

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Testes para detecção de aditividade, sinergismo ou antagonismo em misturas
binárias de herbicidas usando isobogramas

Danilo de Brito Garcia

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2023

Danilo de Brito Garcia
Engenheiro Agrônomo

**Testes para detecção de aditividade, sinergismo ou antagonismo em misturas binárias
de herbicidas usando isobogramas**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:

Prof. Dr. **PEDRO JACOB CHRISTOFFOLETI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitotecnia

Piracicaba
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Garcia, Danilo de Brito

Testes para detecção de aditividade, sinergismo ou antagonismo em misturas binárias de herbicidas usando isobogramas / Danilo de Brito Garcia. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

108 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. ADM 2. MSM 3. Sinergia 4. Isobole 5. *Lemna minuta*. I. Título

DEDICATÓRIA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

- À NDS, por toda sua compreensão, companherismo, atenção e paciência, mesmo quando os resultados encontrados não são os esperados;
- Ao meu pai, mãe e irmã, pelos constantes incetivos;
- Ao meu irmão, que sempre foi uma grande referência pra mim;
- À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”;
- Ao Prof. Dr. Pedro Jacob Christoffoleti, pela orientação;
- Ao Dr. Antonio Luiz Cerdeira, da Embrapa Meio Ambiente, por toda a ajuda e participação;
- Ao Dr. Cláudio Martin Jonsson, da Embrapa Meio Ambiente, pela recepção;
- Ao MSc. Rodrigo Fernandes Castanha, da Embrapa Meio Ambiente, pela recepção, compartilhamento de frondes e compartilhamento de conhecimento na criação de algas e *Lemna*.
- À professora Dra. Vali Joana Pott pela identificação da espécie de *Lemna* utilizada nesse trabalho.
- Ao amigo e colega Danilo Augusto Sarti por todas as sugestões e ajuda;
- À FMC Química do Brasil, por toda a abertura;
- À toda a equipe do Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da FMC de Paulínia, em especial a Samuel N. R. Alves, Marco A. Paris Jr., Gustavo S. da Silva , Murilo V. B. Bagatta, Leonardo Perez, Ana Paula M. e Fabio Silva.

EPÍGRAFE

“Time is a drug. Too much of it kills you.”

Terry Pratchett, Small Gods

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	15
1. INTRODUÇÃO	17
Referências.....	19
2. MACRÓFITAS DO GÊNERO <i>LEMNA</i> , MODELOS DE REFERÊNCIA NO ESTUDO DE MISTURAS E ISOBOLOGRAMAS	21
2.1. Macrófitas do gênero <i>Lemna</i>	21
2.1.1. Identificação da espécie de <i>Lemna</i>	22
2.1.2. Manutenção das <i>Lemna</i>	23
2.2. Modelos de referência no estudo de misturas e isobogramas	25
Referências.....	33
3. TESTES PARA DETECÇÃO DE ADITIVIDADE, SINERGISMO OU ANTAGONISMO EM MISTURAS DE GLIFOSATO E FLUMIOXAZINA, AMBOS EM FORMULAÇÃO COMERCIAL, USANDO ISOBOLOGRAMAS, EXPERIMENTOS FATORIAIS E <i>LEMNA MINUTA</i> COMO BIOINDICADOR ...	37
Resumo.....	37
Abstract	37
3.1. Introdução.....	38
3.2. Material e Métodos	39
3.3. Resultados e Discussão	41
3.4. Conclusão	48
Referências.....	48
4. TESTES PARA DETECÇÃO DE ADITIVIDADE, SINERGISMO OU ANTAGONISMO EM MISTURAS DE CLORIMURON ETÍLICO E SULFOMETUROM-METÍLICO, AMBOS EM FORMULAÇÃO COMERCIAL, USANDO ISOBOLOGRAMAS E <i>LEMNA MINUTA</i> COMO BIOINDICADOR.....	51
Resumo.....	51
Abstract	51
4.1. Introdução.....	52
4.2. Material e Métodos	53

4.3. Resultados e Discussão.....	55
4.4. Conclusão.....	59
Referências	60
5. TESTES PARA DETECÇÃO DE ADITIVIDADE, SINERGISMO OU ANTAGONISMO EM MISTURAS DE ATRAZINA E MESOTRIONA, AMBOS EM FORMULAÇÃO COMERCIAL E COMO PRODUTOS TÉCNICOS, USANDO ISOBOLOGRAMAS E <i>LEMNA MINUTA</i> COMO BIOINDICADOR.....	63
Resumo	63
Abstract	63
5.1. Introdução	64
5.2. Material e Métodos.....	66
5.3. Resultados e Discussão.....	68
5.4. Conclusão.....	79
Referências	79
6. CONCLUSÕES	83
APÊNDICES.....	85

RESUMO

Testes para detecção de aditividade, sinergismo ou antagonismo em misturas binárias de herbicidas usando isobogramas

As misturas de herbicidas podem fornecer maior controle de plantas daninhas e são fundamentais para evitar o aparecimento de resistência e possibilitar seu manejo. Além disso, há interesse na interação entre os componentes de uma mistura, que podem resultar em maior ou menor controle do que o esperado. Para se estimar a resposta esperada entre dois herbicidas de uma mistura caso não haja interação, um modelo de referência é necessário. Os modelos aditivo (ADM) e multiplicativo (MSM) são comumente usados com esse propósito. O MSM assume que os componentes da mistura agem de forma independente e seu efeito conjunto é uma combinação de probabilidades. O ADM assume que os componentes da mistura podem ser substituídos um pelo outro em termos de potência, porém demanda maior esforço experimental. Estudos em pequena escala, em ambientes controlados, com macrófitas aquáticas do gênero *Lemna* são uma opção para viabilizar esses experimentos. Um método utilizado para analisar experimentos de mistura de herbicidas é o uso de isobogramas. Ao plotar nos eixos x e y de um gráfico a dose de cada herbicida aplicado isoladamente para se obter o mesmo nível de resposta, uma linha – isobole – pode ser traçada para mostrar a combinação de doses necessárias para se atingir esse mesmo nível de resposta. Isso também permite estudar efeitos sinérgicos, antagônicos ou aditivos. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar o efeito das misturas entre os herbicidas Roundup Original DI® (glifosato) e Flumyazin 500® (flumioxazina), Curavial® (sulfometurom-metílico) e Classic® (clorimuron etílico), Proof® (atrazina) e Callisto® (mesotriona) e atrazina e mesotriona como produtos técnicos usando como bioindicador clones de macrófitas da espécie *Lemna minuta* e crescimento relativo em área como variável resposta para traçar isobogramas. Para cada mistura, foram feitos dois experimentos no delineamento clássico de misturas binárias em diferentes proporções. As misturas consistiram em curvas de dose-resposta dos dois herbicidas aplicados individualmente e em proporções pré-definidas tal que cada herbicida tenha as seguintes contribuições em potência na mistura 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100, sendo 100:0 e 0:100 os dois herbicidas aplicados isoladamente. As isoboles foram comparadas com o modelo aditivo e com modelos que permitem testar a distribuição dos pontos no isobograma de forma simétrica e assimétrica em relação à linha de aditividade. Para a mistura entre glifosato e flumioxazina, também foram feitos experimentos em delineamento fatorial para comparação ao MSM. Os dois isobogramas da mistura entre glifosato e flumioxazina não demonstraram grande efeito de interação entre os dois herbicidas e a distribuição dos pontos ficou ao redor da linha de aditividade e foi observado efeito aditivo. Isso foi corroborado pela análise conjunta dos experimentos fatoriais, que foi não significativa, indicando ausência de interação em relação ao MSM. Para a mistura entre clorimuron etílico e sulfometurom-metílico, os dois experimentos mostraram o mesmo padrão com todos os pontos da mistura situando-se abaixo da linha teórica da aditividade, demonstrando sinergismo. Nesse caso, para se obter o resultado esperado segundo o modelo aditivo, a mistura poderia ser aplicada com redução de dose de 30 a 40%. Para a mistura entre atrazina e mesotriona, ambos os experimentos com produtos comerciais resultaram em efeito aditivo. O mesmo foi encontrado para os produtos técnicos. As misturas tiveram um comportamento aditivo. Supõe-se que a capacidade de dissipação não fotoquímica de energia no fotossistema II das *Lemna* pode ser uma causa.

Palavras-chave: ADM, MSM, Sinergia, Isobole, *Lemna minuta*

ABSTRACT

Tests to detect additivity, synergism or antagonism in herbicide binary mixtures using isobolograms

The use of herbicide mixtures can provide better weed control and is essential to prevent the emergence and allow herbicide resistance management. In addition, there is interest in the interaction between the components of a mixture, which can result in greater or lesser control than expected. To estimate the expected response between two herbicides in a mixture in the absence of interaction, a reference model is needed. The additive (ADM) and multiplicative (MSM) models are commonly used for this purpose. MSM assumes that the components of the mixture act independently and their joint effect is a combination of probabilities. The ADM assumes that the components of the mixture can be substituted for each other in terms of potency, but it demands more experimental effort. Studies on a small scale, in controlled environments, with aquatic macrophytes of the genus *Lemna* are an option to make these experiments viable. A method used to analyze herbicide mixture experiments is the use of isobolograms. By plotting the dose of each herbicide applied individually on the x and y axes of a graph to obtain the same level of response, an isobole line can be drawn to show the combination of doses required to achieve the same level of response. This also allows the study of synergistic, antagonistic or additive effects. Therefore, the objective of this work is to study the effect of the mixtures between the herbicides Roundup Original DI[®] (glyphosate) and Flumyazin 500[®] (flumioxazin), Curavial[®] (sulfometuron-methyl) and Classic[®] (chlorimuron ethyl), Proof[®] (atrazine) and Callisto[®] (mesotrione) and atrazine and mesotrione as technical products using *Lemna minuta* clones as bioindicators and relative growth in area as an endpoint to plot isoboles. For each mixture, two experiments were done in the classic design of binary mixtures in different proportions. The mixtures consisted of dose-response curves of the two herbicides applied individually and in pre-defined proportions such that each herbicide has the following contributions in power in the mixture 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100, with 100:0 and 0:100 as the two herbicides applied individually. The isoboles were compared with ADM and with models that allow testing the distribution of points on the isobole symmetrically and asymmetrically in relation to the line of additivity. For the mixture between glyphosate and flumioxazin, factorial experiments were also performed for comparison to the MSM. The two isoboles of the mixture between glyphosate and flumioxazin did not show a significant interaction between the two herbicides and the distribution of points was around the line of additivity and an additive effect was observed. This was corroborated by the joint analysis of the factorial experiments, which was not significant, indicating the absence of interaction in relation to MSM. For the mixture between chlorimuron ethyl and sulfometuron-methyl, the two experiments showed the same pattern with all mixture points lying below the theoretical additivity line, demonstrating synergism. In this case, to obtain the expected result according to the additive model, the mixture could be applied with a dose reduction of 30 to 40%. For the mixture between atrazine and mesotrione, both experiments with commercial products resulted in an additive effect. The same was found for technical products. The mixtures showed an additive behavior. It is hypothesized that the ability of non-photochemical quenching in *Lemna*'s photosystem II may be one cause.

Keywords: ADM, MSM, Synergy, Isobole, *Lemna minuta*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. À esquerda, planta de *Lemna*. À direita, ocorrência de papilas (setas vermelhas) em material vegetal vivo de *Lemna*. 23
- Figura 2. Planta de *Lemna* clarificada com hipoclorito de sódio para observação da presença e tamanho da nervura nas frondes..... 23
- Figura 3. Ambiente de manutenção da cultura de *Lemna* – Conviron® (A) e a cultura de *Lemna* em recipiente de polipropileno (B)..... 24
- Figura 4. Curvas de dose-resposta dadas pela Equação 4, sendo a A com o mínimo (c) em 0, máximo (d) em 100, ponto de inflexão (e) igual a 5, e inclinação (b) igual a -2 e B com o mínimo (c) em 0, máximo (d) em 100, ponto de inflexão (e) igual a 5, e inclinação (b) igual a -5. A dose 5 corresponde ao ED50 para ambas as curvas. Em uma mistura hipotética de um herbicida com ele mesmo, a seta vermelha indica o valor de 75% como valor esperado pelo MSM para a variável resposta em uma mistura de 2 vezes a dose 5. Em A, curva com a menor inclinação, o valor esperado pelo MSM (75%) é próximo ao valor esperado pelo ADM (80%). Em B, curva com a maior inclinação, a diferença aumenta entre o valor esperado pelo MSM (75%) e pelo ADM (96,96%). Em ambos os casos, porém, o valor esperado pelo MSM é menor do que o valor real, o que poderia indicar sinergismo erroneamente, pois a resposta encontrada seria maior do que a esperada. 29
- Figura 5. Isobogramas representando misturas de dois herbicidas cujas curvas de dose-resposta são paralelas (esquerda) e não paralelas (direita). Isoboles são apresentadas para os níveis de 0,2; 0,5 e 0,9 de uma dada variável resposta segundo o modelo aditivo (AM, linhas vermelhas) e modelo multiplicativo (MSM, linhas pretas). Para as curvas paralelas, a potência relativa r não varia com os níveis da variável resposta. No exemplo, $r = 1,25$ ($d_a/d_b = 0,2/0,16$ para a isobole de 0,2; $d_a/d_b = 0,5/0,4$ para a isobole de 0,5 e $d_a/d_b = 0,9/0,72$ para a isobole de 0,9). Para as curvas não paralelas, a potência relativa r varia de acordo com o nível da variável resposta da isobole ($d_a/d_b = 0,2/0,2 = 1$ para a isobole de 0,2; $d_a/d_b = 0,4/0,7 = 0,57$ para a isobole de 0,5 e $d_a/d_b = 0,72/0,95 = 0,76$ para a isobole de 0,9). Adaptado de Streibig e Jensen (2000). 31

