarcosina, embora aconteça apenas quando os

microrganismos presentes experienciam uma falta de fósforo (P) (metabolito intermediário). Os microrganismos que degradam o glifosato utilizam-no como fonte de carbono, azoto ou fósforo para benefício próprio. A degradação do glifosato é mais rápida tanto quanto maior for a população da comunidade microbiana (Sviridov *et al.*, 2015).

Em termos de toxicidade para o ambiente, AMPA é tão tóxico quanto o glifosato. Demora mais tempo que o glifosato a degradar-se, que pode ser atribuído a uma maior adsorção ao solo, diminuindo a quantidade de AMPA disponível para ser degradado. O glifosato apresenta uma meia-vida no solo que vai desde 2 a 215 dias e 2 a 91 dias em meio aquático, enquanto que o AMPA tem uma meia-vida no solo que vai de 60 a 240 dias (Giesy *et al.*, 2000). O glifosato degrada-se em AMPA, e este degrada-se em dióxido de carbono, amónia e fosfato inorgânico, que pode levar a um aumento da quantidade de fósforo em meios aquáticos, o que leva a processos mais rápidos de eutrofização e, conseqüentemente, a degradação de ecossistemas aquáticos (Vera *et al.*, 2010)

1.2.4. Modo de ação

O glifosato é uma molécula com uma elevada afinidade com a enzima EPSPS, da via metabólica do ácido xiquímico (também denominado xiquimato) inibindo-a. É uma molécula análoga a um dos substratos da EPSPS, o fosfoenilpiruvato. A inibição desta enzima incorre num aumento da quantidade de carbono enviado para o xiquimato-3-fosfato (S3P), resultando numa acumulação de ácido xiquímico (O Duke, S., & B Powles, S. (2008); Becerril, J. M. *et al.*, (1989)).

1.2.5. Via metabólica do ácido xiquímico

Esta via metabólica atua como uma ligação entre o metabolismo primário e secundário em plantas superiores. Os produtos finais são utilizados para metabolismos primários cruciais para a sobrevivência da planta (como a produção de proteínas), mas também servem como precursores a outros metabolitos importantes ao crescimento da planta (Francenia Santos-Sánchez *et al.*, (2019)).

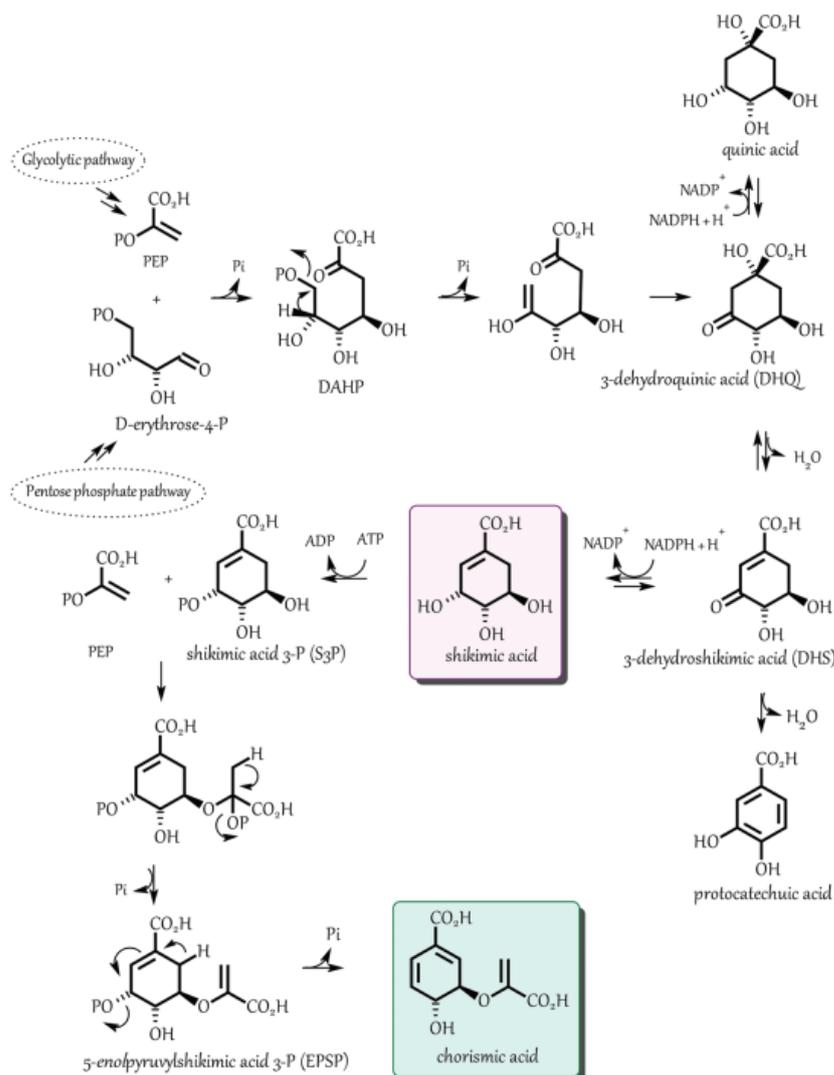


Figura 2: Mapa detalhado da via metabólica do ácido xiquímico (Francenia Santos-Sánchez et al., 2019)

Esta via consiste em 7 etapas enzimáticas sequenciais.

1ª Etapa: Condensação de tipo aldol de dois compostos ativos fosforilados, o ácido fosfoenolpirúvico (PEP), proveniente da via glicolítica, e do hidrato de carbono proveniente do ciclo pentose fosfato, D-eritrose-4-fosfato, resultando no composto 3-deoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato (DAHP), sintetizado através do enzima 3-deoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato sintase (DAHPS).

2ª Etapa: DAHP perde o fosfato inorgânico e o produto enólico é ciclizado através de uma segunda reação de tipo aldol para produzir ácido 3-desidroquinóico (DHQ). A enzima responsável pela reação é o 3-desidroquinóico sintase (DHQS).

3ª Etapa: Desidratação do composto DHQ produz o composto ácido 3-desidroxiquímico (DHS). Através de reações de ramificação do composto DHS, é possível obter-se ácido

protocatecuico e gálico (C₆-C₁). A enzima que realiza esta desidratação é o 3-desidroquinóico hidrolase.

4ª Etapa: Redução do composto DHS, pelo fosfato dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH).

5ª Etapa: Ativação do ácido xiquímico com adenosina trifosfato (ATP) para produzir S3P através da enzima xiquimato cinase (SK).

6ª Etapa: Adição de PEP a S3P para produzir 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato (EPSP), por via da ação do enzima 5-enolpiruvilxiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS).

7ª Etapa: Produção de ácido corísmico através da ação catalítica da enzima corismato sintase (CS).

É na sexta etapa que o glifosato exerce o seu efeito inibidor (por competição), devido à sua estrutura molecular ser muito idêntica à estrutura do PEP (Francenia Santos-Sánchez *et al.*, 2019). Devido a esta inibição, a biossíntese de proteínas, auxinas, compostos com propriedades anti-patogénicas, fitoalexinas, ácido fólico, precursores de ligninas, flavonoides, plastoquinonas e centenas de outros compostos são afetados, atendendo à inibição da biossíntese de aminoácidos aromáticos (Dmisten & Ells, 2002; Ronald Bentley & E. Haslam, 1990).

É reconhecido que o glifosato, ao interferir nesta via metabólica leva à morte da planta. No entanto, sabe-se também que os efeitos secundários e indiretos causados pelo o glifosato, levam a uma desregulação de muitos outros sistemas, como a fotossíntese, nutrição mineral e processos hormonais e oxidativos da planta. As desregulações de processos antioxidantes podem levar a uma diminuição da eficiência do processo fotossintético e a um aumento do stress oxidativo. Esse aumento do stress oxidativo leva a um aumento de espécies reativas de oxigénio (ROS), e é conhecido que esses ROS exercem um efeito citotóxico, ao danificar as células a pontos de causar a sua morte, exercem também um efeito negativo no metabolismo do carbono, no conteúdo em clorofila e também na eficiência de processos fotoquímicos (Gomes *et al.*, 2014).

1.2.6. Acumulação de ácido xiquímico na planta

Plantas tratadas com glifosato demonstram um aumento na quantidade de ácido xiquímico presente na planta. Isto acontece porque um dos produtos finais da via

metabólica regula a atividade da enzima DAHPS. Por causa desta desregulação, ocorre um aumento do fluxo de carbono nesta via metabólica, traduzindo-se numa elevação da quantidade de metabolitos intermediários a montante da EPSPS inibida (Becerril, J. M. *et al.*, (1989), Jensen, R.A. (1986)). O precursor imediatamente antes do EPSP é o S3P, que é, entretanto, clivado por uma enzima fosfatase, no vacúolo ou no tonoplasto da célula (Holländer-Czytko & Amrhein, 1983).

1.3. Métodos para extração de metabolitos das plantas

A extração é uma operação físico-química de transferência de massa onde os compostos sólidos solúveis e voláteis podem ser extraídos de uma matriz ao serem mantidos em contacto com um solvente. Na indústria farmacêutica e também em perfumaria, é muito comum serem utilizados métodos de extração para a obtenção de extratos vegetais, fármacos, entre outros. O rendimento dos métodos de extração pode ser influenciado por vários fatores, como por exemplo, a temperatura, o tipo de solvente utilizado ou a ação mecânica utilizada. O facto de se tratar de matriz vegetal é um fator determinante na rentabilidade da extração, pois apresenta uma estrutura muito complexa, constituída por células, espaços intracelulares, capilares e poros. As características físico-químicas do composto a ser extraído são também importantes e devem ser tidas em conta. O tamanho, localização na planta, estrutura molecular e a ligação com outros compostos presentes na matriz (Veggi, 2009).

Os métodos mais tradicionais, como a maceração e a percolação, são mais dispendiosos, pois gastam mais solventes, necessitam de longos períodos de tempo para que a extração ocorra e nem sempre ocorre uma extração muito eficiente.

Devido a uma crescente consciência ecológica, com ênfase na sustentabilidade e redução do consumo de solventes e reagentes no mundo da química, foi necessário encontrar métodos de extração com uma eficiência mais elevada e com uma taxa de utilização de solventes mínima possível, permitindo reduzir gastos financeiros e materiais, aumentando a sustentabilidade e eficiência na utilização desses materiais.

Tabela 1: Métodos de extração de produtos naturais. Zhang et al., 2018

Método	Solvente	Temperatura	Pressão	Tempo	Volume de solvente orgânico utilizado	Polaridade dos produtos naturais extraídos
Maceração	Água, aquoso e solventes não-aquosos	Temperatura ambiente	Atmosférica	Longo	Elevado	Dependente do solvente utilizado
Percolação	Água, aquoso e solventes não-aquosos	Temperatura ambiente, por vezes aquecido	Atmosférica	Longo	Elevado	Dependente do solvente utilizado
Decocção	Água	Aquecido	Atmosférica	Moderado	Nenhum	Compostos polares
Extração de refluxo	Aquoso e solventes não-aquosos	Aquecido	Atmosférica	Moderado	Moderado	Dependente do solvente utilizado
Extração de Soxhlet	Solventes orgânicos	Aquecido	Atmosférica	Longo	Moderado	Dependente do solvente utilizado
Extração com líquidos pressurizados	Água, aquoso e solventes não-aquosos	Aquecido	Elevada	Curto	Pequeno	Dependente do solvente utilizado
Extração com fluidos supercríticos	Fluído supercrítico (normalmente S-CO ₂), com algum modificador	Próxima da temperatura ambiente	Elevada	Curto	Pequeno ou nenhum	Desde compostos não-polares até moderadamente polares
Extração assistida por ultrassons	Água, aquoso e solventes não-aquosos	Temperatura ambiente ou em aquecimento	Atmosférica	Curto	Moderado	Dependente do solvente utilizado
Extração assistida por micro-ondas	Água, aquoso e solventes não-aquosos	Temperatura ambiente	Atmosférica	Curto	Nenhum ou moderado	Dependente do solvente utilizado
Extração através de pulsos eléctricos	Água, aquoso e solventes não-aquosos	Temperatura ambiente ou em aquecimento	Atmosférica	Curto	Moderado	Dependente do solvente utilizado
Extração assistida por enzimas	Água, aquoso e solventes não-aquosos	Temperatura ambiente ou em aquecimento após tratamento enzimático	Atmosférica	Moderado	Moderado	Dependente do solvente utilizado
Hidro destilação e destilação a vapor	Água	Em aquecimento	Atmosférica	Longo	Nenhum	Óleos essenciais (normalmente não-polares)

Em métodos cuja a extração é assistida por algum outro mecanismo demonstram uma redução, o tempo necessário para a aplicação correta da extração e da quantidade de solvente utilizada, mas por outro lado implicam a utilização de outros equipamentos para a realização da extração.

Os métodos aqui descritos poderão servir, futuramente, como potenciais avenidas de estudo que, por motivos alheios à realização deste estudo, não puderam ser seguidas.

1.3.1. Extração com líquidos pressurizados

A extração com líquidos pressurizados (PLE) mantém o solvente a temperaturas elevadas e a altas pressões, mantendo o solvente no estado líquido mesmo quando este se encontra acima do seu ponto de ebulição. Isto resulta numa maior solubilidade, maior difusão e maior penetração por parte do solvente pela a matriz da amostra. Devido ao reduzido tempo de extração, é possível extrair compostos termolábeis, mesmo a temperaturas elevadas. Na figura 3 está um esquema que representa um sistema PLE. Gizir et al, em 2007, demonstraram esta possibilidade ao realizaram a extração de antocianinas, que são compostos termolábeis, da cenoura negra (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens*), utilizando PLE, demonstrando que mesmo com compostos que se degradam facilmente a temperaturas elevadas, a curta duração do processo permite uma extração eficiente.

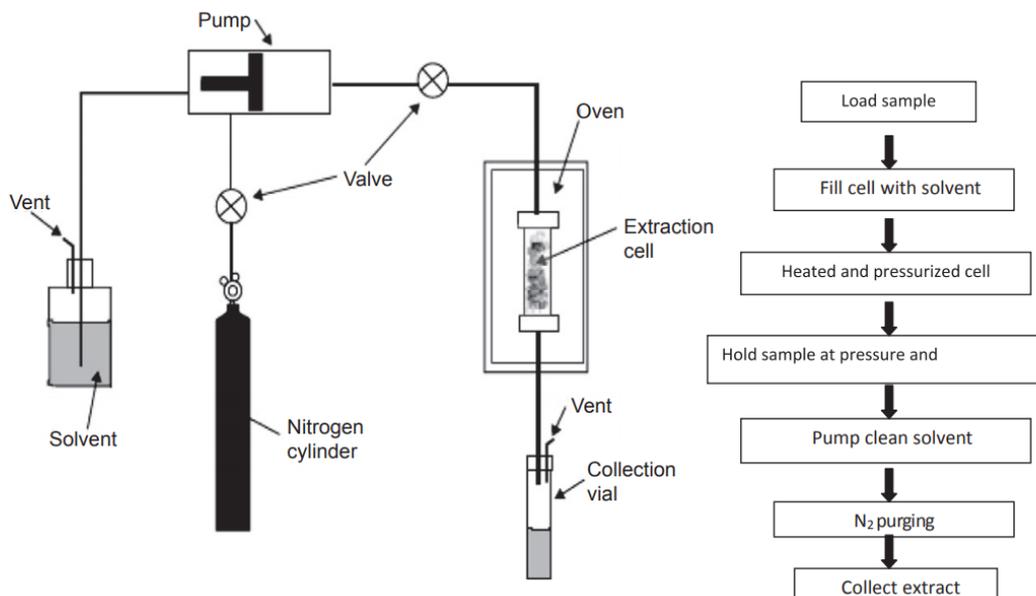


Figura 3: Esquema representativo de um sistema de extração através de líquidos pressurizados (Mandal et al., 2015)

Os factores que influenciam este tipo de extração são a temperatura, a escolha do solvente, pressão do sistema e a natureza da matriz. É, no entanto, necessário estar atento à temperatura do processo, quando aplicado na extração de compostos termolábeis.

1.3.2. Extração com fluídos supercríticos

A extração com fluídos supercríticos (SFE) consiste na utilização de substâncias que se encontram acima do seu ponto crítico de temperatura e/ou pressão, em que nesse ponto ganham as propriedades de um líquido e também as propriedades de um gás.

Um fluído supercrítico tem a densidade de um líquido acoplada com a capacidade de transporte de um gás. Uma menor viscosidade permite uma maior difusão pela matriz da amostra, permitindo obter melhores resultados quando comparados com um solvente orgânico normal.

O sistema de operação de SFE é muito idêntico aquele que é encontrado no modelo de PLE. A diferença é que o solvente é um fluído supercrítico invés de um solvente normal. Pelo facto de estar sob pressão e sob aquecimento, a alteração destes dois parâmetros permite controlar as propriedades inerentes a este fluído, permitindo alterar estas propriedades quando necessário, dependendo do tipo de amostra. Na figura 4 está uma imagem que mostra como é um sistema de extração que utiliza fluídos supercríticos.



Figura 4: Equipamento de extração através de fluidos supercríticos. Adaptado de Sentryca Nutridermaceuticals®

Conde-Hernández *et al.*, 2017, utilizaram este método de extração e compararam-no com a hidro destilação e a destilação a vapor, na extração de óleo essencial de alecrim. Os resultados que obtiveram demonstraram uma maior taxa de extração por parte do método SFE e uma maior atividade antioxidante do óleo essencial, quando comparado com os outros dois métodos. Um outro estudo realizado por Falcão *et al.*, em 2017, demonstraram que a utilização de um co-solvente, neste caso etanol a 2, 5 e 10%, permitiram obter melhores taxas de extração. Tinham como objectivo a extração de um alcaloide, a vimblastina, e foram testadas diferentes variações do mesmo método, e concluíram que a extração através do método SFE com um co-solvente (etanol) a 2% tem uma maior seletividade, enquanto que a 10% tem uma maior taxa de extração.