- Figura 6. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas glifosato e flumioxazina, em formulação comercial, aplicados isoladamente. Paulínia – SP. 42
- Figura 7. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas glifosato (gli) e flumioxazina (flu), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de gli e flu. Paulínia – SP..... 44
- Figura 8. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas glifosato (gli) e flumioxazina (flu), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de gli e flu. ADM calculado (linha contínua) é a isobole segundo o modelo ADM levando em conta todos os pontos para traçar a isobole. ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP..... 44
- Figura 9. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas glifosato (gli) e flumioxazina (flu), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de gli e flu. Hewlett (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Hewlett (1969). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP. 45
- Figura 10. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas glifosato (gli) e flumioxazina (flu), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de gli e flu. Voelund (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Voelund (1992). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP. 45
- Figura 11. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas sulfometurom-metílico e clorimuron etílico, em formulação comercial, aplicados isoladamente. Paulínia – SP..... 55
- Figura 12. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas sulfometurom-metílico

(sulf) e clorimuron etílico (clo), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de sulf e clo. Paulínia – SP... 57

Figura 13. Isobologramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de sulf e clo. ADM calculado (linha contínua) é a isobole segundo o modelo ADM levando em conta todos os pontos para traçar a isobole. ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP. 57

Figura 14. Isobologramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de sulf e clo. Hewlett (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Hewlett (1969). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP. 58

Figura 15. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina e mesotriona, em formulação comercial, aplicados isoladamente. Paulínia – SP..... 69

Figura 16. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. Paulínia – SP. 70

Figura 17. Isobologramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. ADM calculado (linha contínua) é a isobole segundo o modelo ADM levando em conta todos os pontos para traçar a isobole. ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP. 71

Figura 18. Isobologramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona

(meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. Hewlett (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Hewlett (1969). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP. 71

Figura 19. Isobologramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. Voelund (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Voelund (1992). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP. 72

Figura 20. Diagramas de caixa do crescimento relativo aos 7 dias após aplicação para o tratamento Testemunha absoluta (Meio) e o tratamento Testemunha para o solvente (Meio + Acetona a 2%), maior dose de solvente presente nos tratamentos, para dois experimentos (a) e (b). * corresponde à média. “Meio” refere-se ao meio Steinberg modificado. Paulínia – SP. 73

Figura 21. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina e mesotriona, como produtos técnicos, aplicados isoladamente. Paulínia – SP. 73

Figura 22. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), como produtos técnicos, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. Paulínia – SP. 75

Figura 23. Isobologramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina tec. (atra) e mesotriona tec. (meso), como produtos técnicos, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. ADM calculado (linha contínua) é a isobole segundo o modelo ADM levando em conta todos os pontos para traçar a isobole. ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP. 76

Figura 24. Isobologramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), como produtos técnicos, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de

75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. Hewlett (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Hewlett (1969). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.	76
Figura 25. Isobologramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de <i>Lemna minuta</i> sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atrazina tec.) e mesotriona (mesotriona tec.), como produtos técnicos, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atrazina e mesotriona. Voelund (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Vølund (1992). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.	77
Figura 26. Isobograma representativo de uma dada isobole de X% segundo o modelo ADM, sendo DA e DB, respectivamente as doses do herbicida A e B isoladamente que correspondem a X% de controle e dA e dB, respectivamente, as doses do herbicida A e B na mistura.....	86
Figura 27. Isobole para Dose Efetiva de 50% (ED50) de uma mistura fictícia de dois herbicidas, A e B, representando um desbalanceamento das doses utilizadas na mistura.	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meio Steinberg modificado utilizado na manutenção e experimentos com <i>Lemna</i> . Adaptado de ISO (2005)	25
Tabela 2. Distribuição das doses para as curvas de dose-resposta dos herbicidas glifosato (gli) e flumioxazina (flu), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em 3 misturas de diferentes proporções, Paulínia – SP.....	41
Tabela 3. Resultados das curvas de dose-resposta para glifosato e flumioxazina em formulação comercial aplicados isoladamente, Paulínia – SP.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
Tabela 4. Parâmetros das curvas de dose-resposta de dois experimentos (a) e (b) para glifosato e flumioxazina em formulação comercial em três misturas de diferentes proporções (25:75, 50:50, 75:25) e isolados (0:100, 100:0), Paulínia – SP.....	43
Tabela 5. Resultados das análises individuais de seis experimentos de mistura entre os herbicidas glifosato e flumioxazina em formulação comercial em relação ao modelo MSM usando crescimento relativo de <i>Lemna minuta</i> 7 dias após a aplicação, transformado para % de redução de crescimento em relação à testemunha, Paulínia – SP.	46
Tabela 6. Distribuição das doses para as curvas de dose-resposta dos herbicidas sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em 3 misturas de diferentes proporções, Paulínia – SP.....	54
Tabela 7. Parâmetros das curvas de dose-resposta para sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo) em formulação comercial aplicados isoladamente, Paulínia – SP.	56
Tabela 8. Parâmetros das curvas de dose-resposta de dois experimentos (a) e (b) para sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo) em formulação comercial em três misturas de diferentes proporções (25:75, 50:50, 75:25) e isolados (0:100, 100:0), Paulínia – SP.	56
Tabela 9. Distribuição das doses para as curvas de dose-resposta dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em 3 misturas de diferentes proporções, Paulínia – SP.....	67
Tabela 10. Distribuição das doses para as curvas de dose-resposta dos herbicidas como produtos técnicos atrazina (atra tec.) e mesotriona (meso tec.), aplicados isoladamente e em 3 misturas de diferentes proporções, Paulínia – SP.....	68

Tabela 11. Parâmetros das curvas de dose-resposta para atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente, Paulínia – SP.....	69
Tabela 12. Parâmetros das curvas de dose-resposta de dois experimentos (a) e (b) para atrazina (atra) e mesotriona (meso) em formulação comercial em três misturas de diferentes proporções (25:75, 50:50, 75:25) e isolados (0:100, 100:0), Paulínia – SP.	70
Tabela 13. Parâmetros das curvas de dose-resposta para atrazina (atra tec.) e mesotriona (meso tec.) como produtos técnicos aplicados isoladamente, Paulínia – SP.....	74
Tabela 14. Parâmetros das curvas de dose-resposta de dois experimentos (a) e (b) para atrazina (atra tec.) e mesotriona (meso tec.) como produtos técnicos em três misturas de diferentes proporções (25:75, 50:50, 75:25) e isolados (0:100, 100:0), Paulínia – SP.....	74
Tabela 15. Respostas esperadas (100 = sem efeito, 0 = morte total) para misturas do Herbicida A e Herbicida B, cada um aplicado em doses de 0 a 25 em unidades quaisquer segundo o Modelo aditivo (ADM). Os efeitos dos Herbicidas A e B isoladamente são previstos por curvas de dose-resposta e modelo log-logístico (pela Equação 4, $d = 100$ e $c = 0$ para ambos, $ED_{50} = 2$ para o Herbicida A, $ED_{50} = 1$ para o Herbicida B, $b = 1,0$ para o Herbicida A, $b = 1,5$ para o Herbicida B). Adaptado de Streibig, Jensen, 2000.....	90
Tabela 16. Média de Biomassa em unidade arbitrária e do Logaritmo neperiano (Ln) da biomassa para cada tratamento usado neste exemplo (dados fictícios).	101

1. INTRODUÇÃO

De todos os ingredientes ativos herbicidas registrados entre 2005 e 2019 no Brasil, 45% estavam em mistura e 93% eram misturas de dois ingredientes ativos. Para o mesmo período, de todos os ingredientes ativos novos, somente 17% eram herbicidas (MAPA, 2020).

O lançamento de produtos comerciais como misturas é justificável pela não descoberta de novos mecanismos de ação e pela reavaliação e banimento de alguns herbicidas. Além disso, há dificuldade em desenvolver novas moléculas e registrá-las devido às crescentes exigências dos órgãos reguladores, com maiores restrições toxicológicas e ecotoxicológicas.

Como fatores mais importantes para o não lançamento no mercado de novos modos de ação herbicidas, Duke (2012) cita a ocorrência de fusões entre empresas e a maior disponibilidade de genéricos. Isso fez com que os investimentos em descobrimento de novas moléculas caísse.

Além disso, empresas começaram a investir na procura por culturas tolerantes a herbicidas (CTH) e diminuíram o investimento em novas moléculas. Novas formas de negócio foram desenvolvidas para que o valor fosse capturado pela venda de sementes e não pela venda de herbicidas. As CTH também tiveram um impacto considerável na redução do preço dos herbicidas (KRAEHMER, 2012). Isso foi iniciado com o aparecimento dos cultivos tolerantes ao glifosato, que trouxe benefícios para o agricultor. Mais de 30 anos se passaram para que um mecanismo de ação verdadeiramente novo fosse introduzido (DAYAN, 2019; HACHISU, 2021), com o lançamento do tetflupyrolimet, que é um inibidor da Diidroorotato desidrogenase (DHODH)(HACHISU, 2021).

Assim, há um estímulo econômico para a indústria de herbicidas, dado o crescente surgimento de casos de resistência de plantas daninhas, com destaque para o glifosato (DUKE, 2012; GREEN, 2012; HEAP, 2020). Dessa forma, o uso dos herbicidas de forma sustentável requer cada vez mais atenção e as misturas ganham importância.

As misturas de herbicidas são usadas principalmente para aumentar o espectro de controle de plantas daninhas (1), reduzir o número e custo das aplicações (2) e prevenir ou atrasar o desenvolvimento de populações resistentes (3) (STREIBIG; JENSEN, 2000; ABENDROTH et al., 2011). O mesmo acontece, de forma geral, para o uso de misturas de inseticidas e de fungicidas.

Além dos fatores listados, há apelo no uso de misturas para a possibilidade de existirem misturas sinérgicas (sinergismo), que podem gerar redução de custos e menor uso de herbicidas, com o aumento no controle de plantas daninhas ou redução da dose aplicada, sem perda de atividade (STREIBIG; JENSEN, 2000; ABENDROTH et al., 2011).

Se o sinergismo pode ser definido, um teste para a sua ocorrência requer uma hipótese nula, ou um modelo de referência, com o qual os resultados observados devem ser comparados. O modelo de referência representa a ação conjunta que, assume-se, vai ocorrer na ausência de sinergismo ou antagonismo. Isso não apresenta grande dificuldade quando somente um componente da mistura afeta o organismo teste quando aplicado isoladamente, mas se mais do que um dos componentes é ativo, é difícil definir a hipótese nula (MORSE, 1978).

Dois modelos de referência são proeminentes no estudo da ação conjunta. Um deles é o *Additive Dose Model* (ADM) e o outro é o *Multiplicative Survival Model* (MSM). Tanto o modelo ADM quanto o MSM predizem o efeito da mistura assumindo que não há interação, baseando-se na toxicidade dos componentes isoladamente. Entretanto, eles assumem diferentes preceitos biológicos e testam diferentes hipóteses nulas (ABENDROTH et al., 2011).

É compreensível, como explicam Streibig e Jensen (2000), que MSM é o modelo de referência mais popular devido a sua simplicidade e falta de requerimento de várias doses para prever as respostas esperadas. O modelo ADM

raramente tem sido usado porque requer várias doses aplicadas isoladamente e interpolação das curvas de dose-resposta para encontrar o nível de resposta esperado.

As misturas são amplamente estudadas em farmacologia e as interações entre agentes biologicamente ativos são de grande importância em terapêutica, toxicologia, estudos ambientais e de fisiologia (BERENBAUM, 1989; GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995; CHOU, 2006). Os mesmos conceitos e embasamento teórico podem ser aplicados e beneficiar a ciência das plantas daninhas.

Um modelo de referência deve ser escolhido idealmente com base no seu significado biológico e não na facilidade ou conveniência do seu uso. Porém, o grande número de tratamentos necessários em experimentos de mistura, mesmo usando o modelo multiplicativo (MSM), inviabiliza o teste de todas as misturas ou proporções de interesse. Segundo Cedergreen et al. (2007a), a quantidade de dados necessários para essas análises é extensiva e os experimentos raramente são repetidos.

Uma abordagem para analisar interações é a construção de isobogramas. O isobograma é uma representação gráfica da mistura de dois químicos. Neles, as doses da mistura são representadas como pontos em um gráfico cujos eixos x e y são as doses dos herbicidas aplicados isoladamente, com um herbicida por eixo. Dessa forma, tem-se um isobograma específico para cada nível de resposta. Por exemplo, se a variável resposta é porcentagem de controle, é necessário um isobograma para cada nível de % de controle que se deseja estudar. O método das isoboles é bem estabelecido e amplamente utilizado em muitos campos (BERENBAUM, 1989). Esse método é geralmente utilizado com o modelo ADM como referência sendo esse o modelo mais indicado por alguns autores (CEDERGREEN et al., 2007b). No Brasil, essa metodologia ainda é pouco usada (KRUSE; VIDAL; TREZZI, 2006; PARIS JUNIOR, 2018).