Este método tem como vantagens, o facto de o fluido supercrítico ser muito similar a um líquido, podendo assim solubilizar um sólido, recuperação de solvente através da redução da densidade, uma temperatura de extração relativamente baixa quando utilizado dióxido de carbono (CO₂) e é mais amigável para o ambiente comparativamente a métodos de extração mais tradicionais. No entanto, este método não permite a extração de compostos polares e os custos são demasiado elevados para serem colocados em prática, salvo algumas exceções, como a pesquisa universitária, a extração de óleos essenciais e a descafeinação do café.

1.3.3. Extração assistida por ultrassons

Extração assistida por ultrassons utiliza a energia acústica (energia mecânica, que não é absorvida pelas moléculas, mas que é transmitida pelo meio) e solventes para permitir uma extração mais rápida e a temperaturas mais baixas de compostos provenientes de plantas, o que permite um aumento na eficiência de extração de compostos termolábeis.

Os ultrassons propagam-se pelo meio através de ondas de pressão que se traduzem num “alongamento” da estrutura molecular do meio, devido a uma variação temporal da pressão. A propagação destas ondas através do meio líquido permite a produção de ciclos de elevada pressão (compressão) e de baixa pressão (rarefação), cuja periodicidade depende da frequência da vibração das ondas sonoras (Hz). Os ciclos de compressão fazem com que as moléculas se juntem ainda mais, enquanto que os ciclos de rarefação produzem pressão negativa (num meio líquido), o que leva ao afastamento das moléculas umas das outras. Se a intensidade dos ultrassons for suficientemente elevada, pode ocorrer a formação de pequenas bolhas ou cavidades dentro do líquido. Dá-se o nome de cavitação ao processo de formação, crescimento e implosão destas bolhas ou cavidades. Durante a implosão, elevadas temperaturas, aproximadamente 5000 K e elevadas pressões, aproximadamente 2000 atm podem ser localmente alcançadas. Estas implosões resultam num jato cinético que permite criar força suficiente para danificar as paredes celulares das células que se encontram na amostra, aumentando a capacidade de transferência material.

A temperatura do meio, a sua viscosidade e a frequência dos ultrassons são fatores que podem alterar a taxa de extração do método. É um método rápido e mais simples de realizar quando comparado com outros, o que é bastante apelativo de acordo com uma visão de sustentabilidade.

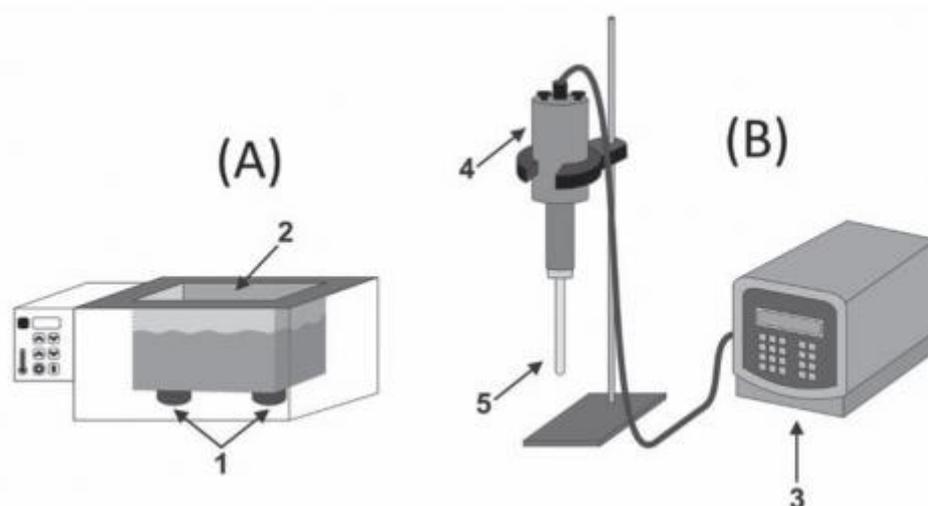


Figura 5: Esquema de 2 métodos de utilização de ultrassons: através de um banho de ultrassons (A) ou diretamente no meio através da utilização de uma sonda ultrassónica (B). (Mandal et al., 2015)
1 – Piezocerâmicas; 2 – Tanque; 3 – Gerador; 4 – Transdutor; 5 – Transmissor (sonda)

A Figura 5 mostra dois sistemas que utilizam ultrassons. No modelo (B), o sistema gerador de ultrassons é uma sonda, que como está a tocar diretamente na solução, é mais potente. Por isso, é necessário ter cuidado devido ao aumento de temperatura da amostra causado pelos ultrassons. No modelo (A) ocorre uma sonicação indireta da solução, através da colocação da amostra num recipiente que está dentro de um banho-maria sonificado. É comumente utilizado para a dispersão de um sólido pelo solvente e para desgaseificar soluções.

1.3.4. Extração assistida por micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas funciona através do efeito que as micro-ondas têm nos compostos polares, como por exemplo a água: elas geram calor através de mecanismos de condução iónica e de rotação dos dipolos. Estes mecanismos fazem com que as moléculas vibrem de tal modo que leva a um aumento da temperatura. Na matriz das amostras de plantas, um aumento de temperatura leva à evaporação da humidade existente na matriz, o que conduz a um aumento de pressão dentro da célula contra a parede celular. Este aumento de pressão leva ao *stretching* da parede celular, até que esta quebra e os compostos presentes na célula passem para o solvente.

Existem 2 sistemas de extração por micro-ondas: multimodo, do inglês *multimode* e monomodo, do inglês, *single* ou *focused mode*. O sistema multimodo permite uma irradiação em todas as partes do solvente e da amostra de modo igual, enquanto que o

monomodo funciona de maneira que a radiação se foque apenas num local, o que faz com que a amostra esteja sujeita a um campo elétrico ainda mais intenso.

Para além destes 2 sistemas, existem também 2 métodos diferentes, extração com solvente (utilizado normalmente para compostos não-voláteis) e sem solvente (utilizado normalmente para compostos voláteis).

A escolha de um solvente tendo em conta a solubilidade do analito em estudo, a interação entre o solvente e a matriz da planta e as propriedades absorventes de micro-ondas do solvente, são tudo fatores a ter em conta quando se realiza uma extração assistida por micro-ondas. É necessário também ter em conta a constante dielétrica do solvente, sendo este um dos fatores que mais influencia o método descrito. Pode também ser utilizado um modo de extração que não utiliza solvente, que é utilizado para a extração de óleos voláteis, e que a humidade presente na planta é suficiente para a extração destes compostos acontecer.

O volume de solvente e amostra utilizado, o tempo de extração, temperatura, potência das micro-ondas e características da matriz celular são também fatores que influenciam a taxa de extração do método, sendo necessário otimizar os diferentes parâmetros de modo a obter-se a melhor taxa de extração possível.

Chen, em 2013, otimizou as condições de extração assistida por micro-ondas para o composto resveratrol, em que teve uma taxa de extração de 1.76%. As condições otimizadas eram as seguintes: tempo de extração, 7 minutos; 80% etanol; rácio de líquido para sólido de 25:1 (ml:g), potência de micro-ondas nos 1.5 kw.

Benmoussa *et al.*, em 2019, aplicou um método de extração sem solvente assistido por micro-ondas, para a extração de óleos essenciais de sementes de *Foeniculum vulgare* Mill, com pressão atmosférica. A taxa de extração utilizando este método modificado é idêntica à taxa de extração do método de hidro destilação e demora apenas um sexto do tempo. Uma esquematização dos diferentes modos está presente na figura 6.

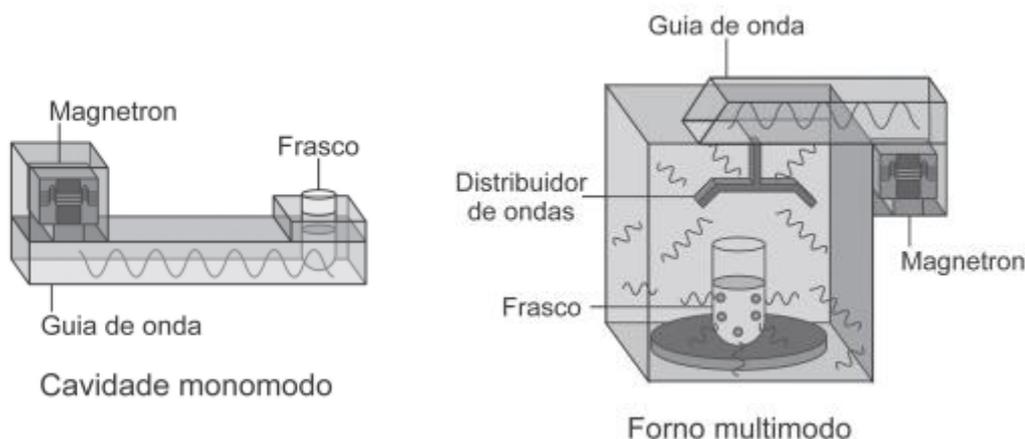


Figura 6: Comparação entre sistemas de extração assistida por micro-ondas em formato monomodo e formato multimodo, adaptado de Morais et al, 2013

Através da demonstração destes diferentes métodos, é possível verificar que existem vários benefícios na utilização de extrações mais modernas, como redução no tempo de extração, diminuição na utilização de solvente e, por conseguinte, uma redução nos custos associados à realização destas extrações. O inconveniente destes métodos é que necessitam de algum equipamento adicional para a realização das extrações, no entanto trata-se de equipamentos muito acessíveis.

1.4. Métodos Cromatográficos

A cromatografia foi inventada em 1901 por Mikhail Tswett, que investigava os pigmentos nas plantas. A cromatografia baseia-se na separação dos componentes de uma mistura com base nas propriedades de cada substância, como a polaridade, solubilidade, força iónica e tamanho. O sistema cromatográfico é constituído pela fase estacionária e a fase móvel, em que a mistura a ser analisada é introduzida na fase estacionária e a fase móvel transporta os componentes através dela. A separação é efetuada segundo as diferenças de afinidade dos compostos para a fase móvel ou estacionária. A cromatografia permite, portanto, fazer uma análise qualitativa e quantitativa e pode ser utilizada em diversas áreas, como a medicina, farmacologia, ambiente, biotecnologia, património e geologia (Teixeira, 2017; Lamelas, 2020).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa e com deteção por *diode array* (do inglês, *liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometry detection* ou LC-DAD-MS), representado na figura 7, é uma técnica analítica hifenada que permite combinar a potência de separação proporcionada pela cromatografia líquida

e juntar-lhe as capacidades de detecção e análise da espectrometria de massa (Kumar *et al.*, 2016).



Figura 7: Sistema de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa e detecção por diode array (LC–DAD-MS).

A cromatografia líquida de elevada eficiência (*high performance liquid chromatography*, ou HPLC), utiliza os mesmos princípios que a cromatografia líquida normal, ou seja, passar a amostra por uma fase estacionária com a ajuda de uma fase móvel, só que em condições mais extremas. É utilizada uma bomba para bombear a fase móvel a elevadas pressões através da fase estacionária que se encontra dentro da coluna, permitindo a separação dependendo dos parâmetros de separação selecionados (polaridade, tamanho, força iónica ou solubilidade). Após ocorrer a separação, a fase móvel passa então por um detetor, que fornece o tempo de retenção (T_r) e outras informações, caso sejam necessárias. O T_r de cada substância varia de acordo com as interações desta com a fase estacionária, do tipo de molécula que está a ser estudada e dos diferentes tipos de solventes utilizados. Existem diferentes métodos de separação, sendo o mais comum a partição em fase reversa. Os solventes utilizados referentes a este tipo de técnica são normalmente uma combinação miscível de água e solventes orgânicos (acetonitrilo e metanol são os mais comuns) (Kumar *et al.*, 2016).

A detecção de compostos fenólicos em HPLC pode ser realizada com um detetor UV, pois a maioria destes compostos possuem duplas ligações conjugadas ou sistemas aromáticos, que absorvem radiação desta região do espectro electromagnético. No entanto, a introdução nos anos 1980 de espectrofotómetros de *diode array* como detetores (DAD) para HPLC melhorou substancialmente a análise destes compostos, porque este tipo de detetores, não só permitem obter as características de retenção, como os espectros UV de cada um dos compostos. Em HPLC-DAD pode-se obter o espectro UV à medida que o eluente cromatográfico chega ao detetor. Os espectros de cada pico, obtidos *on-line*, são gravados e podem depois ser comparados com bibliotecas de espectros. Este tipo de detetor permite também a gravação simultânea dos cromatogramas a comprimentos de onda (c.d.o.) diferentes, permitindo assim, a detecção seletiva de diferentes grupos de compostos nos seus c.d.o. máximos de absorvância. Esta característica dos detetores de DAD aumenta também as possibilidades de quantificação, uma vez que a sensibilidade pode ser ampliada com a escolha adequada dos c.d.o., o que pode tornar a quantificação de um determinado composto possível, mesmo que a resolução dos picos não seja muito boa. (Santos-Buelga *et al*, 2003).

A espectrometria de massa (*mass spectrometry* ou MS) funciona através da conversão das moléculas para um estado carregado ou ionizado, com uma análise subsequente dos iões e de quaisquer fragmentos produzidos através do processo de ionização, com base na razão massa/carga (m/z). Após essa análise, o resultado final é demonstrado sob a forma de um espectro de massa. São necessárias 3 partes para um funcionamento correto de um espectrómetro de massa: uma fonte de ionização que tem como objetivo ionizar os compostos presentes na amostra, um analisador de massa que analisa os iões e as suas massas e um sistema de detecção de iões que permite obter as informações necessárias para a produção de um espectro. (Pitt, 2019).

As fontes de ionização mais comuns são a ESI (*electrospray ionisation*) e APCI (*atmospheric pressure chemical ionisation*). O ESI utiliza uma diferença de potencial que auxilia a transferência de iões da solução gasosa, antes de serem submetidos à análise por espectrometria de massa. Assim, as espécies iónicas em solução podem ser analisadas com maior sensibilidade. A transferência das espécies iónicas da solução para a fase gasosa compreende três etapas: a transformação do líquido em spray com azoto, a evaporação do solvente e a injeção de iões das gotículas altamente carregadas. O APCI é um processo de evaporação seguido por ionização e que ocorre em duas etapas básicas. A primeira

consiste numa nebulização e dessolvatação que ocorre numa câmara de vaporizador quente (250-400°C). A segunda etapa é a ionização, em que a molécula de solvente na fase gasosa é ionizada pela descarga de uma agulha. Este é mais adequado para amostras relativamente polares e não voláteis (Dias, 2018; Ho *et al.*, 2003).

Existem vários tipos de analisadores de massa que diferem na precisão, resolução e sensibilidade, sendo os mais comuns o quadrupolo simples, o triplo quadrupolo, o *Ion Trap* (armadilha de iões), o TOF (Tempo de voo, do inglês, *Time of Flight*) e o Q-TOF (Quadrupolo – Tempo de voo, do inglês, *Quadropole – Time of Flight*). O quadrupolo utiliza uma combinação de radiofrequências e corrente para separar os iões. Estes podem ser utilizados sozinhos ou combinados com outros equipamentos do mesmo tipo ou de outros tipos, como o triplo quadrupolo e o Q-TOF. Relativamente ao *Ion Trap*, os iões são mantidos num pequeno volume (armadilha) através da aplicação de um campo elétrico adequado. Por fim, o TOF contabiliza o tempo de voo dos iões ao longo do tubo que vai ser diferente consoante a sua razão massa/carga (Dias, 2018).

2. Objectivos

O principal objetivo desta dissertação consiste em quantificar o teor em glifosato, e em ácido xiquímico, um metabolito associado à presença de glifosato na planta, por HPLC-DAD-MS, em amostras de parte aérea de trigo. As amostras de trigo utilizadas no ensaio foram cultivadas num solo onde foram previamente desenvolvidas plantas colonizadoras de MER, removidas através da aplicação do herbicida, antes da plantação do trigo. Com este trabalho pretende-se perceber se a aplicação de glifosato, para remoção de plantas colonizadoras de MER, é uma prática agrícola segura, ou seja, se posteriormente existe ou não transferência do herbicida, via micélio extra-radicular, para a planta de trigo.

Os objetivos específicos necessários à conclusão do objetivo principal passam pela otimização dos processos.

- Otimização das condições de análise por HPLC-DAD-MS e determinação dos limites de deteção e quantificação do glifosato e do ácido xiquímico, através da realização de curvas de calibração construídas a partir de soluções-padrão;

- Otimização dos processos de extração. Serão testados vários métodos diferentes, que foram selecionados após uma revisão bibliográfica, baseados em trabalhos realizados

anteriormente e com resultados promissores. Será selecionado o método com a maior taxa de extração, através de comparação direta com as taxas de extração dos outros métodos, para cada um dos analitos, após dopagem das amostras com quantidades conhecidas;

Após otimização dos métodos analíticos e de extração, determinar as concentrações dos compostos em estudo, de forma a verificar se existe transferência do glifosato através das micorrizas de plantas *developer* tratadas com glifosato para a planta de cultivo que lhes sucede.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes e materiais específicos

As características, grau de pureza e os fabricantes dos reagentes e materiais utilizados neste trabalho são apresentados nas tabelas 2 e 3, respetivamente.

Tabela 2: Reagentes utilizados durante o procedimento experimental

Reagente	Grau de Pureza	Fabricante
Glifosato	≥ 99 %	Sigma- Aldrich
Xiquimato	≥ 99 %	Sigma- Aldrich
Metanol	Grau HPLC gradiente	VWR
Acetonitrilo	Grau HPLC gradiente	VWR

Tabela 3: Material específico utilizado durante o procedimento experimental

Material	Fabricante
Tubos de <i>Falcon</i> 15mL e de 50mL	VWR
Vials para análise LC-DAD-MS	VWR
Filtros de amostra 0.45 µm, PTFE, 25 mm	VWR
Pontas de pipetas e pipetas de 1mL e 5mL	
Material corrente de laboratório	

3.2. Equipamentos

Os modelos e os fabricantes dos equipamentos utilizados neste trabalho são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Equipamentos utilizados durante o procedimento experimental

Equipamento	Modelo
Equipamento de LC-DAD-MS	Thermo Fisher Surveyor
Ultracongelador	U 570
Centrifugadora	Rotofix 32 A Hettich
Banho de ultrassons	VWR Ultrasonic Cleaner
Sistema de Purificação de Água	Mili-Q, Simplicity, Milipore Corp

3.3. Procedimento Experimental

3.3.1. Ensaio das plantas

As amostras de planta foram obtidas em dois ensaios em vasos (A e B), realizados numa estufa em ambiente controlado, segundo o desenho experimental descrito por Brito *et al.*, 2014. Os vasos, com capacidade de 8 L, foram preenchidos com solo ácido onde foram colocadas plantas *developer* endémicas *Ornithopus compressus* L. (ORN). Após 7 semanas, as plantas colonizadoras foram eliminadas, deixando o solo não perturbado (MER intacto).

Ambos os ensaios seguiram o desenho experimental descrito, apenas variando na maneira como a planta *developer* foi removida. No ensaio A, a planta *developer* foi removida através da aplicação de glifosato (tendo em conta a concentração indicada na embalagem, Roundup®). No ensaio B, a planta *developer* foi removida manualmente, sem aplicação de glifosato.

Sete dias após a eliminação dos *developers*, 10 plântulas de trigo (*Triticum aestivium* L. cv. Ardila) foram plantadas e, após 21 dias de crescimento, as plantas de trigo foram cortadas, pesadas, congeladas em azoto líquido e armazenadas a -80°C até serem analisadas (Faria *et al.*, (2021)).

3.3.2. Otimização das condições de análise do glifosato e do xiquimato por HPLC-DAD-MS

3.3.2.1. Análise por HPLC-DAD-MS

A separação e análise das amostras foi realizada por HPLC-DAD-MS. As amostras foram separadas numa coluna cromatográfica, com temperatura regulada a 25°C, Zorbax Eclipse XDB C18 4,6*150mm. Durante a análise, as amostras foram mantidas a uma temperatura de 24°C. A separação cromatográfica realizou-se através de uma fase móvel com um fluxo de 0,3 mL min⁻¹, injetando 20 µL de cada amostra, e utilizando como eluente A, 0,1% de ácido fórmico em água, e como eluente B, acetonitrilo. A análise foi realizada com o seguinte gradiente da fase móvel: linear 0-2% B, 0-15 min e 2-100% de B, 15-20 min. A identificação do glifosato e do xiquimato foi obtida utilizando os dois detetores de DAD

e MS, através da comparação dos espectros de absorção e massa, obtidos experimentalmente, com os correspondentes publicados na bibliografia para os compostos. A quantificação do glifosato e do xiquimato nas soluções padrão e amostras foi realizada por LC-MS.

3.3.2.2. Preparação das soluções padrão de glifosato e xiquimato e construção das retas de calibração

Foram preparadas soluções iniciais padrão stock de 2000 mg L⁻¹ de glifosato e de xiquimato, que foram subsequentemente diluídas até uma concentração de 250 mg L⁻¹. Posteriormente foram realizadas diluições destas soluções para concentrações de 100.0, 50.0, 25.0, 10.0, 5.0, 3.0, 1.0, 0.5 e 0.1 mg L⁻¹. As soluções padrão foram analisadas por LC-MS e determinadas as áreas dos picos correspondentes aos compostos e construídas as curvas de calibração (área do pico *versus* concentração), em triplicado, para o glifosato e o xiquimato.

3.3.2.3. Validação do método analítico: Reprodutibilidade, Repetibilidade

A repetibilidade e a reprodutibilidade dos métodos analíticos e dos métodos de quantificação na sua totalidade (procedimentos de extração e análise por LC-MS) foram avaliadas através da medição das áreas dos picos cromatográficos, correspondentes ao glifosato e ao xiquimato.

Os métodos de extração foram repetidos no mínimo três vezes e foram preparadas no mínimo três réplicas para cada concentração dos padrões para a construção das retas de calibração.

A repetibilidade do sistema LC-MS foi testada através da injeção de três replicados consecutivos da mesma solução padrão usando a mesma fase móvel e as mesmas condições de eluição, e foi avaliada como a dispersão (desvio padrão relativo) das áreas dos picos calculadas. A reprodutibilidade do sistema de LC-MS foi determinada pela performance da injeção de seis soluções padrão diferentes em dias diferentes usando sempre solvente recém preparado como fase móvel em cada dia, e foi avaliada como a dispersão ou desvio padrão relativo (%RSD) das áreas dos picos calculadas.

A reprodutibilidade do método analítico global foi determinada através da quantificação da extração dos compostos, pelo método de extração selecionado para cada composto, em dias diferentes, usando sempre em cada dia solvente recém preparado como fase móvel. A reprodutibilidade foi avaliada como a dispersão ou desvio padrão relativo (%RSD) das recuperações de glifosato e xiquimato.

Os resultados obtidos foram analisados através do método de análise de variância (ANOVA, factor único), Excel® Microsoft, para diferentes níveis de significância.

3.3.3. Métodos de extração

3.3.3.1. Maceração das amostras

Foram colocados os tubos de *falcon* e o almofariz numa caixa de esferovite preenchida com gelo. De seguida, foi colocada a amostra no almofariz e foi preenchido com azoto líquido. A amostra foi macerada até se transformar num pó fino. Após a maceração, recolocou-se azoto líquido e transferiu-se a amostra para os tubos de *falcon*, previamente arrefecidos dentro de gelo. Assim que o azoto líquido evaporou, o tubo foi armazenado a -80°C .

3.3.3.2. Método 1

Este método foi baseado no artigo de Gomes *et al.* (2015):

Foram pesados 100 mg de amostra macerada de planta e colocada dentro de tubos de *falcon*. Foram testadas 3 soluções de extração diferentes. A solução A era composta por água acidificada a $\text{pH} = 2.5$; a solução B era composta por acetonitrilo:água (50:50, v/v) e a solução C por metanol:água (50:50, v/v). Foram adicionados 10 mL das soluções de extração às amostras, e subsequentemente, estas foram submetidas a um banho ultrassónico durante 30 minutos. Depois do banho, as amostras foram centrifugadas a 4000g por 10 minutos à temperatura ambiente. Quando o processo de centrifugação terminou, foi filtrado e reservado o sobrenadante.

3.3.3.3. Método 2

Este método foi baseado no artigo de Zhang *et al.* (2020)

O glifosato é altamente solúvel em água e tem uma alta polaridade (Zhang *et al*, 2020). No entanto, a solução extraída pode apresentar-se turva.

Foram pesados 100 mg de amostra macerada de planta e foi colocada em tubos de falcon. Foi adicionado 10 mL de água ultrapura como solução de extração. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000g duas vezes, por 15 minutos. Foi filtrado e reservado o sobrenadante obtido.

3.3.4. Ensaio de Recuperação

As amostras de planta, utilizadas nos ensaios de recuperação, foram amostras de planta de trigo (*Triticum aestivium* L. cv. Ardila), idênticas às amostras dos ensaios. Foram maceradas e colocadas em tubos de *falcon*. De seguida, foram dopadas com 2.5 mL de glifosato e xiquimato, com uma concentração conhecida de 100 mg L⁻¹ e que, após a adição das soluções de extração, correspondeu a uma concentração total de 20 mg L⁻¹ no extrato. Após essa adição, foram colocadas as diferentes soluções de extração, centrifugadas, filtradas e armazenadas. Foram posteriormente analisadas por LC-MS e obtidas as áreas dos picos dos cromatogramas.

3.3.5. Amostras Experimentais

Após a determinação dos métodos de extração mais eficientes para cada um dos analitos em estudo, procedeu-se à aplicação dos mesmos às amostras obtidas nos ensaios referidos anteriormente.

4. Apresentação e Discussão dos resultados

4.1. Ensaio das plantas

Os solos ácidos do Montado Alentejano contêm um elevado nível de manganês biodisponível e são muitas vezes tóxicos para o crescimento de plantas como o trigo. Os métodos atualmente aplicados para resolver este problema, através do recurso à aplicação de tratamentos químicos ao solo funcionam, mas a procura de métodos mais sustentáveis deve ser atualmente uma prática constante. De acordo com Yano & Takaki, 2005 e Brito *et al*, 2014, as micorrizas conseguem proteger as plantas em solos ácidos, impedindo os efeitos nocivos de fatores abióticos como a presença de quantidades tóxicas de Mn no solo. A forma mais eficiente de inocular as raízes das plantas de cultivo com FMA é através de um MER intacto, e, das plantas colonizadoras testadas em estudos anteriores, a ORN foi a planta *developer* com que se obtiveram melhores resultados (Brito *et al*, 2014).

Em função dos resultados obtidos por Faria *et al*, 2021, sabe-se que existe uma redução na absorção de Mn quando as plantas-alvo são inoculadas com FMA derivados de um MER desenvolvido por ORN. A proteção conferida é maior se o MER permanecer intacto entre a troca do *developer* para a planta-alvo, mas mesmo quando este é perturbado, confere alguma proteção. Foi provado pelo mesmo estudo também, que quando há uma menor concentração de Mn na planta, verifica-se um maior sequestro de Mn para as paredes celulares, reduzindo a quantidade de Mn em outras áreas da planta, como o vacúolo e nos organelos.

Em contexto macro agronómico, é complicado aplicar este tipo de técnicas porque requer que os campos não sejam perturbados, de maneira a proporcionar um benefício maior, e a remoção dos *developers* manualmente é absurda, logo é necessária a aplicação de herbicidas, que permitam remover a planta colonizadora de uma forma mais simples. No entanto, não existem estudos sobre a segurança da aplicação do glifosato durante este processo, ou seja, se após a remoção da planta *developer* não existe a possibilidade de passagem do herbicida, via MIR, para a planta de cultivo, neste caso o trigo.

O glifosato, como foi anteriormente referido, vai inibir a função da enzima EPSPS, impedindo a planta de produzir compostos essenciais ao seu desenvolvimento. Um dos

efeitos produzidos por esta inibição, é uma acumulação de xiquimato, o que será um também um indicador da presença de glifosato na planta de trigo, transferido via MER.

O objetivo principal deste trabalho foi o desenvolvimento de métodos analíticos que permitissem determinar a presença de glifosato na planta de trigo, crescida após o desenvolvimento de um MER intacto pela planta *developer* ORN. Para tal foram otimizados método de determinação do glifosato e do xiquimato, que pode ser um indicador da presença de glifosato, na parte aérea de plantas de trigo.

4.2. Identificação do Xiquimato e Glifosato por LC-DAD-MS

A identificação do glifosato e do xiquimato foi realizada por HPLC-DAD-MS. Nas figuras 8, 9, 10 e 11 apresentam-se os cromatogramas DAD e MS e os espectros de UV-Vis e massa, respetivamente, de uma solução padrão de glifosato.

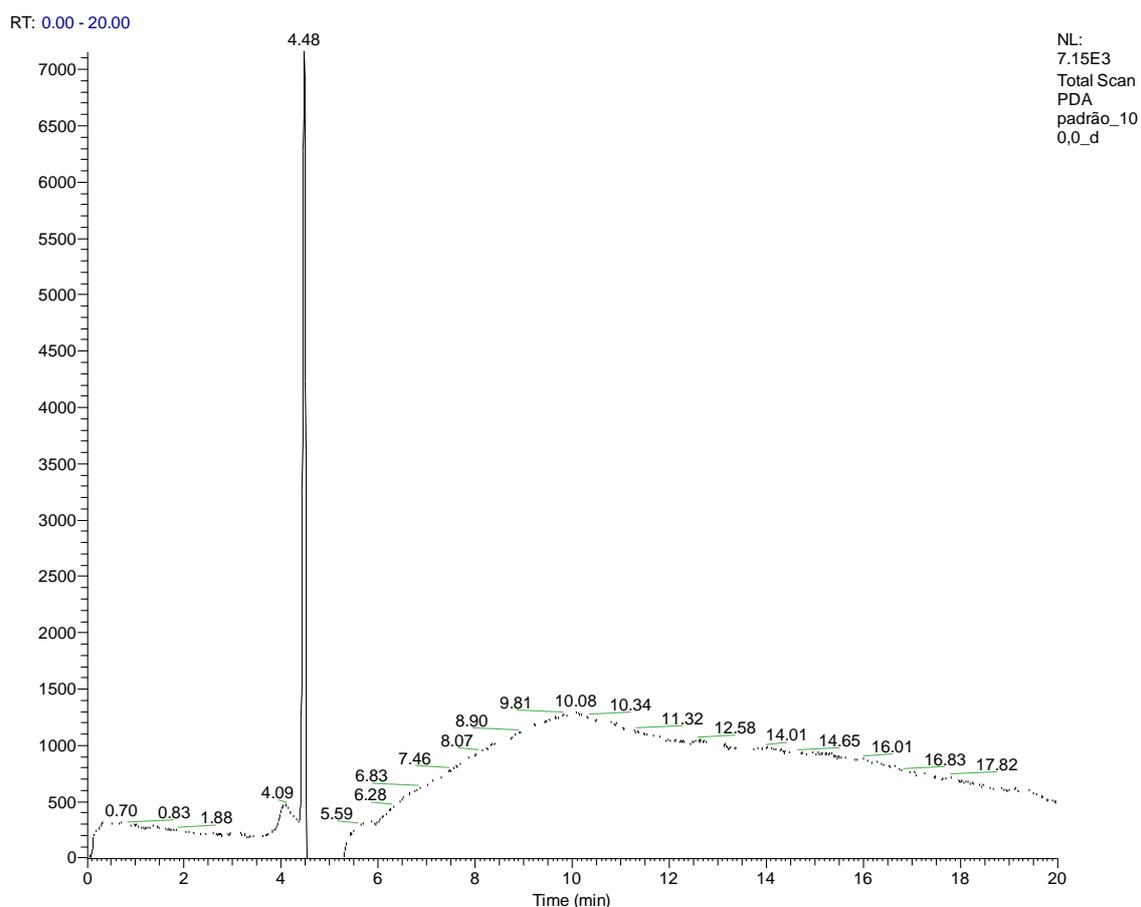


Figura 8: Exemplo de cromatograma fornecido pelo detetor DAD obtido para uma solução padrão de glifosato.

O pico detetado ao Tr 4.48 min, no cromatograma da figura 8, e com Tr 4.53 min na figura 9 corresponde ao glifosato. A identificação do composto foi realizada através da comparação dos espectros UV-Vis. e de massa, obtidos para este pico, com os publicados na bibliografia para este herbicida.

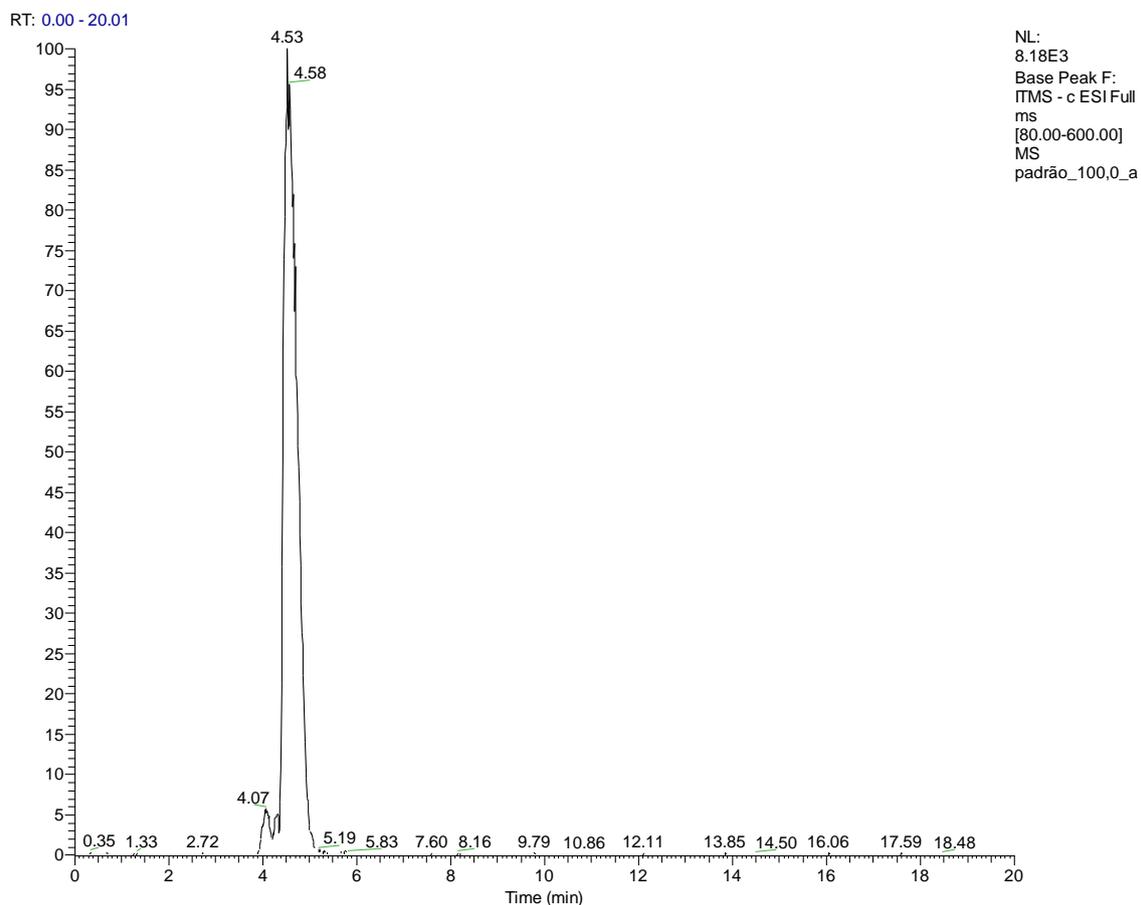


Figura 9: Exemplo de cromatograma Full MS obtido para uma solução padrão de glifosato.