Na pesquisa e desenvolvimento de herbicidas, é recorrente a necessidade de se testar várias misturas entre herbicidas ou ingredientes ativos em desenvolvimento. Há também o interesse em se testar diferentes proporções entre os herbicidas ou ingredientes ativos. Nesse contexto, limitações de tempo e de recursos reduzem o número de misturas e proporções testadas.

Com o objetivo de fazer os experimentos com misturas mais rápidos, propõe-se usar metodologias de ensaios com macrófitas do gênero *Lemna* (CEDERGREEN et al., 2007b). Assim, miniaturizam-se os experimentos, possibilitando maior controle experimental e rapidez, o que permite replicar os experimentos além de permitir estudar mais candidatos a misturas. Dessa forma, após a triagem de misturas, experimentos em casa de vegetação e, em última fase, experimentos de campo seriam executados, usando plantas terrestres alvo nas condições reais em que os herbicidas seriam utilizados.

O objetivo desse trabalho é estudar o uso de plantas macrófitas aquáticas de *Lemna* como bioindicadores no estudo de misturas de herbicidas em laboratório, visando miniaturizar ensaios e subsidiar estudos prévios e triagens para selecionar potenciais misturas a serem testadas em casa de vegetação e campo.

Como objetivos específicos, tem-se:

- Reproduzir metodologia de experimentos com plantas macrófitas *Lemna* para estudos com misturas binárias de herbicidas.
- Difundir o uso de isobogramas e uso de séries de curvas de dose-resposta como método para estudar o efeito de misturas binárias de herbicidas, segundo modelo proposto por Sørensen et al. (2007), implementado no pacote *drv* do programa R (RITZ et al., 2015).
- Testar o uso de *Lemna* como bioindicador como alternativa para proporcionar testes mais rápidos e baratos para estudo de mistura de herbicidas, usando como base misturas entre os herbicidas Roundup Original DI®

(glifosato) e Flumyazin 500[®] (flumioxazina), Curavial[®] (sulfometurom-metilico) e Classic[®] (clorimuron etílico), Proof[®] (atrazina) e Callisto[®] (mesotriona) e atrazina e mesotriona como produtos técnicos.

Referências

- ABENDROTH, J. A.; BLANKENSHIP, E. E.; MARTIN, A. R.; ROETH, F. W. Joint Action Analysis Utilizing Concentration Addition and Independent Action Models. **Weed Technology**, v. 25, n. 3, p. 436–446, 2011.
- BERENBAUM, M. C. What is synergy? **Pharmacological Reviews**, v. 41, n. 2, p. 93 LP – 141, 1989.
- CEDERGREEN, N.; KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K.; SØRENSEN, H.; STREIBIG, J. C. Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 149, 2007a.
- CEDERGREEN, N.; KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K.; STREIBIG, J. C. Combination effects of herbicides on plants and algae: do species and test systems matter? **Pest Management Science**, v. 63, p. 282–295, 2007b.
- CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621–681, 2006.
- DAYAN, F. E. Current Status and Future Prospects in Herbicide Discovery. **Plants**, v. 8, n. 9, p. 1–18, 2019.
- DUKE, S. O. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? **Pest Management Science**, v. 68, n. 4, p. 505–512, 2012.
- GRECO, W. R.; BRAVO, G.; PARSONS, J. C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. **Pharmacological reviews**, v. 47, n. 2, p. 331–85, 1995.
- GREEN, J. M. The benefits of herbicide-resistant crops. **Pest Management Science**, v. 68, n. 10, p. 1323–1331, 2012.
- HACHISU, S. Strategies for discovering resistance-breaking, safe and sustainable commercial herbicides with novel modes of action and chemotypes. **Pest Management Science**, v. 77, n. 7, p. 3042–3048, 2021.
- HEAP, I. **The International Herbicide-Resistant Weed Database**. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 29 jul. 2020.
- KRAEHMER, H. Innovation: Changing trends in herbicide discovery. **Outlooks on Pest Management**, v. 23, n. 3, p. 115–118, 2012.
- KRUSE, N. D.; VIDAL, R. A.; TREZZI, M. M. Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 579–587, 2006.
- MAPA. **Registros concedidos - 2005 - 2020**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>>. Acesso em: 28 jul. 2020.
- MORSE, P. M. Some Comments on the Assessment of Joint Action in Herbicide Mixtures. **Weed Science**, v. 26, n. 1, p. 58–71, 1978.
- PARIS JUNIOR, M. A. **Curvas de dose resposta e isobogramas como forma de descrever a associação dos inibidores da ALS (sulfometuron-methyl e chlorimuron-ethyl) em *Digitaria insularis* (L.) Fedde**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área concentração Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 2015.

SØRENSEN, H.; CEDERGREEN, N.; SKOVGAARD, I. M.; STREIBIG, J. C. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. **Environmental and Ecological Statistics**, v. 14, n. 4, p. 383–397, 2007.

STREIBIG, J. C.; JENSEN, J. E. Actions of herbicides in mixtures. In: COBB, A.; KIRKWOOD, R. C. (Ed.). **Herbicides and Their Mechanisms of Action**. [s.l.] CRC Press, 2000. p. 152–180.

2. MACRÓFITAS DO GÊNERO *LEMNA*, MODELOS DE REFERÊNCIA NO ESTUDO DE MISTURAS E ISOBOLOGRAMAS

2.1. Macrófitas do gênero *Lemna*

Macrófitas aquáticas são plantas visíveis a olho nu, tipicamente classificadas pela sua forma de crescimento (emersas, enraizadas e com folhas flutuantes, flutuantes livres e submersas, tanto enraizada como não enraizada), e por onde se desenvolvem (água parada ou corrente) (HANSON, 2013). Essas plantas desempenham diversas funções nos ecossistemas, entre elas a capacidade de absorverem o excesso de nutrientes e poluentes da água (HEGEL; MELO, 2016).

Dentro da ecotoxicologia e da avaliação de risco ecológico, as macrófitas aquáticas são um componente integral da caracterização de toxicidade não-alvo para plantas, especialmente para produtos fitofarmacêuticos nos níveis mais baixos de avaliação de risco ecológico e predominantemente por meio do organismo de teste *Lemna* spp. (HANSON, 2013). Desse modo, plantas aquáticas vasculares do gênero *Lemna* têm ganhado grande aceitação em bioensaios em ecotoxicologia (PARK; BROWN; HAN, 2015). No Brasil, essas plantas são conhecidas como “lentilhas-d’água” (POTT, 2002). Segundo Laird e Barks (2018), há muitas questões fundamentais em ecologia e evolução para as quais a lentilha-d’água seria um sistema de estudo ideal, particularmente aquelas cujo estudo requer grandes tamanhos de amostra, tempos curtos de geração e fácil manipulação experimental (LAIRD; BARKS, 2018).

As *Lemna* são plantas da família Araceae, subfamília Lemnoideae (antiga Lemnaceae Gray, incluída como subfamília das Araceae). As Lemnoideae são consideradas as menores Angiospermas (PEREIRA; POTT; TEMPONI, 2016).

A subfamília Lemnoideae é composta por ervas aquáticas, de água doce, reduzidas a um pequeno corpo talóide, chamado de fronde, com 2 a 4 mm de comprimento. Dentre essas plantas, o gênero *Lemna* é identificado quando as macrófitas possuem apenas uma raiz por fronde (POTT, 2002).

A propagação em geral é vegetativa (POTT; CERVI, 1999), raramente são encontradas com flores (PEREIRA; POTT; TEMPONI, 2016), são monocotiledôneas e possuem metabolismo C3 (MICHEL et al., 2004; PARK; BROWN; HAN, 2015; MOHEDANO; COSTA; FILHO, 2016). Além disso, de acordo com Laird e Barks (2018), o seu ciclo de vida é tipicamente da ordem de semanas.

As macrófitas aquáticas como as lentilhas-d’água absorvem, transformam e sequestram contaminantes orgânicos e podem, portanto, ser utilizadas em fitorremediação para a remoção de poluentes de águas residuárias. Além disso, podem eliminar contaminantes orgânicos de maneira eficiente e podem, em última instância, servir como agentes fitorremediadores no ambiente natural (DOSNON-OLETTE et al., 2010).

Além da eficiência dessas plantas na remoção de nutrientes das águas residuais, a lentilha-d’água tem chamado cada vez mais a atenção para a produção de bioetanol devido a sua alta produção de biomassa e amido. Recentemente, vários estudos têm avaliado técnicas para promover o acúmulo de amido na biomassa da lentilha-d’água e, assim, melhorar o rendimento do etanol (MOHEDANO; COSTA; FILHO, 2016).

Assim, essas plantas são usadas como bioindicadores na contaminação de água, no biomonitoramento de efluentes municipais, agrícolas e industriais (RADIC et al., 2011; SANTAROSSA, 2017). Também são usadas como modelo para estudo do modo de ação ou toxicidade de químicos (MICHEL et al., 2004; GORZERINO et al., 2009; OKAMURA et al., 2012; AGATHOKLEOUS et al., 2016). Ainda, alguns trabalhos evidenciaram a sua utilização na alimentação de aves (ZAKARIA; SHAMMOUT, 2018) e de peixes (GRAEFF et al., 2007).

Embora a lentilha-d'água possa florescer, a grande maioria de sua reprodução é assexuada, por meio de bolsos meristemáticos dos quais as filhas clonais brotam e se desprendem sucessivamente (LAIRD; BARKS, 2018).

As espécies de *Lemna* são plantas de flutuação livre que crescem muito rápido e, dada a sua propagação assexuada, fornecem material geneticamente homogêneo. Por serem plantas muito pequenas que podem ser cultivadas em solução nutritiva, são excelentes candidatas para a avaliação de fitotoxicidade em bioensaios miniaturizados (MICHEL et al., 2004). Em estudos que se dispõe de pouco material de teste, o seu tamanho pequeno as torna plantas bioindicadoras ideais, por exemplo, para estudos de isolamento e identificação de compostos fitotóxicos, processo mais provável para descobrir compostos novos altamente bioativos (QUEIROZ et al., 2012).

Com relação à coleta de dados, as abordagens baseadas na visão computacional tendem a se tornar cada vez mais viáveis para rastrear e quantificar a lentilha-d'água (LAIRD; BARKS, 2018). O seu crescimento bidimensional em superfícies aquáticas permite o uso de sistemas de análise de imagens para quantificar seu crescimento ao longo do tempo de maneira não destrutiva. A análise de imagem permite a determinação muito precisa do crescimento das mesmas plantas ao longo do tempo, resultando em uma cinética precisa de resposta à dose (MICHEL et al., 2004). Segundo OECD (2002), durante os testes, a área total de frondes é preferível como variável resposta, além da contagem de frondes, seguidas por massa seca e massa fresca.

Em estudo com o objetivo de investigar a relação entre o peso e a área de superfície coberta pela lentilha-d'água (*Lemna minor*) via técnica de análise de imagens, Bekcan; Atar e Beyaz (2009) encontraram uma correlação linear entre esses valores ($R^2 = 0,972$) indicando que a técnica de análise de imagens tem um papel cada vez mais significativo a desempenhar no futuro.

As *Lemna* podem potencialmente fazer trocas com o meio aquoso pelas raízes e folhas (frondes), como demonstrado por Cedergreen e Madsen (2002) em estudo com *L. minor*, que pôde adquirir uma quantidade significativa de nitrogênio (N) inorgânico através da raiz e da folhagem. A *Lemna* se aclimatou morfológica e fisiologicamente à disponibilidade de N do meio de crescimento. No nível morfológico, uma maior razão raiz/biomassa da parte aérea foi observada para plantas cultivadas em baixo N. A vantagem desse ajuste para uma macrófita de flutuação livre, onde raiz e folhagem estão expostas ao mesmo meio, parece ser o menor investimento em biomassa por unidade de área de superfície para a raiz do que para as folhas.

Embora confiar em um pequeno número de sistemas modelo seja uma questão de debate, há poucas dúvidas de que trabalhar com espécies de plantas facilmente estudadas e bem compreendidas valeu a pena em muitas disciplinas. Generalizar os resultados com base em lentilhas-d'água para outros táxons de plantas deve ser feito com cautela, pois algumas das características que tornam as lentilhas-d'água fáceis de estudar (por exemplo, seu tamanho e simplicidade anatômica) também as tornam um tanto incomuns. Essas críticas potenciais devem ser levadas a sério ao tentar extrapolar os resultados. No entanto, não são um obstáculo ao uso de lentilha-d'água (LAIRD; BARKS, 2018).

2.1.1. Identificação da espécie de *Lemna*

As plantas utilizadas nos experimentos foram em média 1,7 a 1,9 vezes mais longas do que largas e possuíam em média $2,5 \pm 0,15$ mm de comprimento e $1,5 \pm 0,13$ mm de largura. Quando em crescimento à plena luz, possuíam raízes de 5,5 a 8,9 mm e coifas de 0,7 a 1,1 mm.

Dado que possuem uma raiz por fronde, as plantas são do gênero *Lemna*. Além disso, dada a presença de papilas observadas em material vivo, o comprimento e simetria das frondes e a nervura inconspícua, as macrófitas

podem ser identificadas como *Lemna minuta* ou *Lemna valdiviana* (POTT, 2002; IBERITE et al., 2011; PEREIRA; POTT; TEMPONI, 2016; LOURENÇO; BOVE, 2019) (Figura 1).