O espectro de UV-Vis. da figura 10, obtido *on-line* para o pico com Tr 4.5 min, apresenta um máximo de absorção a 231 nm o que está de acordo com o espectro de absorção publicado na bibliografia para o glifosato (Khrolenko e Wieczorek, 2005)

padrão_100,0_a #1297 RT: 4.32 AV: 1 NL: 2.25E5 microAU

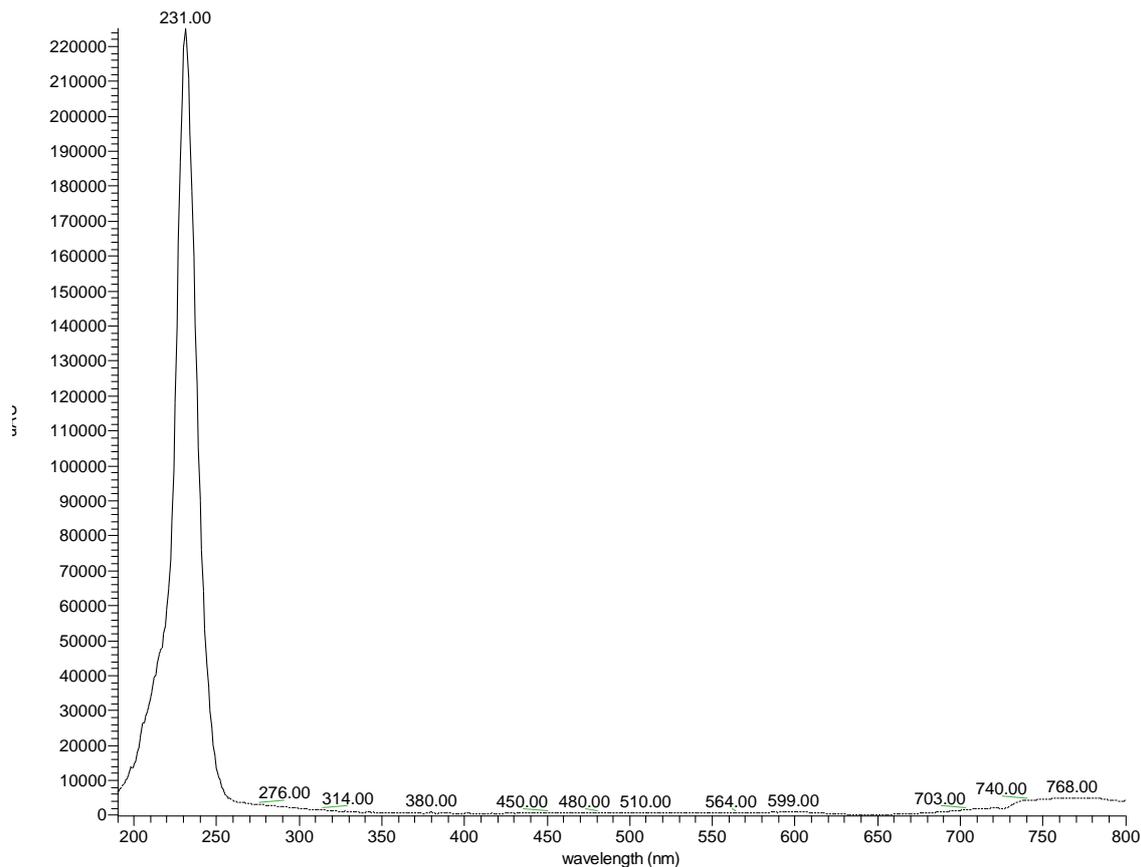


Figura 10: Espectro UV-Vis. obtido para o pico com Tr 4.3 min para o glifosato.

A massa molar do glifosato é $169.07 \text{ g mol}^{-1}$. Como as análises foram realizadas em modo de ionização negativa, o pico que é detetado para uma razão m/z 168.07 (figura 11) corresponde ao ião molecular $[M-H]^-$. Verifica-se também a formação de um dímero do glifosato, com razão m/z 336.94, que corresponde ao ião $[2M-H]^-$ e a formação de um trímero, com um pico a 505.72, que corresponde ao ião $[3M-H]^-$. Os iões com m/z 150.12 e 124.13 correspondem à perda de H_2O e CO_2 , respetivamente. (Goodwin *et al.*, 2003).

padrão_100,0_a #655 RT: 4.54 AV: 1 NL: 7.36E3
F: ITMS - c ESI Full ms [80.00-600.00]

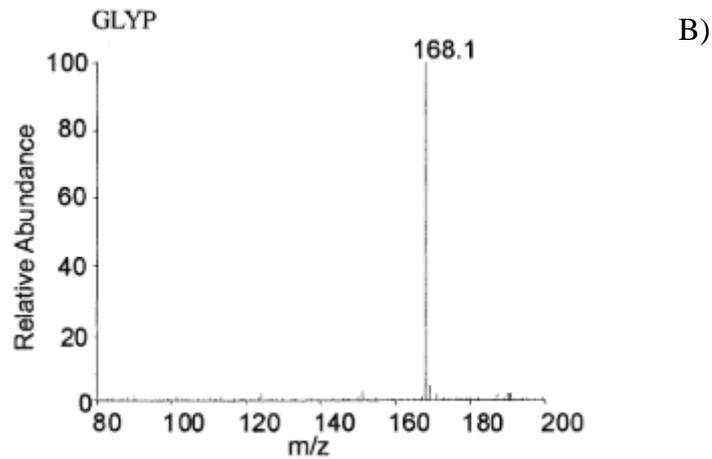
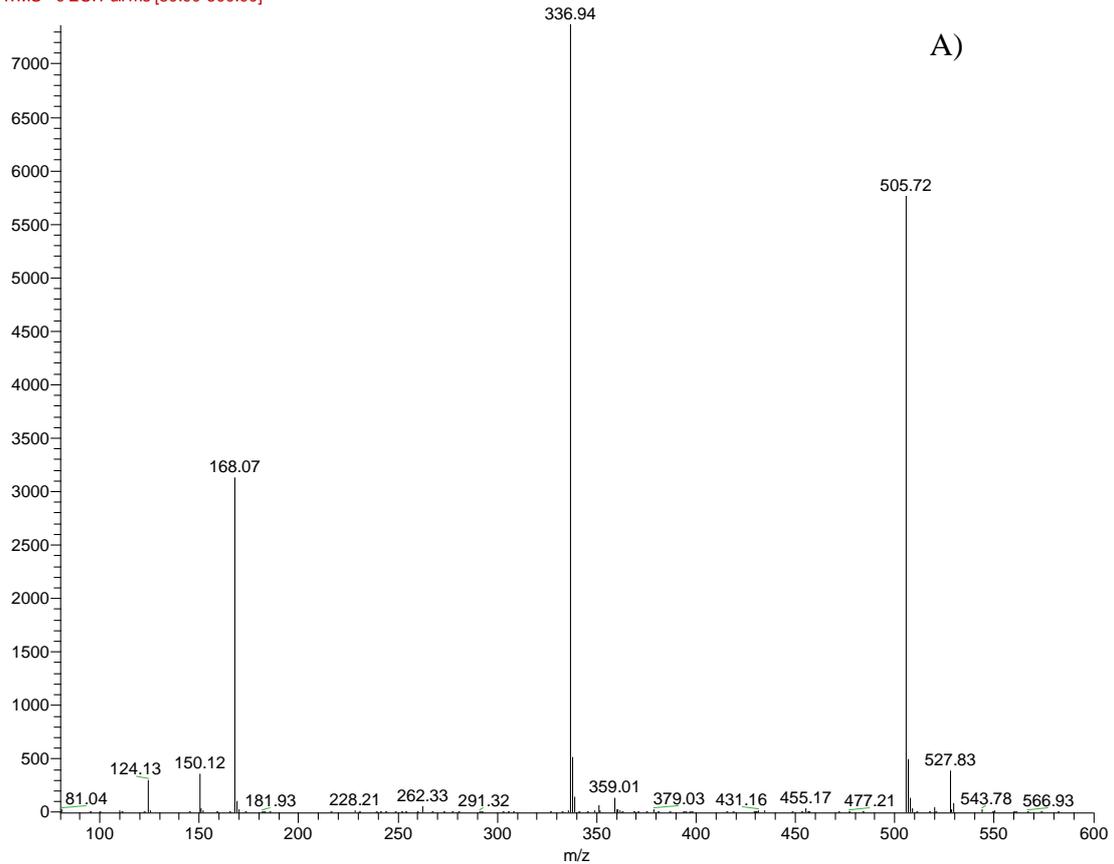


Figura 11: A) Espectro MS obtido para o pico com Tr 4,5 min (Glifosato) versus B) Espectro MS obtido para o glifosato (Goodwin et al., 2003)

As figuras 12 a 15 dizem respeito aos cromatogramas e espectros de massa e UV-Vis., respetivamente de uma solução padrão de xiquímato.

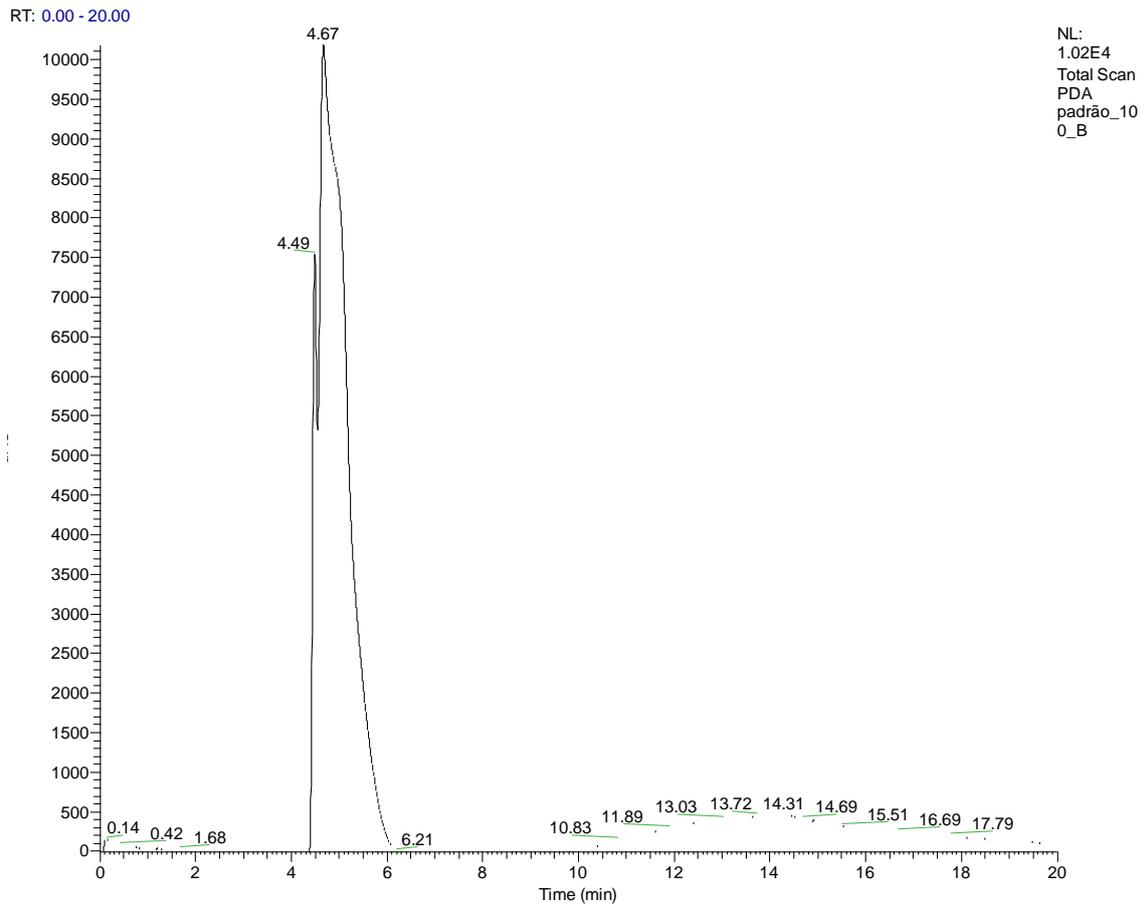


Figura 12: Exemplo de cromatograma fornecido pelo detetor DAD obtido para uma solução padrão de xiquimate

O pico detetado ao Tr 4.67 min, no cromatograma da figura 12, e com Tr 5.72 min na figura 13 corresponde ao xiquimate. A identificação do composto foi realizada através da comparação dos espectros UV-Vis. e de massa, obtidos para este pico.

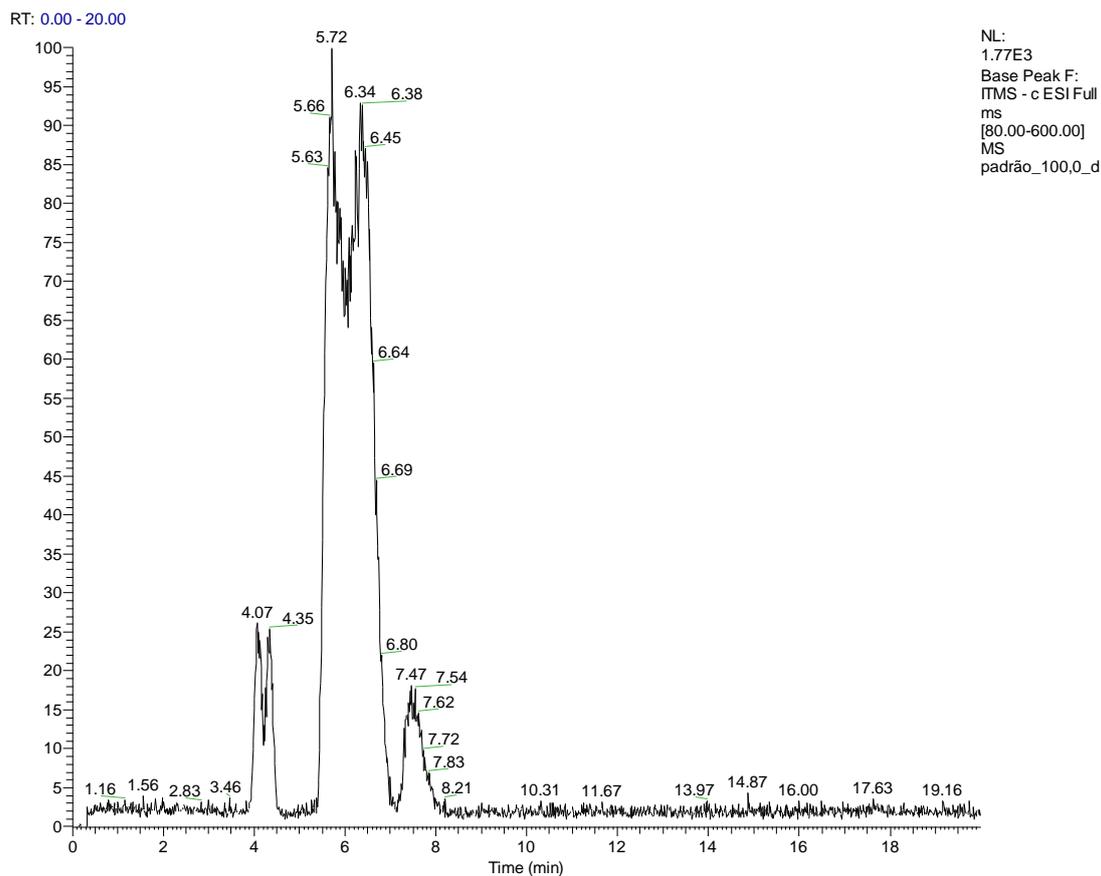


Figura 13: Exemplo de cromatograma tipo Full MS obtido para uma solução padrão de xiquimato.