Figura 1. À esquerda, planta de *Lemna*. À direita, ocorrência de papilas (setas vermelhas) em material vegetal vivo de *Lemna*.

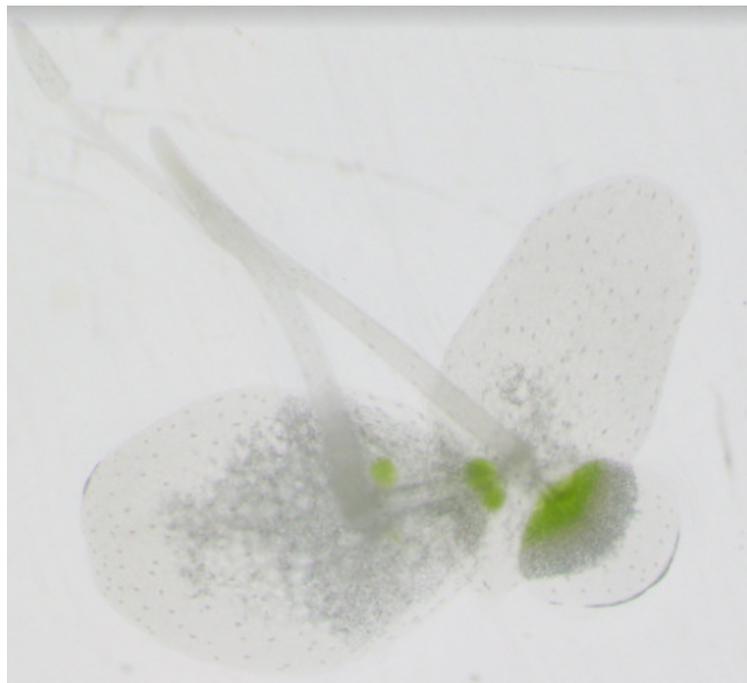


Figura 2. Planta de *Lemna* clarificada com hipoclorito de sódio para observação da presença e tamanho da nervura nas frondes.

Para possibilitar a observação das nervuras das frondes, usa-se hipoclorito de sódio a 4% para fazer a clarificação das frondes (POTT; CERVI, 1999). Porém, não foram observadas nervuras (Figura 2). Muitas vezes, na prática, a *L. minuta* quase não apresenta essa nervura, que é visível na espécie *L. valdiviana* V. J. Pott (comunicação pessoal, 08 de fevereiro de 2021). Sendo assim, a espécie foi identificada como *Lemna minuta*.

2.1.2. Manutenção das *Lemna*

A criação e manutenção da população das *Lemma* seguiu o proposto por Park, Brown, Han (2015) e ISO (2005), com o meio de cultura Steinberg modificado seguindo a metodologia ISO (2005) e OECD (2002), em condições não axênicas.

A manutenção das macrófitas foi feita em recipientes de polipropileno com cobertura de papel alumínio, mantidos em câmaras de crescimento Conviron® com fotoperíodo de 12h, luminosidade de 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luz ao nível da borda superior dos recipientes com a barreira de papel alumínio onde estão as plantas (Figura 3), luz branca fluorescente CW MASTER TL5 HO 54W/840, 24 °C de temperatura média e troca de meio realizada uma vez por semana.

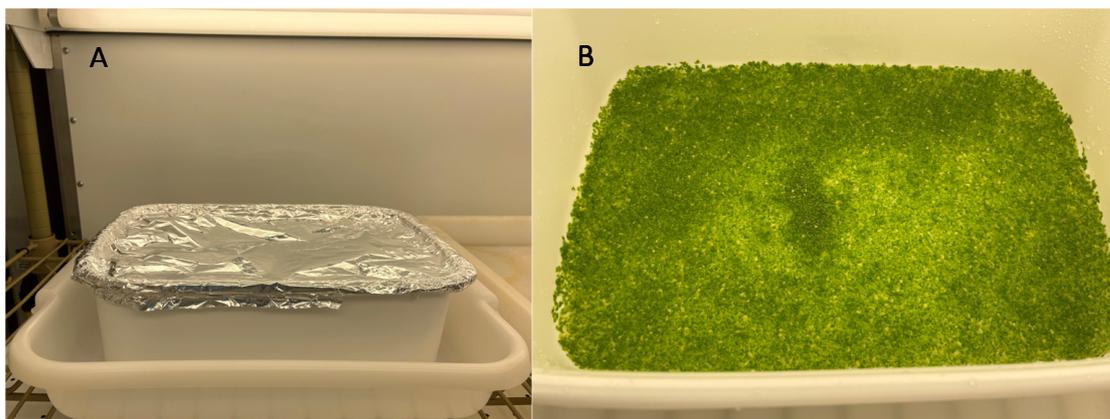


Figura 3. Ambiente de manutenção da cultura de *Lemma* – Conviron® (A) e a cultura de *Lemma* em recipiente de polipropileno (B).

Três dias antes da realização dos experimentos, é feita uma troca de meio e as plantas são levadas para aclimação em condições de luz e temperatura onde serão realizados os experimentos, para que entrem em máximo crescimento. A partir dessas plantas, é feita a seleção das plantas para os experimentos.

O meio de crescimento utilizado foi o Meio Steinberg modificado (Tabela 1) (ISO, 2005; PARK; BROWN; HAN, 2015). As soluções-estoque são preparadas com água destilada, são autoclavadas a 121 °C por 20 minutos e mantidas em geladeira em frasco âmbar.

Para preparar a concentração final do meio Steinberg modificado, deve-se adicionar 20 mL das soluções-estoque I, II e III a 900 mL de água destilada. Depois adicionar 1 mL das soluções IV e V e completar com água até 1 L (ISO, 2005). Depois é feita a medição do pH do meio e ajuste se necessário para $6,8 \pm 0,1$ com 0,1 M de HCl ou NaOH.

Tabela 1. Meio Steinberg modificado utilizado na manutenção e experimentos com *Lemma*. Adaptado de ISO (2005)

Solução-estoque	Macro e microelementos	Concentração da	
		solução Estoque (g/L)	Concentração Final (mL/L)
I	KNO ₃	17,5	20
	KH ₂ PO ₄	4,5	
	K ₂ HPO ₄	0,63	
II	MgSO ₄ .7H ₂ O	5	20
III	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	14,75	20
IV	H ₃ BO ₃	0,12	1
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,18	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,044	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18	
V	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,76	1
	EDTA dissódico dihidratado	1,5	

2.2. Modelos de referência no estudo de misturas e isobogramas

O interesse em estudar efeitos de sinergia ou antagonismo de misturas cresceu imensamente a partir dos anos 90 na farmacologia e na toxicologia (RITZ; STREIBIG, 2014).

Para se quantificar a ação de dois químicos aplicados ao mesmo tempo em um dado alvo é necessário que se tenha um modelo de referência para comparação, ou seja, deve-se ter uma forma de saber qual a resposta esperada com a aplicação dos dois herbicidas ao mesmo tempo.

Dado que o sinergismo (ou antagonismo) são comumente definidos como o maior (ou menor) efeito de uma combinação de dois químicos do que seria predito pela “não interação” a partir do conhecimento de cada um dos químicos individualmente, sua definição criticamente depende do modelo de referência para a “não interação” (GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995).

Desse modo, definir um efeito de referência adequado quantitativamente é crítico se o objetivo é reivindicar efeitos sinérgicos ou antagônicos. Já em relação à análise, um modelo estatístico em que se supõe que o efeito de referência é válido é às vezes chamado de modelo nulo (RITZ; STREIBIG; KNISS, 2021).

Na toxicologia, ecotoxicologia e na ciência das plantas daninhas, existem dois modelos de referência que são comumente utilizados e que são aceitos biologicamente. O primeiro é chamado modelo multiplicativo (MSM, do inglês “*Multiplicative Survival Model*” ou IA, do inglês “*Independent Action*” ou modelo de Bliss), mais conhecido como método de Colby (COLBY, 1967) na área de ciência das plantas daninhas. O segundo é o modelo aditivo (ADM, do inglês “*Additive Dose Model*” ou CA, do inglês “*Concentration Addition*”, também chamado de “*Dose Addition*” ou modelo de Loewe), que não trata de aditividade de efeitos, mas de aditividade de doses (MORSE, 1978; STREIBIG; JENSEN, 2000; ABENDROTH et al., 2011).

Aqui será empregada a nomenclatura de “Modelo Multiplicativo” (MSM) para o modelo de Bliss ou modelo de Colby e “Modelo Aditivo” (ADM) para o modelo de Loewe.

Tanto o Modelo Aditivo quanto o Modelo Multiplicativo devem ser vistos como aproximações úteis para definir a resposta prevista na ausência de interações entre pesticidas. Uma divergência substancial de qualquer um

desses efeitos de referência é evidência de sinergismo ou antagonismo. Portanto, na forma mais simples, o objetivo de um experimento de mistura é determinar se a resposta observada para uma mistura de herbicidas difere significativamente do efeito de referência definido assumindo a adição de dose (ADM) ou a ação independente (MSM) (RITZ; STREIBIG; KNISS, 2021).

Esses modelos foram difundidos a partir de estudos pioneiros em toxicologia e farmacologia por Bliss (BLISS, 1939) e Loewe (LOEWE, 1953).

Bliss estudou o efeito de inseticidas aplicados em conjunto e a relação entre a dose aplicada e a porcentagem do resultado (insetos mortos) e foi um dos primeiros trabalhos a apresentar o conceito de Ação Independente entre produtos, ou independência probabilística (GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995; DEMIDENKO; MILLER, 2019) (Apêndice A). Bliss explica que, supostamente, dois componentes atuam independentemente um do outro se cada um envolve uma cadeia característica e distinta de reações no organismo, de modo que a mortalidade do alvo ocorre pela falha de um sistema vital diferente por componente.

Segundo Colby (1967), a resposta esperada (E) de uma dada combinação entre dois herbicidas A e B nas doses d_A e d_B pode ser calculada por

$$E = C_A + C_B - \frac{C_A C_B}{100} \quad (1)$$

onde C_A é a porcentagem de inibição de crescimento causada pelo herbicida A na dose d_A (ou porcentagem de controle do herbicida A na dose d_A), C_B é a porcentagem de inibição de crescimento causada pelo herbicida B na dose d_B (ou porcentagem de controle do herbicida B na dose d_B).

Por essa definição, para variáveis resposta que aumentam com o aumento das doses, quando o valor observado de uma mistura for maior que o valor esperado E , ocorre sinergismo e quando o valor observado de uma mistura for menor do que o valor esperado E , ocorre antagonismo.

A Equação 1 é a mesma fórmula de Bliss (1939) ($pC = pA + pB - pA \cdot pB$) para valores no intervalo 0 a 1 (valores de “proporção de mortes”), sendo que pC é a proporção de mortes pela combinação quando pA e pB são proporções de mortalidade para as mesmas doses de A e B aplicadas isoladamente. Ou seja, se os dados de porcentagem de inibição ou porcentagem de controle no intervalo 0 a 100 forem transformados para o intervalo 0 a 1, o valor esperado E da combinação é dado pela fórmula de Bliss.

Se os dados utilizados são relacionados à testemunha, por exemplo, crescimento ou massa seca em relação à testemunha ou porcentagem de sobrevivência, temos

$$E_1 = \frac{R_{A1} R_{B1}}{100} \quad (2)$$

onde E_1 é a resposta esperada de uma dada combinação entre dois herbicidas A e B nas doses d_A e d_B e R_{A1} é a porcentagem de crescimento em relação à testemunha causada pelo herbicida A na dose d_A e R_{B1} é a porcentagem de crescimento em relação à testemunha causada pelo herbicida B na dose d_B . A Eq. 2 também é chamada de forma geral para o efeito de independência de Bliss (GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995).

Já o modelo de Loewe, ou modelo de aditividade de Loewe, é baseado na ideia de que, por definição, um agente não pode interagir com ele mesmo e que duas doses de diferentes compostos que resultam no mesmo efeito são equivalentes. Em outras palavras, em um experimento hipotético em que um agente é misturado com ele mesmo,

o resultado vai ser a aditividade de Loewe (GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995). Nesse caso, não deveria importar se um componente é substituído pelo outro ou vice versa (LEDERER; DIJKSTRA; HESKES, 2018).

Loewe argumentou que, se duas doses (dose A do composto 1 e dose B do composto 2) resultam na mesma resposta, diga-se Y, ou seja, são os valores ED_x (Dose Efetiva, do inglês “*Effective Dose*”) para cada um dos compostos aplicados separadamente (ED_{xA} , ED_{xB}), então, no caso de não interação entre os compostos, todas as combinações de doses (dose a do composto 1 e dose b do composto 2) que ocorrem em uma linha $(A,0)$ até $(0,B)$, ou seja, para a qual $a/A + b/B = 1$, deve resultar na mesma resposta Y. Intuitivamente e visualmente, essa ideia é muito atrativa (LEDERER; DIJKSTRA; HESKES, 2018). No Apêndice B comprova-se essa definição do modelo de Loewe ou modelo aditivo usando trigonometria.

Assim, para cada nível de resposta de interesse (Y, ou ED_x), o modelo ADM pode ser expresso matematicamente por (GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995; STREIBIG; JENSEN, 2000)

$$\frac{d_A}{D_A} + \frac{d_B}{D_B} = 1 \quad (3)$$

onde D_A e D_B são as doses dos dois herbicidas aplicados separadamente para se atingir o mesmo nível de resposta de interesse (Y) e d_A e d_B são as doses dos herbicidas aplicados em uma mistura $d_m = (d_A + d_B)$ que atinge o mesmo nível de resposta de interesse (Y). A potência relativa r entre os herbicidas A e B é definida por $r = D_A/D_B$, então $d_A = D_A - r d_B$.