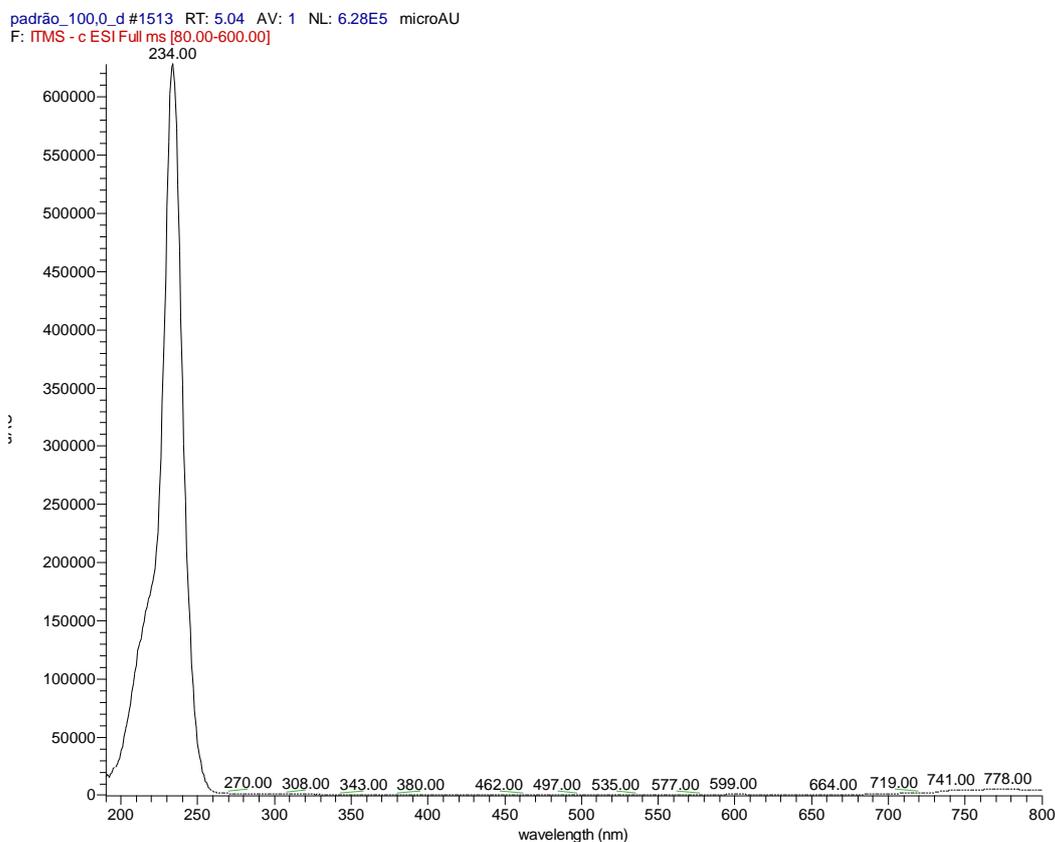


Figura 14: Espectro UV-Vis. obtido para o pico com Tr 5 min para o xiquimato.

O espectro de UV-Vis. da figura 14, obtido *on-line* para o pico com Tr 5 min, apresenta um máximo de absorção a 234 nm enquanto que na bibliografia, o máximo de absorção encontra-se a 211 nm (Huang *et al.*, 2019). Uma das possíveis causas para esta diferença poderá ser a utilização de uma solução móvel diferente da utilizada na bibliografia observada.

padrão_100.0_d #833 RT: 5.80 AV: 1 NL: 1.39E3
F: ITMS - c ESI Full ms [80.00-600.00]

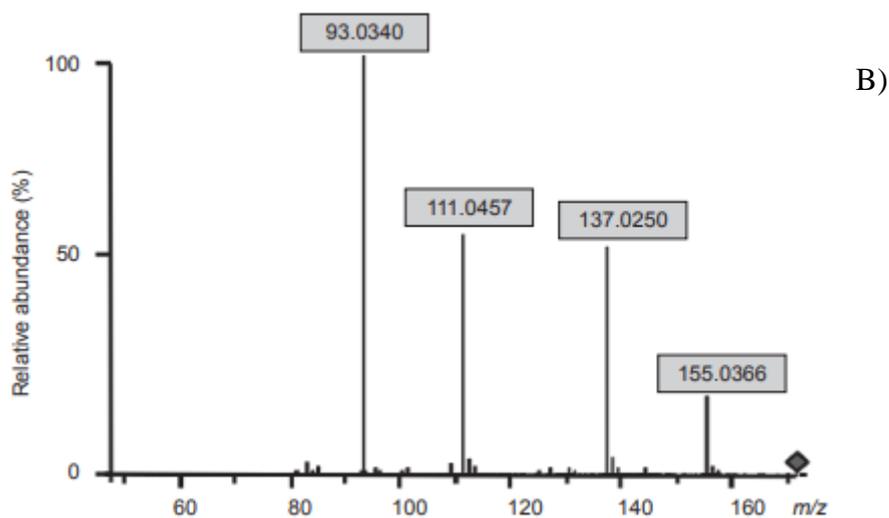
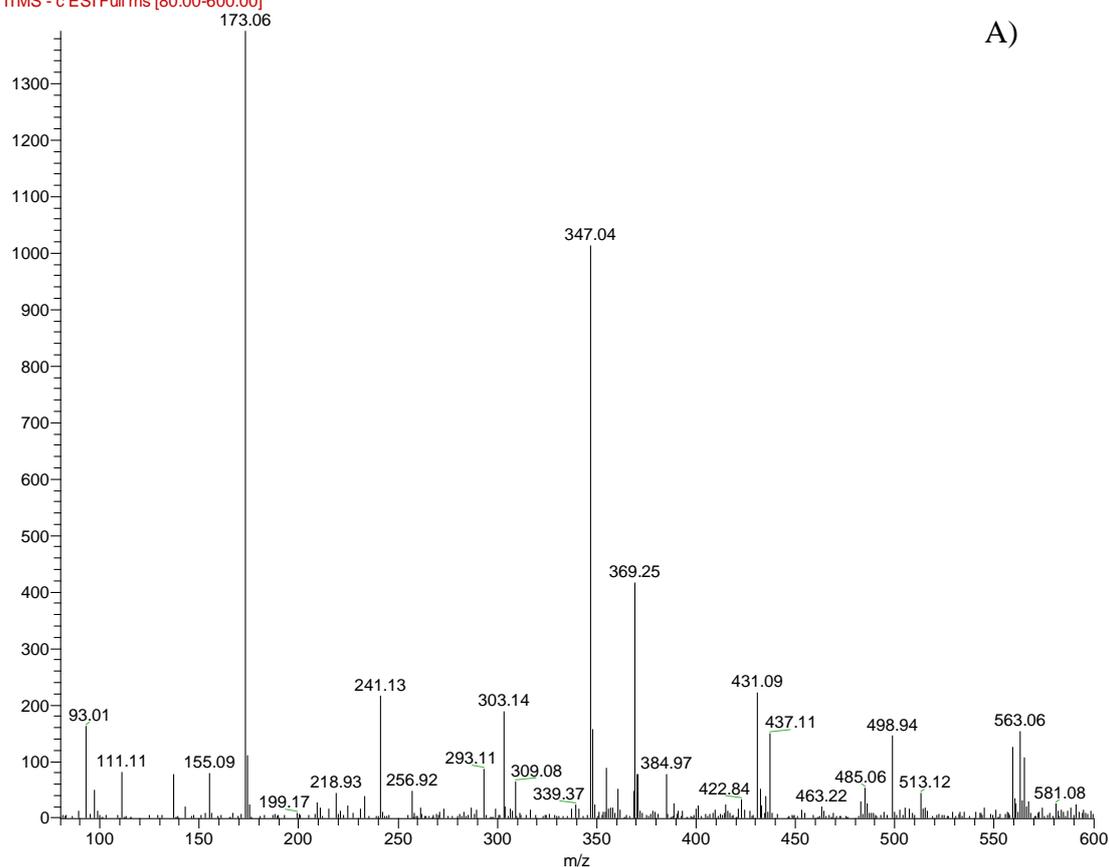


Figura 15: A) Espectro MS obtido para o pico com Tr 5,8 min para o xiquimato versus B) Espectro MS² de referência do xiquimato (Nurazah *et al.*, 2017).

A massa molar do xiquimato é $174.06 \text{ g mol}^{-1}$. Como as análises foram realizadas em ionização negativa, o pico que é detetado para uma razão de m/z 173.06 (figura 15) corresponde ao ião molecular $[M-H]^-$. Verifica-se também a formação de um dímero do xiquimato, com razão m/z 347.04, que corresponde ao ião $[2M-H]^-$. Os iões com m/z 155.09, 111.11 e 93.01 correspondem à perda de H_2O , H_2O-CO_2 e $2H_2O-CO_2$ respetivamente (Nurazah *et al.*, 2017).

4.3. Validação do método analítico

A quantificação do glifosato e do xiquimato foi realizada por LC-MS, através do registo das áreas dos picos nos cromatogramas, no modo SIM (do inglês *Single Ion Monitoring*), correspondentes a cada composto. Este modo de análise permite uma maior sensibilidade na determinação da área de cada pico, pois possibilita a quantificação isolada do ião molecular de cada composto no analisador do espectrómetro de massa.

A repetibilidade e a reprodutibilidade dos métodos analíticos e dos métodos de quantificação na sua totalidade (procedimentos de extração e análise por LC-MS) foram avaliadas através da medição das áreas dos picos cromatográficos correspondentes ao glifosato e ao xiquimato, como descrito na secção 3.3.2.3, e do cálculo dos valores desvio padrão relativo (%RSD) das áreas dos picos, tendo-se obtido sempre valores inferiores a 5%.

As áreas dos picos dos padrões de cada composto foram representadas com recurso a um gráfico de dispersão *versus* as concentrações de cada solução padrão. Foram realizadas três curvas, em triplicado, num total de 9 sequências analisadas e com a média das áreas obtidas para cada padrão foram construídos os gráficos presentes nas figuras 16 e 17.

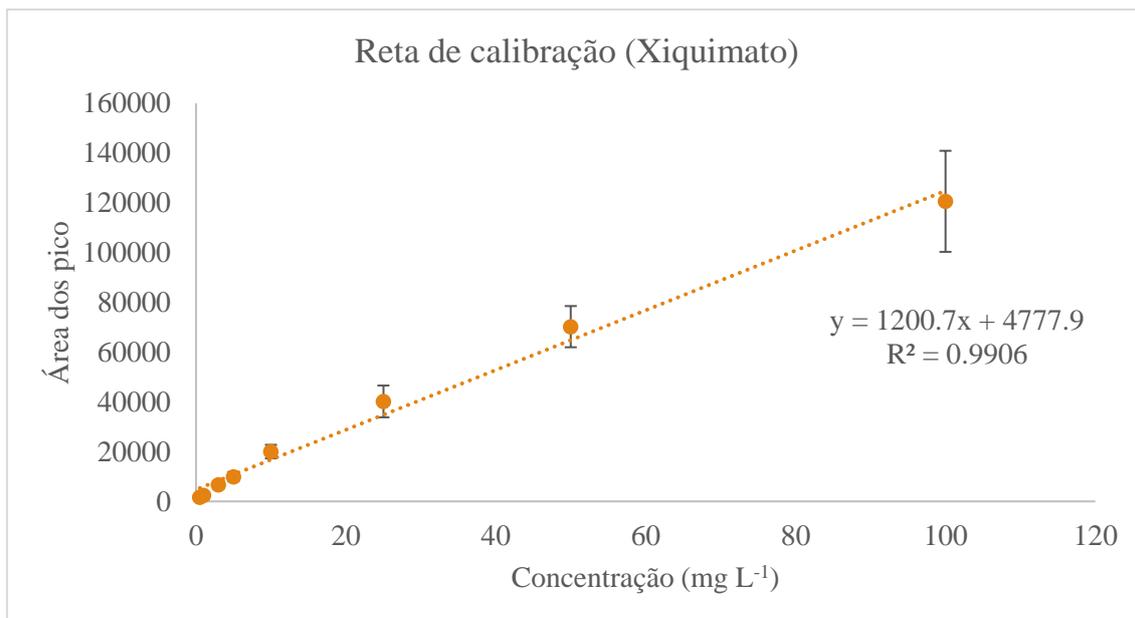


Figura 16: Reta de calibração para o Xiquimato. Equação da reta: $Y=1200.7x + 4777.9$ e $R^2=0.9906$

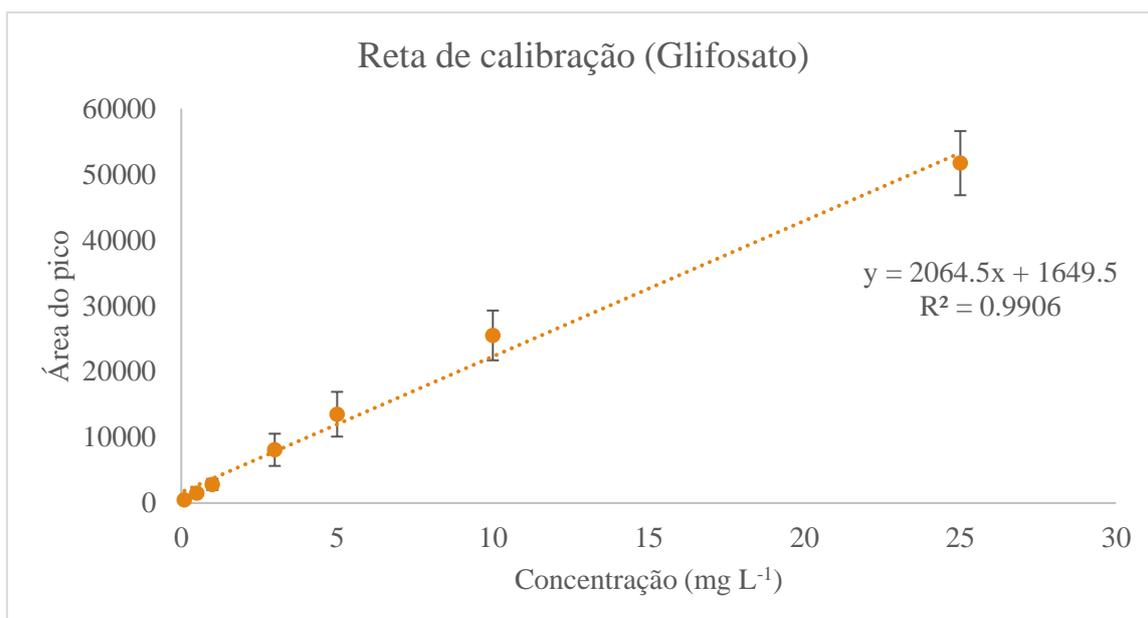


Figura 17: Reta de calibração para o Glifosato. Equação da reta: $Y=2064.5x + 1649.5$ e $R^2=0.9906$

Para ambos os analitos, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0.9906, o que demonstra linearidade para as concentrações utilizadas em estudo.

Os limites de deteção (LD) e os limites de quantificação (LQ) são dois parâmetros que indicam a concentração a partir da qual é possível detetar ou quantificar o analito em estudo. Para se proceder aos cálculos de LD e LQ, utilizaram-se as expressões 1 e 2 fornecidas pelo ICH (*International Council for Harmonisation of Technical*

Requirements for Pharmaceuticals for Human Use). A fórmula para o LD pode ser expressa da seguinte forma:

$$LD = \frac{3.3\sigma - b}{S} \quad (1)$$

em que σ é o desvio-padrão, b é a ordenada na origem e S é o declive da reta (Borman e Elder, 2017). Estes valores são obtidos por análise da regressão linear (Excel® Microsoft).

Para o LQ, a fórmula é ligeiramente diferente:

$$LQ = \frac{10\sigma - b}{S} \quad (2)$$

Após terem sido obtidas as equações das retas de calibração e realizadas as análises da regressão linear foi possível retirar os valores necessários ao cálculo do LD e do LQ através das equações (1) e (2), anteriormente referidas. Os resultados para cada analito foram colocados na tabela 4.

Tabela 4: Limites de deteção (LD) e limites de quantificação (LQ) para os diferentes analitos em estudo

	LD	LQ
Glifosato	1.40	12.32
Xiquimato	11.16	41.91

De acordo com a tabela 4 para o glifosato foi obtido um LD de 1.40 mg L⁻¹ e o um LQ de 12.32 mg L⁻¹. Para o xiquimato, foi obtido um LD de 11.16 mg L⁻¹ e um LQ de 41.91 mg L⁻¹. Os valores de LD e LQ obtidos são relativamente elevados e provavelmente acima dos valores de concentrações de glifosato e xiquimato que se podem encontrar nas amostras de planta de trigo. Em estudos futuros seria interessante testar outras alternativas analíticas para a quantificação destes compostos nestas matrizes, como por exemplo, alteração do tipo de coluna utilizada no equipamento de LC-MS. Existem vários estudos que indicam que a separação do glifosato e xiquimato por cromatografia líquida é mais eficiente se for usada uma coluna de troca iónica. Uma abordagem por cromatografia

gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) também seria interessante, mas a aposta deste grupo de trabalho no futuro será a utilização de um equipamento de LC-MS de elevada resolução, com analisador de espectrometria de massa Q-TOF (quadrupolo-tempo de voo), recentemente adquirido para o laboratório, que permite atingir valores de LD e LQ significativamente mais baixos.

4.4. Otimização dos métodos de extração

Após ter sido realizada a otimização dos métodos analíticos, procedeu-se à otimização dos métodos de extração. Estes métodos foram escolhidos de acordo com a bibliografia estudada (Gomes *et al.*, 2015 e Zhang *et al.*, 2020), e também de modo a tentar verificar, no caso da planta de trigo, qual o método mais eficiente para a extração dos analitos em estudo.