Se a Equação 3 for verdadeira, o efeito é aditivo. Quando os agentes em combinação são mais efetivos do que o esperado (sinergismo) então $d_A/D_A + d_B/D_B < 1$, quando os agentes em combinação são menos efetivos do que o esperado (antagonismo), d_A e/ou d_B precisam aumentar para produzir o efeito esperado, então $d_A/D_A + d_B/D_B > 1$ (BERENBAUM, 1989).

Essas equações implicam que com o ADM os herbicidas em quaisquer misturas podem ser substituídos uns pelos outros com base em sua potência relativa sem alterar o efeito conjunto (STREIBIG; JENSEN, 2000) e a interpretação de uma avaliação segundo o modelo ADM é livre de restrições quanto ao mecanismo de ação (GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995).

Embora seja direto avaliar doses equivalentes biologicamente usando o ADM e pelo desenho de isobogramas (Apêndice B, Equação 3), é mais complicado calcular o efeito esperado de misturas seguindo esse modelo. Calcular a resposta esperada (valor esperado ou valor de referência) de uma mistura seguindo o modelo ADM é equivalente a encontrar o isobograma ADM ED_x no qual a mistura está localizada (STREIBIG; JENSEN, 2000). No Apêndice C demonstra-se como chegar nessa fórmula. No Apêndice D demonstra-se como fazer esse cálculo usando o software R (R CORE TEAM, 2020) seguindo exemplo de Streibig e Jensen (2000).

Para calcular a resposta esperada de uma mistura seguindo o modelo ADM, é necessário ter conhecimento da relação entre os dois herbicidas em ação isoladamente para a variável resposta de interesse. Ou seja, é necessário ter validada a relação de dose-resposta entre os dois herbicidas (ABENDROTH et al., 2011; RITZ; STREIBIG, 2014).

Um dos modelos sigmóides de dose-resposta amplamente utilizado e aceito como boa representação biológica de resposta em função do aumento de dose é o modelo log-logístico de quatro parâmetros que é dado por

$$y = c + \frac{d-c}{1 + \left(\frac{x}{e}\right)^b} \quad (4)$$

ou

$$y = c + \frac{d-c}{1+\exp(b(\log(x)-\log(e)))} \quad (5)$$

em que y é a resposta, d é o limite superior da curva, c é o limite inferior da curva, e é a dose x necessária para se obter a metade da resposta entre o máximo d e o mínimo c . O coeficiente b é a declividade, inclinação ou *slope* da curva ao redor de e . A função logística é simétrica ao redor de e (RITZ; STREIBIG, 2005; RITZ et al., 2015; KESHTKAR; KUDSK; MESGARAN, 2021).

Para valores de $b < 0$, a resposta y é crescente com o aumento da dose x . Para valores de $b > 0$, a resposta y é decrescente com o aumento da dose x .

Para testar o ajuste das curvas pode ser feito um teste para falta de ajuste. Uma análise de variância simples não coloca restrições em como a resposta muda em função de diferentes concentrações, pois vai existir um parâmetro para cada concentração (dose). Consequentemente é um modelo mais geral do que o modelo de regressão não linear (Equação 4) ou, em outras palavras, o modelo de regressão não linear é um submodelo da análise de variância. Isso significa que podemos comparar a análise de variância e o modelo de regressão não linear usando um teste estatístico, testando a hipótese nula de que o modelo da análise de variância pode ser simplificado para o modelo de regressão não linear. Esse teste é chamado de teste para falta de ajuste (RITZ; STREIBIG, 2008). No programa R esse teste é feito pela função *modelFit* (RITZ; STREIBIG, 2012; RITZ et al., 2015). No Apêndice E faz-se a prova do resultado da função *modelFit* no R.

Nas Equações 4 e 5, o parâmetro e é geralmente interpretado como sendo a dose que causa 50% de redução na variável resposta em relação à testemunha (controle), sendo chamado de ED50. Na equação do modelo logístico de quatro parâmetros o valor de e ou ED50 vai ser igual à 50% de resposta em relação à testemunha somente quando a metade entre o máximo d e o mínimo c for 50%, ou seja, quando $(d + c)/2 = 50\%$ da resposta. Se duas curvas de interesse têm diferentes valores para o máximo d , mínimo c ou ambos os valores, então não é possível fazer uma comparação direta entre os valores de ED50. Assim, é necessário comparar as duas curvas por um valor fixo de resposta. Então precisamos calcular os níveis de Dose Efetiva baseado em uma redução absoluta medida em relação ao controle (KESHTKAR; KUDSK; MESGARAN, 2021). Para isso é necessário resolver a Equação 4 para a dose x , resultando na Equação 6.

$$x = e \left(\frac{d-c}{y-c} - 1 \right)^{\frac{1}{b}} \quad (6)$$

Apesar do Modelo Multiplicativo ser mais utilizado, um argumento contra o seu uso geral é que, em um experimento hipotético de um herbicida misturado com ele mesmo, pode-se concluir que esse herbicida é sinérgico pelo modelo multiplicativo (GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995; STREIBIG; JENSEN, 2000). Supõe-se que um herbicida A tem sua relação de dose-resposta descrita pela Equação 4 (com $c = 0$, $d = 100$, $b = -2$ e $e = 5$) para um determinado alvo. Esse herbicida na dose $d_A = 5$ resulta em 50% de controle. Já na dose $d_{A1} = 10$ (ou seja, $d_{A1} = 2d_A$), dada a natureza sigmoideal e não linear da resposta à dose, há 80% de controle. Para uma mistura de d_A com d_{A1} , pela Equação 1, o valor esperado da mistura é 75%. O resultado observado para a dose $2d_A = d_{A1} = 10$ é 80% (Figura 4, A), que é maior do que 75%, o que poderia levar à conclusão de que há sinergismo, porém 80% nada mais é do que o

resultado esperado para a dose $d_{A1} = 10$ desse herbicida (Figura 4, A). Para a mesma situação, pelo modelo ADM, a resposta esperada para essa “mistura” é 80%. Para essa situação, maiores inclinações (Figura 4, B) podem resultar em maiores diferenças entre os valores esperados pelo modelo MSM e ADM (Figura 4).

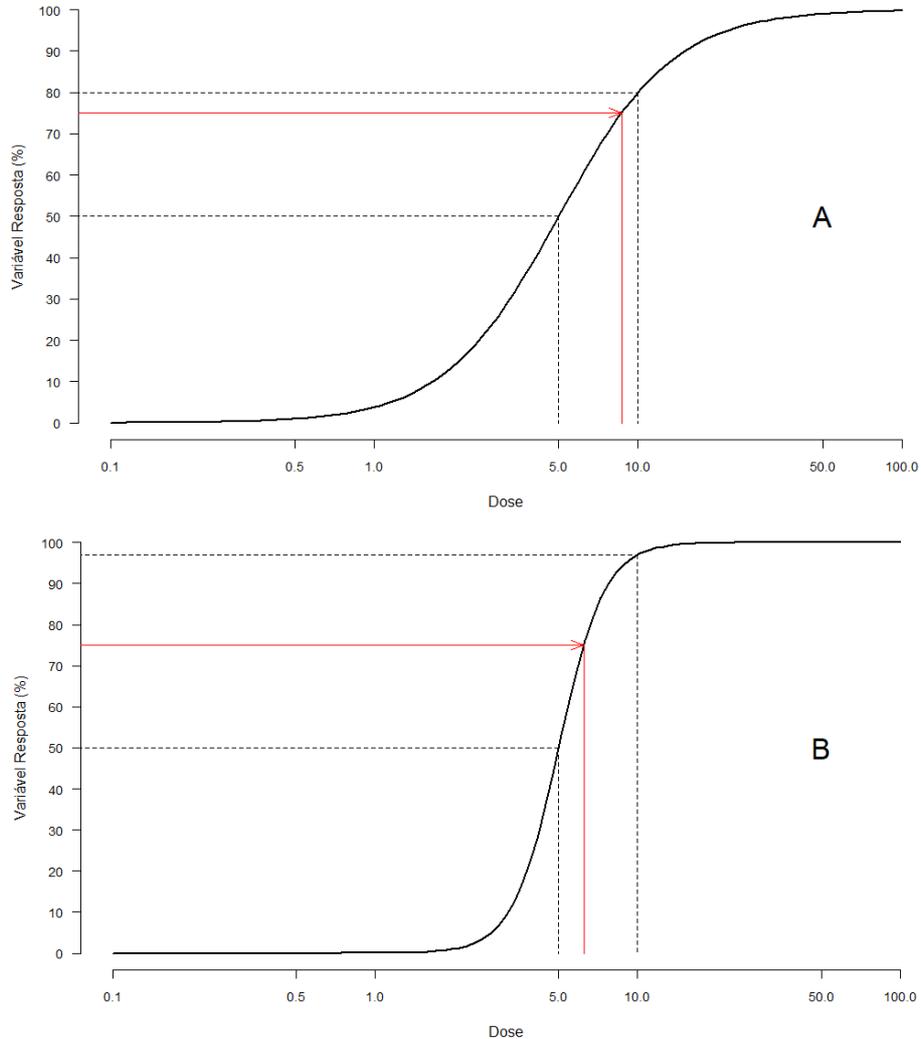


Figura 4. Curvas de dose-resposta dadas pela Equação 4, sendo a A com o mínimo (c) em 0, máximo (d) em 100, ponto de inflexão (e) igual a 5, e inclinação (b) igual a -2 e B com o mínimo (c) em 0, máximo (d) em 100, ponto de inflexão (e) igual a 5, e inclinação (b) igual a -5. A dose 5 corresponde ao ED50 para ambas as curvas. Em uma mistura hipotética de um herbicida com ele mesmo, a seta vermelha indica o valor de 75% como valor esperado pelo MSM para a variável resposta em uma mistura de 2 vezes a dose 5. Em A, curva com a menor inclinação, o valor esperado pelo MSM (75%) é próximo ao valor esperado pelo ADM (80%). Em B, curva com a maior inclinação, a diferença aumenta entre o valor esperado pelo MSM (75%) e pelo ADM (96,96%). Em ambos os casos, porém, o valor esperado pelo MSM é menor do que o valor real, o que poderia indicar sinergismo erroneamente, pois a resposta encontrada seria maior do que a esperada.

A inclinação da curva indica a relação que o aumento de dose tem com o aumento ou diminuição da resposta. Curvas mais inclinadas indicam que uma pequena mudança na dose é suficiente para gerar grande mudança na resposta.

Diferenças na inclinação refletem os diferentes produtos e a forma como eles afetam as plantas (MICHEL et al., 2004). As diferenças serão mais independentes das doses quanto maior for a inclinação das curvas. Por outro lado, quanto menos inclinada a curva, a regressão indica que as plantas estão respondendo menos aos crescimentos de dose (GARCIA, 2012).

Outro argumento contra o uso do modelo MSM é que organismos complexos em geral têm muita interação entre todos os seus sistemas alvo, tipos de receptor e vias enzimáticas com feedbacks positivos e negativos em todos os níveis da organização biológica (GRECO; BRAVO; PARSONS, 1995), questionando-se a premissa de não interação. Isso é reforçado por Ritz e Streibig, (2014), citando que no metabolismo de um organismo praticamente todos os locais de ação são afetados por uma série de vias metabólicas. Já a definição geral e fundamental de aditividade (ADM) não requer que os químicos na mistura tenham o mesmo mecanismo de ação (GENNINGS et al., 2005). Idealmente, o ADM não depende da relação funcional entre dois químicos, desde que estejamos lidando com curvas ou superfícies de resposta monotonicamente crescentes ou decrescentes (RITZ; STREIBIG, 2014).

Além disso, o uso teórico de MSM e ADM baseado no conhecimento a priori do mecanismo de ação químico foi questionado por Cedergreen et al. (2008), com o argumento de que os efeitos de toxicidade da mistura no nível do organismo são complicados demais para serem previstos apenas pelo conhecimento do mecanismo de ação. Mecanismos de ação secundários, cinética de absorção, transporte, metabolismo, compartimentação e excreção dos produtos químicos estão entre os processos que não são considerados pelos modelos, mas que têm impactos potencialmente grandes nos efeitos conjuntos.

A análise estatística para determinar se as diferenças entre os dados e as estimativas de Colby são devidas a uma interação ou ao erro experimental é outro problema citado com o procedimento de Colby (MORSE, 1978). Em seu próprio artigo, Colby (1967) indica uma análise estatística com o uso do teste do Qui-quadrado para determinar o efeito da mistura se os valores observados e esperados forem considerados por repetição. Porém, essa abordagem não tem sido utilizada. Os autores Flint, Cornelius e Barret (1988) propuseram um método para testar as interações segundo MSM com base no modelo de análise de variância para um experimento fatorial 2 x 2. Para análises considerando vários experimentos, o método proposto por Flint, Cornelius e Barret (1988) pode ser utilizado com modelos mistos.

Por outro lado, em comparação ao ADM, experimentos de misturas que possuem o MSM como referência têm a vantagem de necessitar menor esforço experimental (menos tratamentos). Vale ressaltar que, dependendo da quantidade de misturas de interesse, experimentos fatoriais já são considerados custosos e trabalhosos (COKOL-CAKMAK et al., 2018).