As amostras foram dopadas com uma concentração conhecida de glifosato e xiquimato, de 100 mg L⁻¹, que foi diluída até 20 mg L⁻¹ quando foi adicionada a solução de extração. Após a dopagem, foram adicionadas as soluções extratantes, sendo centrifugadas, recolhido o sobrenadante e filtradas através de um filtro de 0.45 µm. Depois de filtradas, as amostras foram analisadas através do sistema LC-MS, e foram obtidas as áreas dos picos dos gráficos do glifosato e do xiquimato, sendo estas utilizadas nas equações das retas de calibração, para serem obtidas as concentrações extraídas. A expressão 3 foi utilizada para o cálculo da eficiência da taxa de extração:

$$\text{Eficiência da taxa de extração (\%)} = \frac{\text{Quantidade de composto extraída}}{\text{Quantidade de composto dopada}} * 100$$

(3)

4.4.1. Glifosato

Amostras de plantas controlo foram dopadas com Glifosato a uma concentração conhecida de 20 mg L⁻¹. Foram seguidos os protocolos de extração para cada método. Os dados obtidos foram colocados na tabela 5. Nas figuras 18 e 19 apresentam-se exemplos de cromatogramas de amostras obtidos para um dos métodos de extração.

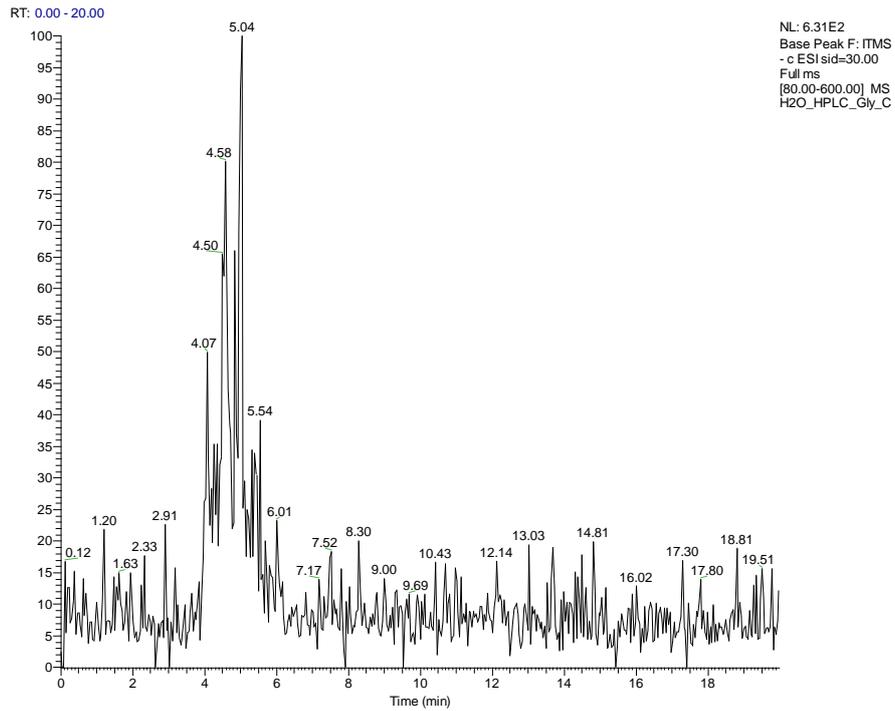


Figura 18: Exemplo de cromatograma Full MS de uma amostra obtida utilizando um dos métodos de extração testado para o Glifosato.

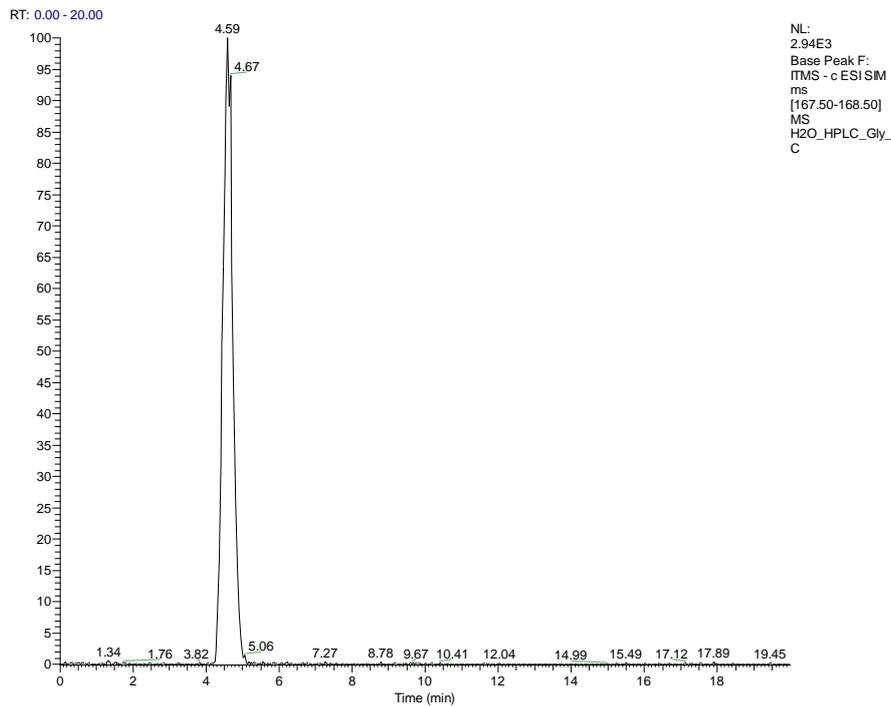


Figura 19: Exemplo de cromatograma SIM de uma amostra obtida utilizando um dos métodos de extração testados para o Glifosato.

Através da observação da figura 19, verifica-se a presença de um pico com um Tr de 4.5 min que corresponde ao glifosato.

Tabela 5: Eficiências de extração, em percentagem, dos diferentes métodos de extração para o glifosato. X = Letras diferentes nos índices das médias demonstram que estas são significativamente diferentes.

Método	Eficiência de extração (%)				
	A	B	C	Média ^X	Desvio-padrão
1a	7.31	7.24	7.32	7.29 ^d	0.03
1b	36.87	39.47	39.03	38.46 ^c	1.14
1c	54.79	68.15	74.25	71.20 ^a	3.05
2	56.84	49.98	50.71	52.51 ^b	3.08

1a- Método 1, solução extratante de água acidificada (pH = 2.5); 1b- Método 1, solução extratante de Acetonitrilo:Água (50:50, v/v); 1c- Método 1, solução extratante de Metanol:Água (50:50, v/v); 2- Método 2 com água ultrapura.

Valores escritos a vermelho representam outliers.

Os resultados da Tabela 5 correspondem às eficiências de extração obtidas para cada método de extração testado, utilizando a expressão 3, de acordo com os resultados obtidos nas condições testadas, tendo-se obtido valores de desvio padrão sempre inferiores a 5%.

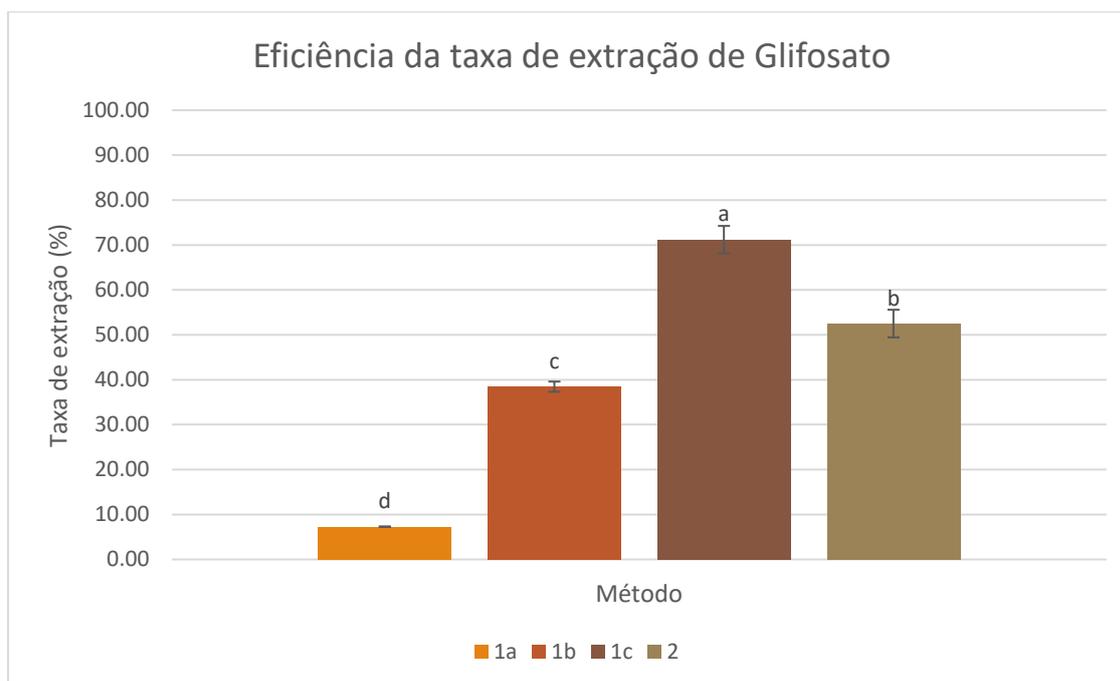


Figura 20: Eficiência da taxa de extração dos diferentes métodos para o glifosato. Letras diferentes demonstram que as médias são significativamente diferentes

Verificou-se que o método de extração para o glifosato mais eficiente foi o método 1c, que corresponde à extração com solução extratante Metanol:Água (50:50, v/v), seguido pelo método 2, que é água ultrapura.

Estes resultados são diferentes daqueles obtidos pelo autor do estudo dos métodos, Gomes *et al*, em que o método mais eficiente era o 1a, que corresponde à extração por água acidificada (pH = 2.5). Como se verificou, através da figura 20, esse método foi aquele em que obteve menor eficiência de extração para este composto. No entanto, estas diferenças podem dever-se ao facto da planta testada ser diferente. No estudo original, os métodos de extração foram testados em folhas de eucalipto e canas de açúcar, e também os tratamentos que precederam à extração das amostras eram diferentes, no sentido em que aqui as amostras estavam ultracongeladas e foram maceradas até terem ficado num pó fino, enquanto que no estudo original foram secas num forno e liofilizadas. Para o método 2, os resultados também foram diferentes dos obtidos pelos autores do estudo (Zhang *et al*, 2020), no sentido em que a eficiência de extração obtida experimentalmente pelos autores foi superior a 80%, enquanto que o que foi verificado nas condições atuais, é que apenas foi possível extrair cerca de 52%. Estas diferenças podem ter sido causadas por se tratar de amostras de uma planta diferente, e por isso com uma matriz eventualmente mais complicada, por erros experimentais e pelo facto destas as amostras terem sido armazenadas *overnight* devido a uma avaria inesperada no equipamento de LC-MS.

4.4.2. Xiquimato

Para o analito xiquimato, procedeu-se de igual maneira como foi para o analito glifosato. As amostras das plantas de controlo foram dopadas com uma concentração conhecida de 25 mg L⁻¹. Os exemplos dos cromatogramas obtidos apresentam-se nas figuras 21 e 22 e os dados obtidos são facultados na tabela 6.

Verificou-se, através da figura 22, um pico com um Tr de 5.9 min, que foi identificado, através dos espectros de UV-Vis. e MS, como sendo o xiquimato.

Tabela 6: Eficiências de extração, em percentagem, dos diferentes métodos de extração para o xiquimato. X = Letras diferentes nos índices das médias demonstram que estas são significativamente diferentes

Método	Eficiência de extração (%)				
	A	B	C	Média ^X	Desvio-padrão
1a	25.20	28.10	22.66	25.32 ^b	2.22
1b	17.89	51.00	57.03	54.02 ^a	3.02
1c	27.80	13.25	16.94	15.10 ^c	1.84
2	24.85	33.87	32.98	30.57 ^b	4.06

1a- Método 1, solução extratante de água acidificada (pH = 2.5); 1b- Método 1, solução extratante de Acetonitrilo:Água (50:50, v/v); 1c- Método 1, solução extratante de Metanol:Água (50:50, v/v); 2- Método 2 com água ultrapura.

Valores escritos a vermelho representam outliers.

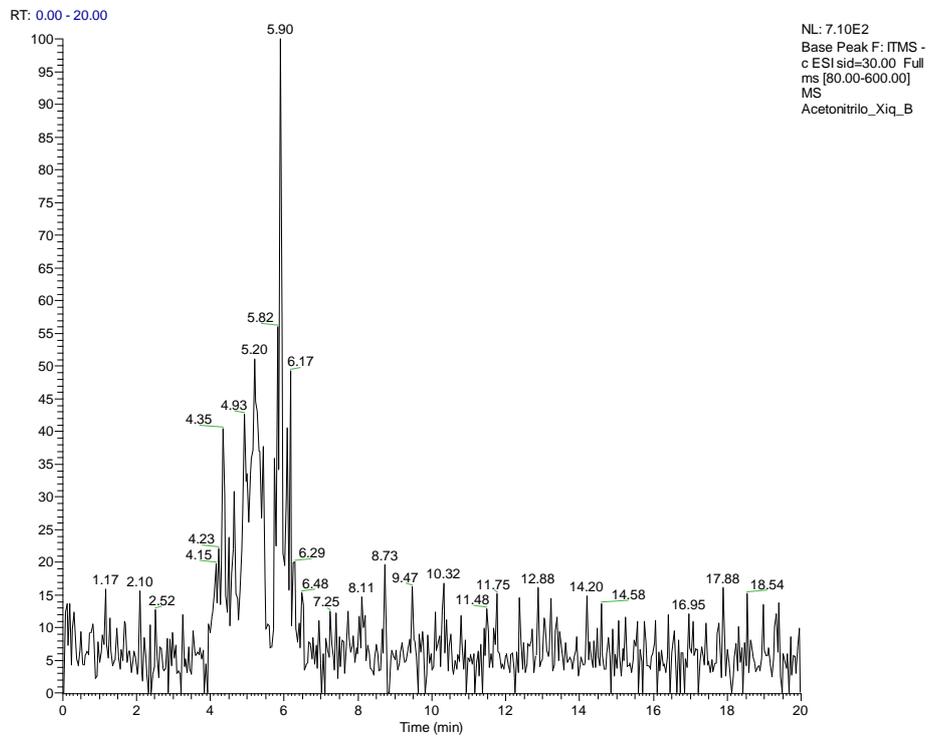


Figura 21: Exemplo de cromatograma Full MS de uma amostra obtida utilizando um dos métodos de extração testado para o xiquimato.

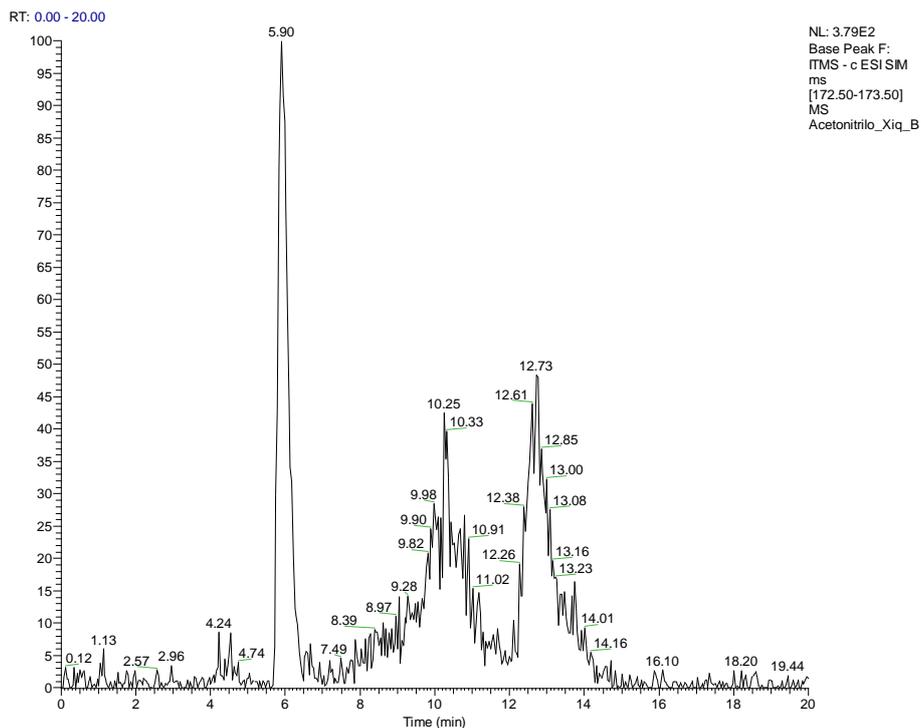


Figura 22: Exemplo de cromatograma SIM de uma amostra obtida utilizando um dos métodos de extração testados para o xiquimato.

Os resultados da tabela 6 correspondem às eficiências de extração para cada método testado, utilizando a expressão 3, de acordo com os resultados obtidos nas condições testadas.

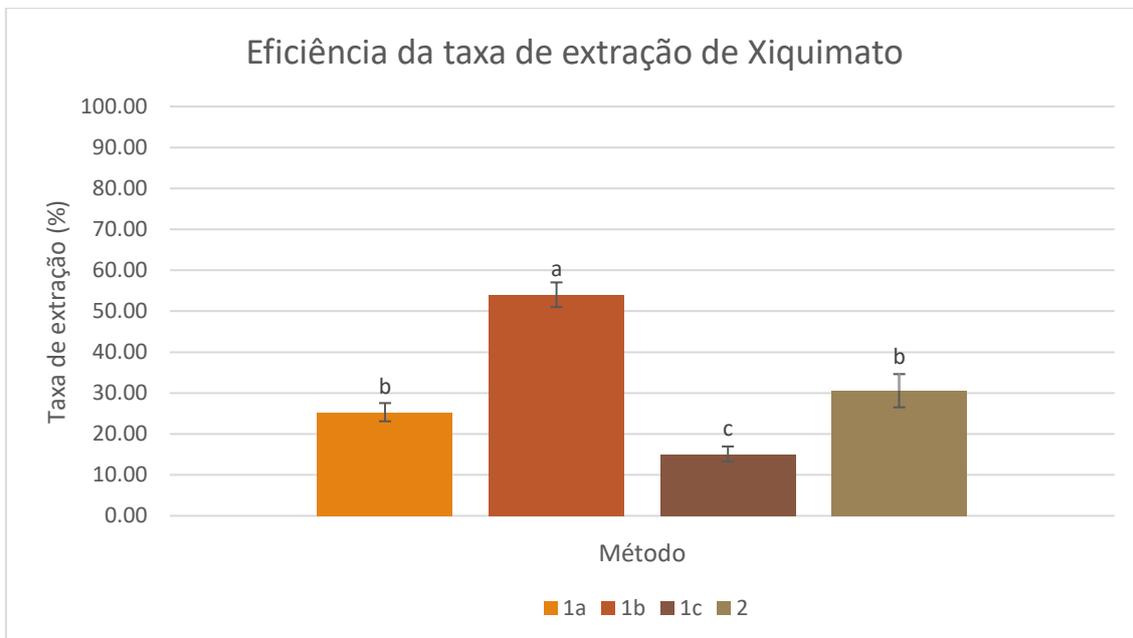


Figura 23: Eficiência da taxa de extração dos diferentes métodos para o Xiquimato. Letras diferentes demonstram que as médias são significativamente diferentes

Através da figura 23, verificou-se que o método de extração mais eficiente foi o método 1b, que corresponde à solução extratante Acetonitrilo:Água (50:50, v/v) sendo seguido pelos métodos 1a e 2, sendo estes água acidificada (pH = 2.5) e água ultrapura, respetivamente.

Estes resultados são também relativamente diferentes daqueles obtidos pelos autores do estudo de onde o método foi adaptado. De acordo com Gomes *et al*, a solução extratante com melhor eficiência de extração foi a água acidificada (pH = 2.5). No entanto, os resultados obtidos sugerem que o método 1b (Acetonitrilo:Água (50:50, v/v)) têm uma melhor eficiência de extração. Possíveis explicações para este resultado passam pelo tipo diferente de planta a ser estudada e também pela preparação da amostra antes das extrações.

4.5. Amostras Experimentais

Após a seleção dos métodos de extração mais eficientes para cada analito, estes foram aplicados às amostras experimentais obtidas nos ensaios A e B, anteriormente descritos. De uma forma geral, a principal diferença entre os dois ensaios esteve relacionada com o processo de remoção da planta colonizadora. No ensaio A, a planta *developer* foi removida através da aplicação de glifosato e no ensaio B, a planta *developer* foi removida manualmente.

As amostras foram tratadas consoante os métodos selecionados, sendo maceradas até estarem completamente pulverizadas. De seguida seguiu-se com o protocolo de extração para o glifosato através do método de extração 1c e para o xiquimato com o método 1b. Na figura 24 apresenta-se um exemplo de um cromatograma obtido para uma amostra real de folha de trigo.

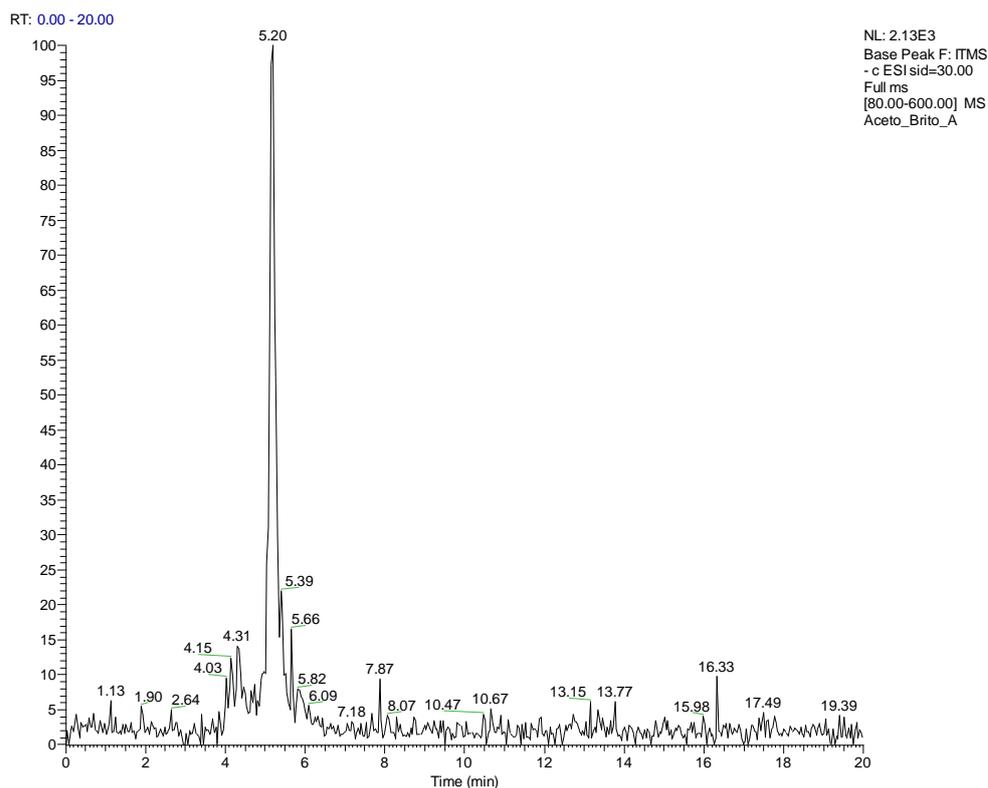


Figura 24: Exemplo de cromatograma Full MS de uma amostra real de trigo.

Não foi possível, nas condições em estudo, detetar glifosato em nenhuma das diferentes amostras. Este resultado sugere que não existe translocação de glifosato por via do MER quando ocorre colonização das raízes da planta, ou que se existe, não está presente em concentrações suficientemente altas para ser detetado. No entanto, pode argumentar-se que, se não está em condições elevadas o suficiente para ser detetado, também eventualmente não consegue exercer os seus efeitos nocivos na planta e animais e humanos que a venham a consumir. No entanto, esta suposição teria que ser relacionada com outros estudos de toxicidade do glifosato em seres vivos.

Os resultados obtidos para a deteção do xiquimato nas amostras de planta de trigo provenientes dos ensaios A e B são apresentados na tabela 7 e na figura 25.

Tabela 7: Concentrações de xiquimato (mg L^{-1}) extraídas das amostras experimentais
X = Letras nos índices diferentes representam médias significativamente diferentes.

Ensaio	Concentração de xiquimato (mg L^{-1})					
	I	II	III	IV	Média ^X	Desvio
A	42.72	35.81	39.56	28.36	36.61 ^a	5.35
B	40.62	47.99	41.62	44.13	43.59 ^a	2.85

A - Amostras provenientes do ensaio cujas plantas *Developer* foram eliminadas com recurso ao glifosato; B - Amostras provenientes do ensaio cujas plantas *Developer* foram manualmente removidas

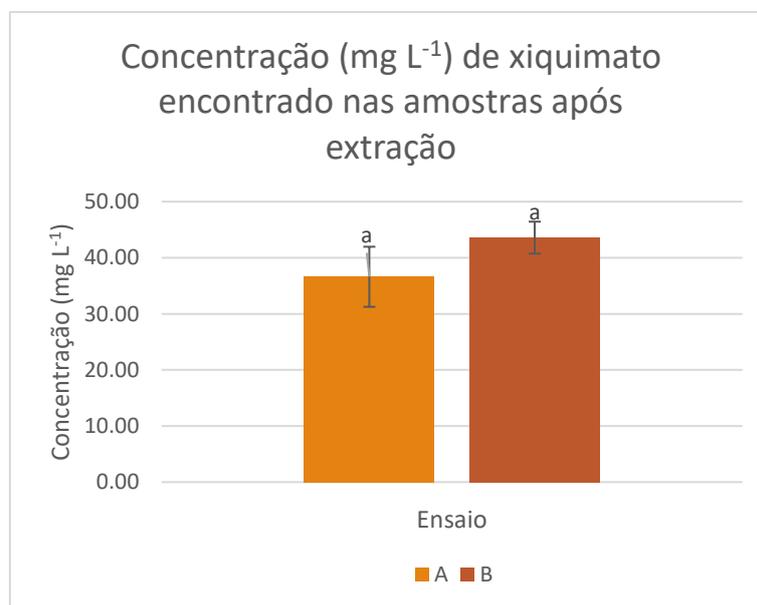


Figura 25: Concentrações (mg L⁻¹) de xiquimato detetado nas amostras após extração. Letras diferentes nos índices representam amostras significativamente diferentes.

De acordo com a figura 25, foi verificado que não existem diferenças significativas entre as médias das concentrações de xiquimato detetadas nas amostras de planta para os dois ensaios. Isto quer dizer que tanto para as amostras provenientes de vasos cujos *developers* foram tratados com glifosato, como para as amostras cujos *developers* foram removidos manualmente, apresentaram quantidades semelhantes de xiquimato. Um dos efeitos causados pela aplicação de glifosato, como já foi referido anteriormente, é a acumulação de xiquimato dentro da planta, devido à impossibilidade de prosseguir com a cadeia metabólica que o processa. Estes resultados sugerem que não existe glifosato dentro das amostras.

É, no entanto, necessário reforçar a noção que estes resultados apenas sugerem que, com os equipamentos utilizados e os métodos estudados, não se detetou glifosato nas amostras.

5. Conclusão

Este trabalho tinha como objetivos, a otimização dos métodos de extração e análise dos os compostos em estudo (glifosato e xiquimato) em amostras de folhas de plantas de trigo. Foram otimizados os métodos analíticos e testados vários métodos de extração do glifosato e do xiquimato, com o objetivo de selecionar o método com maior eficiência de extração e aplicar em amostras experimentais, através da realização de análises cromatográficas num sistema HPLC-MS.

O método de extração para o glifosato mais eficiente, tendo em conta as condições em estudo, verificou-se ser o método 1c, cuja solução extratante é composta por Metanol:Água (50:50, v/v). Os resultados obtidos mostraram ser diferentes em relação aos resultados previstos na bibliografia, no entanto, podem dever-se ao tipo de planta ser diferente e à preparação das amostras também ter sido diferente.

O método de extração mais eficiente para a extração de xiquimato foi o método 1b, em que a solução extratante é composta por Acetonitrilo:Água (50:50, v/v). Aconteceu o mesmo que no método anterior, em que os resultados obtidos são diferentes dos originais, pelas mesmas razões anteriormente apresentadas.

Não foi detetado, em nenhuma amostra testada, o glifosato, o que sugere que não existe passagem do herbicida através do MER entre a planta *Developer* e o trigo. Os resultados obtidos para os valores de xiquimato apontam na mesma direção, em que, para as plantas utilizadas nos dois ensaios diferentes (com e sem recurso ao glifosato para remover a planta colonizadora), a quantidade de xiquimato detetado não foi significativamente diferente. Como um dos efeitos da aplicação de glifosato nas plantas, é a acumulação de xiquimato devido à interrupção dos ciclos metabólicos, estes valores não serem significativamente diferentes reforça a ideia de que não existia glifosato na planta, logo não existe translocação do mesmo via MER.

No entanto, é importante ressaltar que por o glifosato não ter sido detetado, não significa que não esteja presente. Significa que nas condições em estudo, com os equipamentos e os métodos utilizados, não foi possível ser detetado. Mas se não for detetado a estas baixas concentrações, pode dizer-se que mesmo que esteja presente, os seus efeitos tóxicos não estão a ser sentidos pela planta.

Referências

1. Alloush, G. A., & Clark, R. B. (2001). Maize response to phosphate rock and arbuscular mycorrhizal fungi in acidic soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 32(1–2), 231–254. <https://doi.org/10.1081/CSS-100103004>
2. Becerril, J. M., Duke, S. O., & Lydon, J. (1989). Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. *Phytochemistry*, 28(3), 695–699. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80095-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80095-0)
3. Benmoussa, H., Farhat, A., Romdhane, M., & Bouajila, J. (2019). Enhanced solvent-free microwave extraction of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil seeds using double walled reactor. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 3863–3870. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.02.010>
4. Blamey, F.P.C., McKenna, B.A., Li, C., Cheng, M., Tang, C., Jiang, H., Howard, D.L., Paterson, D.J., Kappen, P., Wang, P., Menzies, N.W., Kopittke, P.M., (2018). Manganese distribution and speciation help to explain the effects of silicate and phosphate on manganese toxicity in four crop species. *New Phytol.* 217, 1146–1160. <https://doi.org/10.1111/nph.14878>.
5. Borman, P. and Elder, D. (2017). Q2(R1) Validation of Analytical Procedures. In *ICH Quality Guidelines* (eds A. Teasdale, D. Elder and R.W. Nims). <https://doi.org/10.1002/9781118971147.ch5>
6. Briat, J. F., & Lebrun, M. (1999). Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences - Serie III*, 322(1), 43–54. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(99\)80016-X](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(99)80016-X)
7. Brígido C, van Tuinen D, Brito I, Alho L, Goss MJ, Carvalho M (2017). Management of the biological diversity of AM fungi by combination of host plant succession and integrity of extraradical mycelium. *Soil Biology and Biochemistry* 112: 237-247. DOI: 10.1016/j.soilbio.2017.05.018 <http://hdl.handle.net/10174/21098>
8. Brito, I., Carvalho, M., & Goss, M. J. (2021). Managing the functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungi for the sustainable intensification of crop production. *Plants, People, Planet*, 3(5), 491– 505. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10212>
9. Brito, I., Carvalho, M., Alho, L., & Goss, M. J. (2014). Managing arbuscular mycorrhizal fungi for bioprotection: Mn toxicity. *Soil Biology and Biochemistry*, 68, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.09.018>
10. Bromilow, R. H., & Chamberlain, K. (2000). The herbicide glyphosate and related molecules: Physicochemical and structural factors determining their mobility in phloem. *Pest Management Science*, 56(4), 368–373. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200004\)56:4<368::AID-PS153>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<368::AID-PS153>3.0.CO;2-V)
11. C. Santos-Buelga, C. Garcia-Viguera, and F. Tomás-Barberán, in C.Santos-Buelga
12. Cardoso, E. J. B. N., Navarro, R. B., & Nogueira, M. A.. (2003). Absorção e translocação de manganês por plantas de soja micorrizadas, sob doses crescentes

- deste nutriente. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 27(3), 415-423. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832003000300003>
13. Carvalho, M. (1987) - Factores limitantes e técnicas culturais da produção de trigo mole no Alentejo. Tese de doutoramento. Évora, Universidade de Évora, 214 p
 14. Carvalho, M., Goss, M. J., & Teixeira, D. (2015). Manganese toxicity in Portuguese Cambisols derived from granitic rocks: causes, limitations of soil analyses and possible solutions. *Revista de Ciências Agrárias*, 38(4), 518–527. <https://doi.org/10.19084/rca15137>
 15. Caseley, J. C., and D. Coupland. "Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake, movement and activity." *Herbicide glyphosate*/edited by E. Grossbard, D. Atkinson (1985). *Chemistry*, Cambridge, (2003), Ch. 5
 16. Chen, H. (2013). Optimization of microwave-assisted extraction of resveratrol from *Polygonum cuspidatum* sieb et Zucc by orthogonal experiment. *Nat Prod Indian J*, 9(4), 138-42.
 17. Conde-Hernández, L. A., Espinosa-Victoria, J. R., Trejo, A., & Guerrero-Beltrán, J. (2017). CO₂-supercritical extraction, hydrodistillation and steam distillation of essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Food Engineering*, 200, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.12.022>
 18. Dias, C. B. (2018). *Espectrometria de massa Análise Bioquímica II*
 19. Dill, G.M., Sammons, R.D., Feng, P.C.C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., Bleeke, M., Honegger, J.L., Farmer, D., Wright, D. and Haupfear, E.A. (2010). Glyphosate: Discovery, Development, Applications, and Properties. In *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds*, V.K. Nandula (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9780470634394.ch1>
 20. Dmisten, K. E. L. E., & Ells, R. A. W. (2002). Tolerance and Accumulation of Shikimic Acid in Response to Glyphosate Applications in Glyphosate-Resistant and Nonglyphosate-Resistant Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). 506–512. <https://doi.org/10.1021/jf0110699>
 21. El-Jaoual, T., Cox, D.A., (1998). Manganese toxicity in plants. *J. Plant Nutr.* 21, 353–386. <https://doi.org/10.1080/01904169809365409>.
 22. Falcão, M. A., Scopel, R., Almeida, R. N., do Espírito Santo, A. T., Franceschini, G., Garcez, J. J., Vargas, R. M. F., & Cassel, E. (2017). Supercritical fluid extraction of vinblastine from *Catharanthus roseus*. *Journal of Supercritical Fluids*, 129(March), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.03.018>
 23. Faria, J. M. S., Teixeira, D. M., Pinto, A. P., Brito, I., Barrulas, P., Alho, L., & Carvalho, M. (2020). Toxic levels of manganese in an acidic Cambisol alters antioxidant enzymes activity, element uptake and subcellular distribution in *Triticum aestivum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 193(February), 110355. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110355>
 24. Faria, J. M. S., Teixeira, D. M., Pinto, A. P., Brito, I., Barrulas, P., & Carvalho, M. (2020). Arbuscular Mycorrhiza Inoculum Type Influences Phosphorus Subcellular Distribution in Shoots of Wheat Grown in Acidic Soil under Sustainable Agricultural

- Practices. *Biology and Life Sciences Forum*, 4(1), 62. <https://doi.org/10.3390/iecps2020-08596>
25. Faria, J. M. S., Teixeira, D. M., Pinto, A. P., Brito, I., Barrulas, P., & Carvalho, M. (2021). The protective biochemical properties of arbuscular mycorrhiza extraradical mycelium in acidic soils are maintained throughout the mediterranean summer conditions. *Agronomy*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/agronomy11040748>
26. Fässler, E., Robinson, B. H., Stauffer, W., Gupta, S. K., Papritz, A., & Schulin, R. (2010). Phytomanagement of metal-contaminated agricultural land using sunflower, maize and tobacco. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 136(1–2), 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2009.11.007>
27. Ferreira, A. C. A. (2009). Avaliação da sensibilidade de espécies não alvo a três princípios activos de pesticidas. Universidade de Aveiro, 83
28. Francenia Santos-Sánchez, N., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., & Villanueva-Cañongo, C. (2019). Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*, 1–15. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83815>
29. Franz JE, Mao MK and Sikorski JA, Glyphosate: A Unique and Global Herbicide. ACS Monograph No. 189. American Chemical Society, Washington, DC, 653 pp. (1997).
30. George, E., Horst, W. J., & Neumann, E. (2011). Adaptation of Plants to Adverse Chemical Soil Conditions. In Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00017-0>
31. Giesy, J. P., Dobson, S., & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167, 35–120. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1156-3_2
32. Gizir, A. M., Turker, N., & Artuvan, E. (2008). Pressurized acidified water extraction of black carrot [*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.] anthocyanins. *European Food Research and Technology*, 226(3), 363–370. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0546-z>
33. Gomes, M. P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M., & Juneau, P. (2014). Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 65(17), 4691–4703. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru269>
34. Goodwin, L., Startin, J. R., Goodall, D. M., & Keely, B. J. (2003). Tandem mass spectrometric analysis of glyphosate, glufosinate, aminomethylphosphonic acid and methylphosphinicopropionic acid. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17(9), 963–969. <https://doi.org/10.1002/rcm.1007>
35. Gorga, A., Rindone, G. M., Centola, C. L., Sobarzo, C., Pellizzari, E. H., Camberos, M. del C., Cigorraga, S. B., Riera, M. F., Galardo, M. N., & Meroni, S. B. (2020). In vitro effects of glyphosate and Roundup on Sertoli cell physiology. *Toxicology in Vitro*, 62, 104682. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104682>
36. Goss, M. J., Carvalho, M., & Brito, I. (2017). Functional diversity of mycorrhiza and sustainable agriculture: Management to overcome biotic and abiotic stresses. 1st edn.