De acordo com Streibig e Jensen (2000), o modelo aditivo é o que provavelmente faz mais sentido pois dá uma explicação simples da substituição de dois herbicidas em uma mistura (STREIBIG; JENSEN, 2000). Já Goldoni e Johansson (2007) concluíram que o modelo ADM é ligeiramente preferível devido a uma maior plausibilidade biológica.

Segundo Ritz, Streibig e Kniss (2021), os delineamentos fatoriais usados para os experimentos que possuem MSM como referência são muito dependentes das doses escolhidas. Assim, experimentos com misturas em proporções fixas (que permitem a construção de isobogramas) devem ser preferidos, apesar de demandarem maior esforço experimental, pois permitem a validação da relação dose-resposta assumida e, conseqüentemente, fornecem afirmações mais fortes sobre efeitos antagônicos e sinérgicos em comparação com experimentos fatoriais.

Para misturas de dois herbicidas, as isoboles são representações em duas dimensões da superfície-resposta em três dimensões de todas as misturas em diferentes proporções dos dois herbicidas que resultam no mesmo efeito (mesmos EDs). Isobogramas são a representação gráfica de isoboles (HEWLETT, 1969)(Figura 5).

Se as curvas para cada herbicida aplicado separadamente são paralelas, as isoboles para diferentes níveis de resposta serão paralelas independentemente do nível de resposta considerado (ED20, ED50 ou ED90, por exemplo). Se essas curvas não são paralelas, as isoboles também não serão paralelas (Figura 5) (STREIBIG; JENSEN, 2000). Nesse caso, para cada valor de ED de interesse, diferentes modelos precisam ser ajustados (RITZ; STREIBIG, 2014).

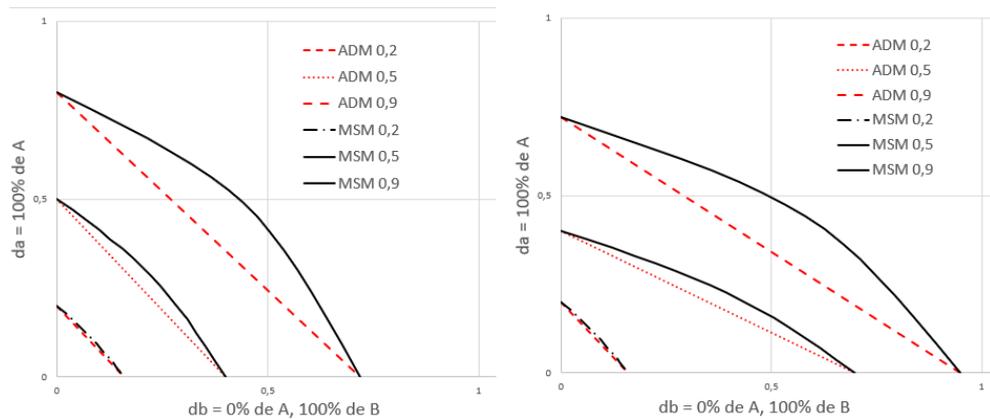


Figura 5. Isobologramas representando misturas de dois herbicidas cujas curvas de dose-resposta são paralelas (esquerda) e não paralelas (direita). Isoboles são apresentadas para os níveis de 0,2; 0,5 e 0,9 de uma dada variável resposta segundo o modelo aditivo (ADM, linhas vermelhas) e modelo multiplicativo (MSM, linhas pretas). Para as curvas paralelas, a potência relativa r não varia com os níveis da variável resposta. No exemplo, $r = 1,25$ ($da/db = 0,2/0,16$ para a isobole de 0,2; $da/db = 0,5/0,4$ para a isobole de 0,5 e $da/db = 0,9/0,72$ para a isobole de 0,9). Para as curvas não paralelas, a potência relativa r varia de acordo com o nível da variável resposta da isobole ($da/db = 0,2/0,2 = 1$ para a isobole de 0,2; $da/db = 0,4/0,7 = 0,57$ para a isobole de 0,5 e $da/db = 0,72/0,95 = 0,76$ para a isobole de 0,9). Adaptado de Streibig e Jensen (2000).

Para traçar isoboles, a relação dose-resposta de cada herbicida sozinho é utilizada para determinar as diferentes proporções que, espera-se, forneçam o mesmo efeito (TALLARIDA, 2011). Para quaisquer misturas, se a potência relativa entre os herbicidas não é conhecida, não é possível saber onde o ponto da mistura vai se encontrar na isobole (BARBIERI et al., 2022).

Na análise das curvas de dose-resposta, se as doses forem escolhidas próximas ao limite máximo e mínimo dessas curvas, as diferenças entre os tratamentos serão menores do que se forem escolhidas na parte central, onde as diferenças são mais independentes dos níveis de dose (GARCIA, 2012). Assim, o nível mais usado de efeito ou resposta esperada é o ED50. As curvas de dose-resposta têm menor desvio da linearidade ao nível do ED50 (COLBY, 1967) e esse é o nível de resposta que pode ser avaliado com mais precisão (CEDERGREEN; STREIBIG, 2005).

Segundo Sørensen et al. (2007), é vital para a conclusão de experimentos de mistura de produtos químicos ser capaz de testar se um desvio do modelo de referência ADM (ou desvio da linha teórica de aditividade estabelecida entre os resultados da aplicação dos dois produtos químicos isoladamente) reflete um desvio real ou se o desvio ocorreu simplesmente devido à variação ao acaso.

Esses autores propuseram um modelo estatístico levando em conta todos os dados produzidos em um mesmo experimento com diferentes misturas binárias em proporções fixas considerando também a estrutura ilustrativa do isobolograma, permitindo que os pontos no isobolograma sejam comparados com a linha teórica do ADM e com desvios simétricos (HEWLETT, 1969) ou assimétricos (VØLUND, 1992). Os modelos de Hewlett e de Vølund são também chamados de modelos de superfície de resposta. Nessa abordagem, mesmo para a hipótese de ADM (linha reta de aditividade), a isobole é estimada usando todos os dados, não somente os dois herbicidas aplicados isoladamente.

Dessa forma, pode-se indicar que os dados seguem o ADM ou que há sinergismo ou antagonismo levando em conta a variabilidade dos dados. Na proposta de Sørensen et al. (2007), cada proporção de mistura tem sua própria dose-resposta, e os ED50 de todas as proporções de mistura são consideradas em um modelo comum.

O modelo simétrico de Hewlett (1969) é dado por

$$\left(\frac{d_A}{D_A}\right)^{\frac{1}{\lambda}} + \left(\frac{d_B}{D_B}\right)^{\frac{1}{\lambda}} = 1 \quad (7)$$

onde, para um dado nível de resposta igual para os dois herbicidas, D_A e D_B são as doses dos dois herbicidas aplicados separadamente para se atingir esse nível de resposta e d_A e d_B são as doses dos herbicidas aplicados em uma mistura $d_m = (d_A + d_B)$ que atinge o mesmo nível de resposta e λ é um parâmetro de interação. Se λ é igual a 1, então a Equação 7 se reduz à equação 3. Para outros valores positivos, λ mede o grau de desvio do ADM. Valores menores do que 1 correspondem à antagonismo e valores maiores do que 1 correspondem à sinergismo. O parâmetro λ pode ser usado para calcular a potência da mistura 50:50 em relação ao ADM, considerando que para se obter 50% de efeito de acordo com a Equação 7 precisa-se de $2^{1-\lambda}$ vezes a dose necessária de acordo com ADM (SØRENSEN et al., 2007).

O modelo assimétrico de Vølund (1992) é dado por

$$\left(\frac{d_A}{D_A}\right)^{\eta_1} \left(\frac{d_A}{D_A} + \frac{d_B}{D_B}\right)^{1-\eta_1} + \left(\frac{d_A}{D_A}\right)^{\eta_2} \left(\frac{d_A}{D_A} + \frac{d_B}{D_B}\right)^{1-\eta_2} = 1 \quad (8)$$

onde, para um dado nível de resposta igual para os dois herbicidas, D_A e D_B são as doses dos dois herbicidas aplicados separadamente para se atingir esse nível de resposta e d_A e d_B são as doses dos herbicidas aplicados em uma mistura $d_m = (d_A + d_B)$ que atinge o mesmo nível de resposta e η_1 e η_2 são parâmetros que determinam o formato da isobole. Do mesmo modo que com o parâmetro λ , os parâmetros η_1 e η_2 podem ser usados para calcular a potência da mistura 50:50 em relação ao ADM. Nesse caso, para se obter 50% de efeito de acordo com a Equação 8 precisa-se de $1/(2^{-\eta_1} + 2^{-\eta_2})$ vezes a dose necessária de acordo com ADM (SØRENSEN et al., 2007).

Segundo o proposto por Sørensen et al. (2007), uma vez ajustadas as curvas de dose-resposta para as diferentes misturas, a isobole para o nível ED50 é gerada e o modelo é reajustado sob a restrição de que as combinações de doses satisfazem a relação da Equação 7. O modelo da isobole é então testado contra o modelo ajustado com as curvas de dose-resposta com um teste F baseado na soma de quadrados dos resíduos dos dois modelos. Se o modelo da isobole for razoável, é feito um novo teste F para ADM, considerando a hipótese de que $\lambda = 1$ na Equação 7, o que corresponderia a uma linha reta cortando os eixos X e Y do isobolograma, levando em conta todos os pontos das misturas. O mesmo teste é feito considerando os valores $\eta_1 = 1$ e $\eta_2 = 1$ na Equação 8. Dessa forma, se há efeito aditivo (ADM válido), todas as misturas contêm informação sobre os ED50 dos herbicidas isolados. Se o ADM for rejeitado, então a comparação dos ED50 das misturas e a linha reta baseada nas estimativas dos herbicidas isolados indicam se há antagonismo ou sinergismo nas misturas.

É importante frisar que os modelos de Hewlett (1969) e Vølund (1992) são baseados no modelo log-logístico de quatro parâmetros com assíntotas inferiores e superiores comuns para todos os compostos, possivelmente variando inclinações e diferem em como os parâmetros ED50 são modelados (RITZ; STREIBIG, 2014). Obviamente, o modelo log-logístico de três parâmetros, por ser uma redução do modelo log-logístico de quatro parâmetros, também pode ser usado.

Desse modo, é um pré-requisito importante que as curvas de dose-resposta tenham um grupo de controle compartilhado (para a dose 0). Essa suposição geralmente é assegurada por meio do planejamento experimental e implica uma padronização indireta relativa ao controle (RITZ; STREIBIG; KNISS, 2021).

Referências

- ABENDROTH, J. A.; BLANKENSHIP, E. E.; MARTIN, A. R.; ROETH, F. W. Joint Action Analysis Utilizing Concentration Addition and Independent Action Models. **Weed Technology**, v. 25, n. 3, p. 436–446, 2011.
- AGATHOKLEOUS, E.; MOUZAKI-PAXINOI, A.-C.; SAITANIS, C. J.; PAOLETTI, E.; MANNING, W. J. The first toxicological study of the antiozonant and research tool ethylene diurea (EDU) using a *Lemna minor* L. bioassay: Hints to its mode of action. **Environmental Pollution**, v. 213, p. 996–1006, 2016.
- BARBIERI, G. F.; YOUNG, B. G.; DAYAN, F. E.; STREIBIG, J. C.; TAKANO, H. K.; MEROTTO, A.; AVILA, L. A. Herbicide mixtures: interactions and modeling. **Advances in Weed Science**, v. 40, n. spe1, p. 1–25, 2022.
- BEKCAN, S.; ATAR, H. H.; BEYAZ, A. Measurement of the Effects of Liquid Fertilizers at the Different Levels on Duckweed (*Lemna Minor* L.) Growth Using Image Analysis Technique. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, n. 2, p. 1205–1209, 2009.
- BERENBAUM, M. C. What is synergy? **Pharmacological Reviews**, v. 41, n. 2, p. 93 LP – 141, 1989.
- BLISS, C. I. The toxicity of poisons applied jointly. **Annals of Applied Biology**, v. 26, n. 3, p. 585–615, 1939.
- CEDERGREEN, N.; CHRISTENSEN, A. M.; KAMPER, A.; KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K.; STREIBIG, J. C.; SØRENSEN, H. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1621–1632, 2008.
- CEDERGREEN, N.; MADSEN, T. V. Nitrogen uptake by the floating macrophyte *Lemna minor*. **New Phytologist**, v. 155, n. 2, p. 285–292, 2002.
- CEDERGREEN, N.; STREIBIG, J. C. Can the choice of endpoint lead to contradictory results of mixture-toxicity experiments? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 7, p. 1676–1683, 2005.
- COKOL-CAKMAK, M.; BAKAN, F.; CETNER, S.; COKOL, M. Diagonal Method to Measure Synergy Among Any Number of Drugs. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 136, 2018.
- COLBY, S. R. Calculating Synergistic and Antagonistic Responses of Herbicide Combinations. **Weeds**, v. 15, n. 1, p. 20–22, 1967.
- DEMIDENKO, E.; MILLER, T. W. Statistical determination of synergy based on Bliss definition of drugs independence. **PLOS ONE**, v. 14, n. 11, p. e0224137, 2019.
- DOSNON-OLETTE, R.; COUDERCHET, M.; EL ARFAOUI, A.; SAYEN, S.; EULLAFFROY, P. Influence of initial pesticide concentrations and plant population density on dimethomorph toxicity and removal by two duckweed species. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 10, p. 2254–2259, 2010.
- FLINT, J. L.; CORNELIUS, P. L.; BARRETT, M. Analyzing Herbicide Interactions: A Statistical Treatment of Colby's Method. **Weed Technology**, v. 2, n. 3, p. 304–309, 1988.
- GARCIA, D. B. **Lixiviação e eficácia de controle de plantas daninhas da formulação comercial de diurom + hexazinona + sulfometurom-metílico em diferentes solos, condições hídricas e presença de palha**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- GENNINGS, C.; CARTER, W. H.; CARCHMAN, R. A.; TEUSCHLER, L. K.; SIMMONS, J. E.; CARNEY, E. W. A Unifying Concept for Assessing Toxicological Interactions: Changes in Slope. **Toxicological Sciences**, v. 88, n. 2, p. 287–297, 2005.