- Academic Press/Elsevier. eBook ISBN: 9780128042861 - Paperback ISBN: 9780128042441. <http://hdl.handle.net/10174/21473>
37. Grossbard E and Atkinson D (eds), *The Herbicide Glyphosate*. Butterworth & Co., London, UK, 490 pp. (1985).
 38. Heap, A. J., and Newman, E. I. (1980). Links between roots by hyphae of vesicular–arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist* 85, 169–171.
 39. Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., Ng, K. F., Suen, M. W., & Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical biochemist. Reviews*, 24(1), 3–12.
 40. Holländer-Czytko, Heike, and Nikolaus Amrhein. "Subcellular compartment of shikimic acid and phenylalanine in buckwheat cell suspension cultures grown in the presence of shikimate pathway inhibitors." *Plant Science Letters* 29.1 (1983): 89-96.
 41. Huang, K., Li, M., Liu, Y., Zhu, M., Zhao, G., Zhou, Y., Zhang, L., Wu, Y., Dai, X., Xia, T., & Gao, L. (2019). Functional Analysis of 3-Dehydroquinate Dehydratase/Shikimate Dehydrogenases Involved in Shikimate Pathway in *Camellia sinensis*. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01268>
 42. Jensen, R.A. (1986), The shikimate/arogenate pathway: Link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiologia Plantarum*, 66: 164-168. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb01251.x>
 43. Khrolenko, M. V., & Wieczorek, P. P. (2005). Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *Journal of Chromatography A*, 1093(1–2), 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.062>
 44. Kirkwood, R. C., Hetherington, R., Reynolds, T. L., & Marshall, G. (2000). Absorption, localisation, translocation and activity of glyphosate in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L) Beauv): Influence of herbicide and surfactant concentration. *Pest Management Science*, 56(4), 359–367. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200004\)56:4<359::AID-PS145>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200004)56:4<359::AID-PS145>3.0.CO;2-S)
 45. Korn, M., Júnior, D. S., Santana, R. de M., & Krug, F. J. (n.d.). Ultrassons para o preparo de amostras.
 46. Kumar, P. R., Dinesh, S. R., & Rini, R. (2016). Lcms- A Review and a Recent Update. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(5), 377–391. <https://doi.org/10.20959/wjpps20165-6656>
 47. Lamelas, C. (2020). Deteção e quantificação do herbicida Glifosato em plantas do Montado Alentejano por técnicas cromatográficas.
 48. Mandal, S. C., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). Classification of Extraction Methods. In *Essentials of Botanical Extraction*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802325-9.00006-9>
 49. Millaleo, R., Reyes-Díaz, M., Ivanov, A. G., Mora, M. L., & Alberdi, M. (2010). Manganese as essential and toxic element for plants: Transport, accumulation and

- resistance mechanisms. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(4), 476–494. <https://doi.org/10.4067/s0718-95162010000200008>
50. Miller, J. N., & Miller, J. C. (2005). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Harlow, England: Pearson/Prentice Hall.
51. Monquero, P.A., Christoffoleti, P.J., Osuna, M.D., & De Prado, R.A.. (2004). Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. *Planta Daninha*, 22(3), 445-451. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-83582004000300015>
52. Moraes, D. P., Bizzi, C. A., Nóbrega, J. A., Flores, E. M. M., Nogueira, A. R., Barin, J. S., & Mesko, M. F. (2013). Preparo de amostras assitido por radiação microondas. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 301–369.
53. Nogueira, M. A., Magalhães, G. C., & Cardoso, E. J. B. N. (2004). Manganese Toxicity in Mycorrhizal and Phosphorus-Fertilized Soybean Plants. *Journal of Plant Nutrition*, 27(1), 141–156. <https://doi.org/10.1081/PLN-120027552>
54. Nurazah, Z., Idris, A. S., Kushairi, A., Din, A. M., Abrizah, O., & Ramli, U. S. (2017). Metabolomics unravel differences between Cameroon Dura and deli Dura oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic backgrounds against Basal stem rot. *Journal of Oil Palm Research*, 29(2), 227–241. <https://doi.org/10.21894/jopr.2017.2902.07>
55. O Duke, S., & B Powles, S. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 63(11), 1100–1106. <https://doi.org/10.1002/ps>
56. Pitt J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30(1), 19–34.
57. Qadir, M., Schubert, S., & Steffens, D. (2013). Phytotoxic Substances in Soils. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences* (Issue April). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.05255-6>
58. Ronald Bentley & E. Haslam (1990). The Shikimate Pathway – A Metabolic Tree With Many Branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 25:5, 307-384. DOI: 10.3109/10409239009090615
59. Schützendübel, A., Polle, A., (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53, 1351–1365. <https://doi.org/10.1093/jxb/53.372.1351>.
60. Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Ivanova, E. V., Epiktetov, D. O., & Leontievsky, A. A. (2015). Microbial degradation of glyphosate herbicides (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(2), 188–195. <https://doi.org/10.1134/S0003683815020209>
61. Teixeira, D. (2017). Métodos Cromatográficos TML1
62. Veggi, P. C. (2009). Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos. Dissertação (Mestrado Em Engenharia de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, 4(4), 165.
63. Vera, M. S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G. L., Rodríguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H., & Pizarro, H. (2010). New evidences of Roundup® (glyphosate formulation) impact on the periphyton

- community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19(4), 710–721. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0446-7>
64. Yano, K., & Takaki, M. (2005). Mycorrhizal alleviation of acid soil stress in the sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Soil Biology and Biochemistry*, 37(8), 1569–1572. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.01.010>
65. Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
66. Zhang, Y., Dang, Y., Lin, X., An, K., Li, J., & Zhang, M. (2020). Determination of glyphosate and glufosinate in corn using multi-walled carbon nanotubes followed by ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1619, 460939. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460939>

Anexos

Tabela 8: Valores obtidos através da leitura das diferentes concentrações (mg L^{-1}) do analito Glifosato.

*: ND = Não Detectado

Concentração (mg L^{-1})	A	B	C	Média (A+B+C)	Desvio- Padrão
0.1	ND*	ND*	ND*	-	-
0.5	1115	1163	1036	1105	52.36
1	2019	2070	1112	1734	440.08
3	4576	4527	5285	4796	346.35
5	9000	9271	9409	9227	169.89
10	20578	21136	19468	20394	693.28
25	58269	56959	56284	57171	824.08

Concentração (mg L^{-1})	D	E	F	Média (D+E+F)	Desvio- Padrão	Concentração (mg L^{-1})	Média Total	Desvio- Padrão
0.1	720	557	433	570	117.53	0.1	487	124.79
0.5	2038	1586	1767	1797	185.74	0.5	1491	309.05
1	3524	3228	3265	3339	131.68	1	2833	838.85
3	9553	11208	10553	10438	680.53	3	8098	2448.69
5	15559	16322	18717	16866	1345.41	5	13510	3402.83
10	30572	28859	27332	28921	1323.45	10	25497	3787.56
25	52110	52511	52511	52377	189.03	25	51708	4883.75

Concentração (mg L^{-1})	G	H	I	Média (G+H+I)	Desvio- Padrão
0.1	324	421	467	404	59.60
0.5	1571	1573	1569	1571	1.63
1	3793	3089	3398	3427	288.12
3	8623	9195	9363	9060	316.76
5	13409	16640	13265	14438	1558.16
10	27366	27635	26525	27175	472.79
25	47982	44613	44130	45575	1713.39

Tabela 9: Valores obtidos através da leitura das diferentes concentrações (mg L^{-1}) do analito Xiquimato.

*: ND = Não Detectado

Concentração (mg L^{-1})	A	B	C	Média (A+B+C)	Desvio- Padrão
0.1	ND*	ND*	ND*	-	-
0.5	1676	1552	1540	1589	61.48
1	2630	2610	2680	2640	29.44
3	7995	7233	8511	7913	524.95
5	10786	10067	11915	10923	760.61
10	20059	20158	20913	20377	381.39
25	42067	41728	46399	43398	2126.54
50	68374	67905	81145	72475	6133.84
100	114255	120318	137090	123888	9658.03

Concentração (mg L^{-1})	D	E	F	Média (D+E+F)	Desvio- Padrão	Concentração (mg L^{-1})	Média Total	Desvio Padrão
0.1	ND*	ND*	ND*	-	-	0.1	-	-
0.5	1686	1939	1568	1731	154.77	0.5	1660	137.42
1	3355	2865	3291	3170	217.48	1	2435	717.99
3	7490	7118	7408	7339	159.59	3	6640	1469.46
5	11902	11246	11445	11531	274.63	5	9958	1885.37
10	22473	21327	24945	22915	1509.75	10	20024	2727.21
25	44667	46436	45930	45678	743.91	25	40192	6385.77
50	72283	76588	81860	76910	3916.43	50	70242	8282.72
100	141600	147656	138180	142479	3918.14	100	120606	20330.44

Concentração (mg L^{-1})	G	H	I	Média (G+H+I)	Desvio- Padrão
0.1	ND*	ND*	ND*	-	-
0.5	ND*	ND*	ND*	-	-
1	1266	1529	1687	1494	173.65
3	4086	5115	4808	4670	431.33
5	7921	6936	7402	7420	402.32
10	15948	16299	18093	16780	939.42
25	31235	30230	33037	31501	1161.25
50	59961	56129	67937	61342	4918.56
100	91812	99341	95205	95453	3078.69

Tabela 10: Áreas dos picos dos gráficos obtidos através da análise dos replicados, para o analito glifosato

Glifosato	A	B	C	Média	Desvio-padrão
1a	5421	5386	5426	5411	18
1b	20679	22023	21792	21498	587
1c	29929	36822	39970	35574	4193
2	30987	27447	27820	28751	1588

Tabela 11: Concentrações (mg L⁻¹) para cada um dos replicados, para cada método testado, para o analito glifosato

Glifosato	A	B	C	Média	Desvio-padrão
1a	1.83	1.81	1.83	1.82	0.01
1b	9.22	9.87	9.76	9.61	0.28
1c	13.70	17.04	18.56	16.43	2.03
2	14.21	12.50	12.68	13.13	0.77

Tabela 12: Áreas dos picos dos gráficos obtidos através da análise dos replicados, para o analito xiquimato

Xiquimato	A	B	C	Média	Desvio-padrão
1a	12342	13213	11579	12378	668
1b	10149	20086	21898	20992	906
1c	13124	8756	9863	9310	554
2	12238	14946	14677	13954	1218

Tabela 13: Concentrações (mg L⁻¹) para cada um dos replicados, para cada método testado, para o analito xiquimato

Xiquimato	A	B	C	Média	Desvio-padrão
1a	6.30	7.03	5.66	6.33	0.56
1b	4.47	12.75	14.26	13.50	0.75
1c	6.95	3.31	4.24	3.77	0.46
2	6.21	8.47	8.24	7.64	1.01

Tabela 14: Output do teste ANOVA sobre os resultados obtidas na tabela 12.

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	4	156724	39181	55116759.33
Linha 2	4	190250	47562.5	15573419

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	140499084.5	1	140499085	3.975066631	0.093229	5.987378
Dentro de grupos	212070535	6	35345089			
Total	352569619.5	7				

Tabela 15: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o glifosato (Acetonitrilo/HPLC)

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	28.84258	9.6141923	0.121161798
Linha 2	3	39.38266	13.127553	0.887680451

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	18.51556	1	18.515556	36.70654353	0.003747	7.70864742
Dentro de grupos	2.017684	4	0.5044211			
Total	20.53324	5				

Tabela 16: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o glifosato (Acetonitrilo/pH)

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	28.84258	9.6141923	0.121161798
Linha 2	3	5.465972	1.8219908	0.000111446

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	91.07761	1	91.077606	1502.02309	2.65E-06	7.70864742
Dentro de grupos	0.242546	4	0.0606366			
Total	91.32015	5				

Tabela 17: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o glifosato (Acetonitrilo/Metanol)

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	28.84258	9.6141923	0.121161798
Linha 2	3	49.29644	16.432147	6.187982334

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	69.72675	1	69.726751	22.10339467	0.009299	7.70864742
Dentro de grupos	12.61829	4	3.1545721			
Total	82.34504	5				

Tabela 18: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o glifosato (HPLC/pH)

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	39.38266	13.127553	0.887680451
Linha 2	3	5.465972	1.8219908	0.000111446

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	191.7236	1	191.72361	431.911146	3.17E-05	7.70864742
Dentro de grupos	1.775584	4	0.4438959			
Total	193.4992	5				

Tabela 19: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o glifosato (HPLC/Metanol)

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	157.5306	52.510212	14.20288722
Linha 2	2	142.3938	71.1969	18.60071592

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	419.0308	1	419.03075	26.74295091	0.014031	10.1279645
Dentro de grupos	47.00649	3	15.66883			
Total	466.0372	4				

Tabela 20: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o glifosato (pH/Metanol)

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	3	5.465972	1.8219908	0.000111446
Linha 2	3	49.29644	16.432147	6.187982334

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	320.185	1	320.18498	103.4842039	0.000526	7.70864742
Dentro de grupos	12.37619	4	3.0940469			
Total	332.5612	5				

Tabela 21: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o xiquimato (Acetonitrilo/HPLC)

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	2	108.031	54.01549096	18.21954
Linha 2	3	91.70417	30.56805752	24.70144

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	659.7386	1	659.738562	29.26863	0.012384	10.12796
Dentro de grupos	67.62242	3	22.5408083			
Total	727.361	4				

Tabela 22: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o xiquimato (Acetonitrilo/pH)

Anova: factor único

SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	2	108.031	54.01549096	18.21954
Linha 2	3	75.95669	25.31889731	7.418687

ANOVA						
<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	988.1934	1	988.1933848	89.6811	0.002496	10.12796
Dentro de grupos	33.05691	3	11.01897041			
Total	1021.25	4				

Tabela 23: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o xiquimato (Acetonitrilo/Metanol)

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	2	108.031	54.01549096	18.21954
Linha 2	2	30.19305	15.09652703	6.800114

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1514.686	1	1514.685754	121.0797	0.008158	18.51282
Dentro de grupos	25.01965	2	12.50982595			
Total	1539.705	3				

Tabela 24: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o xiquimato (HPLC/pH)

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	91.70417	30.56805752	24.70144
Linha 2	3	75.95669	25.31889731	7.418687

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	41.33052	1	41.3305244	2.573497	0.183934	7.708647
Dentro de grupos	64.24026	4	16.0600652			
Total	105.5708	5				

Tabela 25: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o xiquimato (HPLC/Metanol)

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	91.70417	30.56805752	24.70144
Linha 2	2	30.19305	15.09652703	6.800114

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	287.2419	1	287.2419071	15.33238	0.029611	10.12796
Dentro de grupos	56.203	3	18.73433382			
Total	343.4449	4				

Tabela 26: Output do teste ANOVA entre os métodos de extração para o xiquimato (pH/Metanol)

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	3	75.95669	25.31889731	7.418687
Linha 2	2	30.19305	15.09652703	6.800114

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	125.3962	1	125.3962251	17.38597	0.025109	10.12796
Dentro de grupos	21.63749	3	7.21249593			
Total	147.0337	4				