- GOLDONI, M.; JOHANSSON, C. A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: Evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. **Toxicology in Vitro**, v. 21, n. 5, p. 759–769, 2007.
- GORZERINO, C.; QUEMENEUR, A.; HILLENWECK, A.; BARADAT, M.; DELOUS, G.; OLLITRAULT, M.; AZAM, D.; CAQUET, T.; LAGADIC, L. Effects of diquat and fomesafen applied alone and in combination with a nonylphenol polyethoxylate adjuvant on *Lemna minor* in aquatic indoor microcosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 3, p. 802–810, 2009.
- GRAEFF, Á.; VIANNA, A. G.; TONETTA, D.; PRUNER, E. N. Avaliação do potencial nutritivo da Macrófita aquática *Lemna minor*, por meio da análise da composição química e por sua utilização em ração para carpa comum (*Cyprinus carpio* L.) na fase de recria. **Evidência**, v. 7, n. 1, p. 37–50, 2007.
- GRECO, W. R.; BRAVO, G.; PARSONS, J. C. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. **Pharmacological Reviews**, v. 47, n. 2, p. 331–85, 1995.
- HANSON, M. L. Aquatic Macrophytes in Ecotoxicology. In: **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013. p. 89–98.
- HEGEL, C. G. Z.; MELO, E. F. R. Q. Macrófitas aquáticas como bioindicadoras da qualidade da água dos arroios da RPPN maragato. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 673–693, 2016.
- HEWLETT, P. S. Measurement of the Potencies of Drug Mixtures. **Biometrics**, v. 25, n. 3, p. 477, 1969.
- IBERITE, M.; IAMONICO, D.; ABATI, S.; ABBATE, G. *Lemna valdiviana* Phil. (Araceae) as a potential invasive species in Italy and Europe: Taxonomic study and first observations on its ecology and distribution. **Plant Biosystems**, v. 145, n. 4, p. 751–757, 2011.
- ISO CD 20079. **Water quality — Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed growth inhibition test - ISO 20079:2005(E)**. Geneva: ISO, 2005.
- KESHTKAR, E.; KUDSK, P.; MESGARAN, M. B. Perspective: common errors in dose–response analysis and how to avoid them. **Pest Management Science**, v. 77, n. 6, p. 2599–2608, 2021.
- LAIRD, R. A.; BARKS, P. M. Skimming the surface: duckweed as a model system in ecology and evolution. **American Journal of Botany**, v. 105, n. 12, p. 1962–1966, 2018.
- LEDERER, S.; DIJKSTRA, T. M. H.; HESKES, T. Additive Dose Response Models: Explicit Formulation and the Loewe Additivity Consistency Condition. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. FEB, p. 1–11, 2018.
- LOEWE, S. The Problem of Synergism and Antagonism of Combined Drugs. **Arzneimittel-Forschung**, v. 3, n. 6, p. 285–90, jun. 1953.
- LOURENÇO, A. R.; BOVE, C. P. Flora do Rio de Janeiro: Lemnoideae (Araceae). **Rodriguésia**, v. 70, 2019.
- MICHEL, A.; JOHNSON, R. D.; DUKE, S. O.; SCHEFFLER, B. E. Dose-response relationship between herbicides with different modes of action and growth of *Lemna paucicostata*: an improved ecotoxicological method. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 1074–1079, 2004.
- MOHEDANO, R. A.; COSTA, R. H. R.; FILHO, P. B. Effects of CO₂ concentration on nutrient uptake and starch accumulation by duckweed used for wastewater treatment and bioethanol production. **Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal**, v. 7, n. 1, p. 30–41, 2016.
- MORSE, P. M. Some Comments on the Assessment of Joint Action in Herbicide Mixtures. **Weed Science**, v. 26, n. 1, p. 58–71, 1978.
- OECD. **OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS - *Lemna* sp. Growth Inhibition Test**. 2002, 22 p.

- OKAMURA, H.; TOGOSMAA, L.; SAWAMOTO, T.; FUKUSHI, K.; NISHIDA, T.; BEPPU, T. Effects of metal pyrrithione antifoulants on freshwater macrophyte *Lemna gibba* G3 determined by image analysis. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 1102–1111, 2012.
- PARK, J.; BROWN, M.; HAN, T. The Lemna Toxicity Test: Guideline of a New Test System Based on Root Re-Growth. **Protocol Exchange**, p. 1–9, 2015.
- PEREIRA, S. de F.; POTT, V. J.; TEMPONI, L. G. Lemnoideae (Araceae) no estado do Paraná, Brasil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 3, p. 839–848, 2016.
- POTT, V. J. Lemnaceae. In: WANDERLEY, M.G.L., SHEPHERD, G.J., GIULIETTI, A.M., MELHEM, T.S., BITTRICH, V.; KAMEYAMA, C. (Ed.). **Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2002. p. 135–140.
- POTT, V. J.; CERVI, A. C. A família Lemnaceae Gray no Pantanal (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 153–174, 1999.
- QUEIROZ, S. C. N.; CANTRELL, C. L.; DUKE, S. O.; WEDGE, D. E.; NANDULA, V. K.; MORAES, R. M.; CERDEIRA, A. L. Bioassay-directed isolation and identification of phytotoxic and fungitoxic acetylenes from *Conyza canadensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5893–5898, 2012.
- RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; CVJETKO, P.; MARIJANOVIĆ RAJČIĆ, M.; ŠIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B.; PAVLICA, M. Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 2, p. 182–187, 2011.
- RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-response analysis using R. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, 2015.
- RITZ, C.; STREIBIG, J. C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, v. 12, n. 5, p. 1–22, 2005.
- RITZ, C.; STREIBIG, J. C. **Nonlinear Regression with R**. 1. ed. New York, NY: Springer, New York, NY, 2008.
- RITZ, C.; STREIBIG, J. C. **Dose response curves and other nonlinear curves in Weed Science and Ecotoxicology with the add-on package drc in R**. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=57ebcf0793553b39505bc8c1&assetKey=AS%3A411294889988097%401475071751844>>. Acesso em: 26 jul. 2020.
- RITZ, C.; STREIBIG, J. C. From additivity to synergism – A modelling perspective. **Synergy**, v. 1, n. 1, p. 22–29, 2014.
- RITZ, C.; STREIBIG, J. C.; KNISS, A. How to use statistics to claim antagonism and synergism from binary mixture experiments. **Pest Management Science**, v. 77, n. 9, p. 3890–3899, 2021.
- SANTAROSSA, M. A. da S. **Contaminação de águas de pesque-pague por agrotóxicos e cafeína em áreas de cultivo de cana-de-açúcar**. 2017. Tese (Doutorado em Aquicultura – Centro de Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- SØRENSEN, H.; CEDERGREEN, N.; SKOVGAARD, I. M.; STREIBIG, J. C. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. **Environmental and Ecological Statistics**, v. 14, n. 4, p. 383–397, 2007.
- STREIBIG, J. C.; JENSEN, J. E. Actions of herbicides in mixtures. In: COBB, A.; KIRKWOOD, R. C. (Ed.). **Herbicides and Their Mechanisms of Action**. [s.l.] CRC Press, 2000. p. 152–180.
- TALLARIDA, R. J. Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. **Genes & Cancer**, v. 2, n. 11, p. 1003–1008, 2011.

TEAM, R. C. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria - R Foundation for Statistical Computing, 2020.

VØLUND, A. Dose response surface bioassay. In: XVth Biometric Conference, vol II, **Anais...**1992.

ZAKARIA, H.; SHAMMOUT, M. Duckweed in Irrigation Water as a Replacement of Soybean Meal in the Laying Hens' Diet. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 20, n. 3, p. 573–582, 2018.

3. TESTES PARA DETECÇÃO DE ADITIVIDADE, SINERGISMO OU ANTAGONISMO EM MISTURAS DE GLIFOSATO E FLUMIOXAZINA, AMBOS EM FORMULAÇÃO COMERCIAL, USANDO ISOBOLOGRAMAS, EXPERIMENTOS FATORIAIS E *Lemna minuta* COMO BIOINDICADOR

Resumo

Misturas de herbicidas são importantes pois proporcionam o aumento do espectro de ação do tratamento e possibilitam a sustentabilidade dos herbicidas no sistema de produção. O efeito de possíveis interações sinérgicas ou antagônicas entre os herbicidas é de grande interesse. Uma das formas de se estudar interações entre misturas binárias de herbicidas é com o uso de isobologramas, que são representações gráficas dessa interação e são usualmente comparadas com o modelo aditivo (ADM). Outro delineamento usual no estudo de misturas é o fatorial sendo os efeitos comparados ao modelo multiplicativo (MSM). Esse experimento teve o objetivo estudar o efeito da mistura dos herbicidas glifosato e flumioxazina aplicados como produtos comerciais Roundup Original DI® e Flumyzin 500 SC usando como bioindicador clones de macrófitas da espécie *Lemna minuta* e crescimento relativo em área como variável resposta. Para a elaboração dos isobologramas, foram feitos dois experimentos no delineamento clássico de misturas binárias em diferentes proporções. As misturas consistiram em curvas de dose-resposta dos dois herbicidas aplicados individualmente e em proporções pré-definidas tal que cada herbicida tenha as seguintes contribuições em potência na mistura 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100, sendo 100:0 e 0:100 os dois herbicidas aplicados isoladamente. As isoboles foram comparadas com o modelo aditivo e com modelos que permitem testar a distribuição dos pontos no isoblograma de forma simétrica e assimétrica em relação à linha de aditividade. Para comparar a mistura ao modelo multiplicativo, foram realizados seis experimentos fatoriais sendo o fator 1 duas doses do herbicida glifosato (0 e 30 ppm) e o fator 2 duas doses do herbicida flumioxazina (0 e 0,0015 ppm). Os dois isobologramas não demonstraram grande efeito de interação entre os dois herbicidas sendo que a distribuição dos pontos ficou ao redor da linha de aditividade para os dois experimentos. Assim, não foi observado sinergismo entre os herbicidas glifosato e flumioxazina. Isso foi corroborado pela análise conjunta dos experimentos fatoriais, que foi não significativa, indicando ausência de interação em relação ao MSM.

Palavras-chave: 1. Modelo Aditivo 2. Modelo Multiplicativo 3. EPSPS 4. Protox 5. Isobole

Abstract

Herbicide mixtures are important because they provide an increase in the spectrum of action of the treatment and enable the herbicides sustainability in the production system. The possible effect of synergistic or antagonistic interactions between herbicides is of great interest. One of the ways to study interactions between binary herbicide mixtures is with the use of isobolograms, which are graphical representations of chemical interactions and are usually compared with the additive dose model (ADM). Another common design in the study of mixtures is the factorial, with the effects compared to the multiplicative survival model (MSM). This experiment aimed to study the effect herbicide mixture with glyphosate and flumioxazin applied as commercial products Roundup Original DI® and Flumyzin 500 SC with *Lemna minuta* macrophytes as bioindicators and with relative growth in area as an endpoint. For the isobolograms, two experiments were carried out in the classical design for binary mixtures in different proportions. The mixtures consisted in dose-response curves of the two herbicides applied individually and in pre-defined proportions such that each herbicide has the following potency contributions in the mixture 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100, with 100:0 and 0:100 being the two herbicides applied alone. The isoboles were compared with the ADM and with models that allow testing the distribution of points in the isoblogram symmetrically and asymmetrically in relation to the additivity line. To compare the mixture to the MSM, six factorial experiments were carried out,

with factor 1 being two doses of the herbicide glyphosate (0 and 30 ppm) and factor 2 being two doses of the herbicide flumioxazin (0 and 0,0015 ppm). The two isobolograms did not show a great effect of interaction between the two herbicides and the distribution of points was around the additivity line for the two experiments. Thus, no synergism was observed between the herbicides glyphosate and flumioxazin. This was corroborated by the joint analysis of the factorial experiments, which was not significant, indicating the absence of interaction in relation to the MSM.

Keywords: 1. Additive Dose Model 2. Multiplicative Survival Model 3. EPSPS 4. Protox 4. Isobole

3.1. Introdução

Dentre os mecanismos de ação conhecidos, os herbicidas podem atuar nas vias de produção de aminoácidos e na fotossíntese das plantas. Os aminoácidos são compostos nitrogenados base para a construção de proteínas. As plantas produzem seus próprios aminoácidos e esse processo é chamado de biossíntese. Uma importante rota metabólica na biossíntese de aminoácidos aromáticos é a rota do ácido chiquímico, conhecido na sua forma aniônica por chiquimato, que é considerada uma via essencial para a manutenção das bactérias e plantas no ambiente e está ausente em animais (KISHORE; SHAH, 1988; ÁVILA, 2017). Essa via é responsável pela formação do corismato, que é o último intermediário comum na biossíntese de compostos aromáticos. Por isso, o corismato é chamado de precursor dos aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina (KISHORE; SHAH, 1988).

O glifosato é um herbicida inibidor da enzima *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase* (EPSPS) na via do chiquimato, bloqueando a produção de triptofano, fenilalanina ou tirosina. Os inibidores da biossíntese de aminoácidos inicialmente os bloqueiam nas regiões de rápido crescimento das plantas. Isso é seguido pela inibição de outros tecidos (KISHORE; SHAH, 1988).

O glifosato é um herbicida pós-emergente de amplo espectro e está entre os químicos mais usados na agricultura globalmente (ANNETT; HABIBI; HONTELA, 2014). Essa molécula é usualmente utilizada nas áreas cultivadas com soja, milho e algodão transgênicos tolerantes ao glifosato, em áreas com frutíferas perenes (VILA-AIUB et al., 2008) e em outras espécies perenes com aplicações localizadas.

Os cloroplastos são organelas presentes em células vegetais que atuam no processo de fotossíntese. Para isso, a clorofila, pigmento de cor verde encontrado no interior dos cloroplastos, atua na absorção da energia da luz.

A clorofila tem uma estrutura cíclica tetrapirrólica chamada porfirina. O último passo na via de síntese da porfirina, antes de se ramificar na síntese de heme e de clorofila, é a oxidação do protoporfirinogênio-IX em protoporfirina-IX, que ocorre na presença de oxigênio e da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox ou PPO) (GRANICK, 1965; WATANABE et al., 2000; JUNG et al., 2008). A protoporfirina-IX é convertida em heme ou clorofila pela quelação de Fe^{2+} (ferro II) ou Mg^{2+} , respectivamente (JUNG et al., 2008).

A inibição da Protox resulta em acúmulo de protoporfirinogênio-IX que sai do cloroplasto e é rapidamente oxidado em protoporfirina-IX na membrana plasmática por enzimas não específicas semelhantes à Protox. A protoporfirina-IX produzida na membrana plasmática não pode ser consumida pois as quelatases de ferro e magnésio estão localizadas somente nos cloroplastos e mitocôndrias. A protoporfirina-IX é uma molécula extremamente reativa que, na presença de luz e oxigênio, produz radicais livres (oxigênio singlete) com alta capacidade de oxidação de lipídeos. Uma vez que esses radicais livres se acumulam, causam danos aos componentes celulares, interrompendo a função metabólica (JUNG et al., 2008).

Os herbicidas inibidores da Protox são classificados em quatro grupos químicos. Um dos grupos é a N-feniltalimida. A flumioxazina faz parte desse grupo e tem eficácia em uma ampla variedade de plantas daninhas, possui

propriedades de residual no solo e de contato foliar e é usada em pré-emergência ou pós-emergência inicial em plantas daninhas de folhas largas e estreitas. Em todo o mundo, esse herbicida é usado para proteger uma variedade de culturas e é usado em ambientes não agroquímicos (IWASHITA et al., 2022).

O herbicida flumioxazina é normalmente utilizado em pré-emergência na cultura da soja e foi constatado seu efeito também em pós-emergência de folhas largas. Esse herbicida atua por contato em pós-emergência, tornando possível seu uso em mistura com glifosato sendo mais uma opção de manejo de plantas daninhas (MACIEL; CONSTANTIN, 2002).

Seja em áreas não agrícolas ou em áreas agrícolas sem ou com plantas transgênicas tolerantes ao glifosato, a intensa adoção desse herbicida exerceu grande pressão de seleção, o que resultou no desenvolvimento de plantas daninhas resistentes (EUBANK et al., 2013). Assim, falhas no controle de plantas daninhas por esse herbicida foram observadas (ODERO, 2012). A buva (*Conyza* spp), por exemplo, destaca-se entre as principais plantas daninhas da cultura da soja, devido a sua agressividade e à resistência ao glifosato (DALAZEN et al., 2015; CESCO et al., 2019). Dessa forma, para evitar a seleção de populações resistentes ao glifosato, o uso de outros herbicidas tornou-se fundamental para o manejo dessa planta daninha (DALAZEN et al., 2015).

Uma das recomendações para controle de espécies tolerantes e resistentes ao glifosato é o seu uso em mistura com outros herbicidas com diferentes mecanismos de ação, aumentando o espectro de controle desses herbicidas (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI; SANTOS, 2001; WERLANG; SILVA, 2002).

Para prevenir a expansão de espécies de plantas daninhas resistentes ao glifosato em áreas intensivamente tratadas com esse herbicida, como é o caso de áreas cultivadas com soja transgênica tolerante ao glifosato, recomenda-se a rotação de culturas e a mistura com herbicidas de diferentes mecanismos de ação (MONQUERO; CHRISTOFFOLETI; SANTOS, 2001; MACIEL; CONSTANTIN, 2002; DURIGAN et al., 2006; FADIN et al., 2018).

Dessa forma, o objetivo desse experimento foi estudar a interação da mistura de glifosato e flumioxazina aplicados na forma de produto comercial. Para isso, foram feitos bioensaios com a planta *Lemna minuta* e isobologramas em comparação ao ADM e experimentos fatoriais em comparação ao MSM.

3.2. Material e Métodos

Para a realização dos experimentos, foram usados clones de *Lemna minuta* criados em laboratório do Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da FMC, em Paulínia – SP. A criação e preparação das macrófitas para os experimentos foram realizadas como explicado no capítulo 2.1.2.

Os experimentos foram realizados no mesmo ambiente onde as macrófitas foram criadas: câmaras de crescimento Conviron® com fotoperíodo de 12h, luminosidade de 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luz ao nível da borda superior das placas, luz branca fluorescente CW MASTER TL5 HO 54W/840 e 24 °C de temperatura média. Porém, para os experimentos utilizaram-se placas transparentes de polimetilmetacrilato para cultivo de células de 24 poços e volume de 3 cm^3 .

Cada poço foi considerado uma unidade experimental. No dia do experimento, para cada poço, foi selecionada 1 planta com duas frondes e com área das frondes semelhantes. As plantas foram acondicionadas inicialmente nos poços com 1 mL de meio Steinberg modificado. Após todas as plantas serem acondicionadas nas unidades experimentais, os diferentes tratamentos herbicidas foram aplicados utilizando pipeta com o volume de 1 mL com concentração tal que resultasse na concentração final desejada por tratamento no volume final de 2 mL/poço. Assim,

não houve nenhum contato com as plantas após a aplicação do herbicida. Logo após a aplicação herbicida, foi tirada uma foto de cada bandeja com o objetivo de se medir a área inicial de cada planta. As placas foram acondicionadas em negatoscópio com iluminação fluorescente branca ligado em ambiente com cortinas escuras para evitar a entrada de luz e com todas as outras luzes artificiais do ambiente apagadas. A câmera fotográfica utilizada foi da marca GoPro modelo Hero 7 com controle remoto. A câmera foi montada em suporte de modo a ficar sempre na mesma altura, acima das placas. Para a medição da área inicial e final, foi utilizado o software ImageJ (RUEDEN et al., 2017).

Após 7 dias, as plantas foram fotografadas novamente no mesmo ambiente e condições das fotos iniciais. Desse modo, é possível estimar a diferença de área foliar com sua medida inicial e final. A variável resposta utilizada nesse experimento foi o crescimento de área foliar relativo (Crescimento Relativo) calculado por

$$r_{i-j} = \frac{\ln x_{tj} - \ln x_{ti}}{t_j - t_i} \quad (9)$$

onde r_{i-j} é a taxa de crescimento por dia, x_{ti} é o valor de área das frondes em t_i em dias (início do período), x_{tj} é o valor da observação em t_j em dias (final do período), e $t_j - t_i$ é o período de tempo entre x_{ti} e x_{tj} em dias (OECD, 2002; ISO, 2005).

Os herbicidas utilizados foram Roundup Original DI® (glifosato) (Lote: 0101-20-38400) e Flumyzin 500 SC® (flumioxazina) (Lote: 059-18-10542).

Com o objetivo de se testar a mistura dos dois herbicidas assumindo ADM e usando isobogramas, os experimentos de mistura foram realizados no delineamento clássico de misturas binárias em diferentes proporções (CEDERGREEN et al., 2007a). As diferentes proporções consistiram em curvas de dose-resposta dos dois herbicidas aplicados individualmente e em curvas de dose-resposta dos herbicidas misturados em proporções pré-definidas. As misturas foram calculadas com o objetivo de se obter uma contribuição virtual (curvas equipotentes) de cada herbicida da mistura nas seguintes proporções 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100, sendo 100:0 e 0:100 os dois herbicidas aplicados isoladamente. Para ajustar as doses de modo a conseguir assíntotas mínimas próximas entre as curvas dos dois herbicidas isolados e para definir a concentração de cada herbicida necessária na mistura para se obter as contribuições virtuais desejadas, foram realizados experimentos de dose-resposta prévios, com os herbicidas isolados, seguindo a mesma metodologia. Foram consideradas as ED50 de 30 ppm para glifosato e 0,0015 ppm para flumioxazina.

Para se obter as diferentes diluições de cada dose-resposta, foi feita uma solução inicial com concentração definida para cada proporção e essa solução foi diluída com fator 2 para gerar os diferentes tratamentos (8 doses). As doses utilizadas encontram-se na Tabela 2.

Cada tratamento teve 3 repetições com exceção da testemunha, comum a todas as misturas, que teve 24 repetições. O delineamento experimental considerado foi o inteiramente casualizado. Os experimentos foram realizados duas vezes (março de 2020 e agosto de 2021).

As curvas de todas as misturas foram ajustadas simultaneamente (KESHITKAR; KUDSK; MESGARAN, 2021). Para testar o ajuste das curvas foi feito um teste para falta de ajuste e foram realizados testes para similaridades entre os parâmetros b e c da Equação 4 para checar a possibilidade de redução do modelo.

O ajustes das isoboles para ADM, Hewlett (1969) e Vølund (1992) foram testados segundo o proposto por Sørensen et al. (2007).

Além disso, com o objetivo de se testar a mistura dos dois herbicidas assumindo MSM, foram realizados experimentos de mistura em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2 de tratamentos, com

duas doses de glifosato (0 ppm e 30 ppm) e duas doses flumioxazina (0 ppm e 0,0015 ppm). Foram consideradas 3 repetições por tratamento. Esses experimentos foram realizados seis vezes, entre março de 2020 e agosto de 2021.

Tabela 2. Distribuição das doses para as curvas de dose-resposta dos herbicidas glifosato (gli) e flumioxazina (flu), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em 3 misturas de diferentes proporções, Paulínia – SP.

		glifosato (ppm)						
Proporção		Diluições						
gli:flu		1	2	3	4	5	6	7
100:0		110	55	27,5	13,75	6,875	3,4375	1,71875
75:25		82,5	41,25	20,625	10,3125	5,15625	2,578125	1,2890625
50:50		55	27,5	13,75	6,875	3,4375	1,71875	0,859375
25:75		27,5	13,75	6,875	3,4375	1,71875	0,859375	0,4296875
0:100		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		flumioxazina (ppm)						
Proporção		Diluições						
gli:flu		1	2	3	4	5	6	7
100:0		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
75:25		0,001375	68,75e-5	34,375e-5	17,188e-5	8,5937e-5	4,2969e-5	2,1484e-5
50:50		0,00275	0,001375	68,75e-5	34,375e-5	17,187e-5	8,5937e-5	4,2969e-5
25:75		0,004125	0,002062	103,12e-5	51,563e-5	25,781e-5	12,890e-5	6,445e-5
0:100		0,0055	0,00275	0,001375	68,75e-5	34,375e-5	17,187e-5	8,5937e-5

Para a análise estatística e comparação dos experimentos fatoriais com o modelo de referência MSM, foi feito um teste de Qui-quadrado considerando um experimento por vez. Para isso, os dados de crescimento relativo foram transformados em porcentagem de redução de crescimento em relação à testemunha. No Apêndice F demonstra-se como fazer essa análise utilizando o software R.

Para levar em conta a variabilidade entre os experimentos na análise estatística, foi feita uma adaptação ao método proposto por Flint, Cornelius e Barret (1988) utilizando um modelo misto, no qual cada experimento foi considerado uma variável aleatória. No Apêndice G demonstra-se a teoria e um exemplo em R de como fazer a análise estatística da mistura em relação ao MSM segundo o que foi proposto por Flint, Cornelius e Barret (1988) para um experimento fatorial 2 x 2.

3.3. Resultados e Discussão

O modelo ADM assume que os herbicidas em uma mistura podem ser substituídos em doses que resultem no mesmo resultado biológico. Essa dose, para cada nível de resposta, vai ser a potência relativa entre os dois herbicidas. Para traçar as isoboles, deve-se ter um herbicida de referência, ou, como colocado por Streibig e Jensen (2000), os herbicidas devem ser convertidos para a mesma “moeda”. No cálculo dessa taxa de conversão são usadas as curvas dos herbicidas aplicados isoladamente, em suas próprias doses. O herbicida de referência usado nessa

pesquisa foi a flumioxazina e os parâmetros das curvas dos herbicidas aplicados isoladamente (Figura 6) estão na Tabela 3.

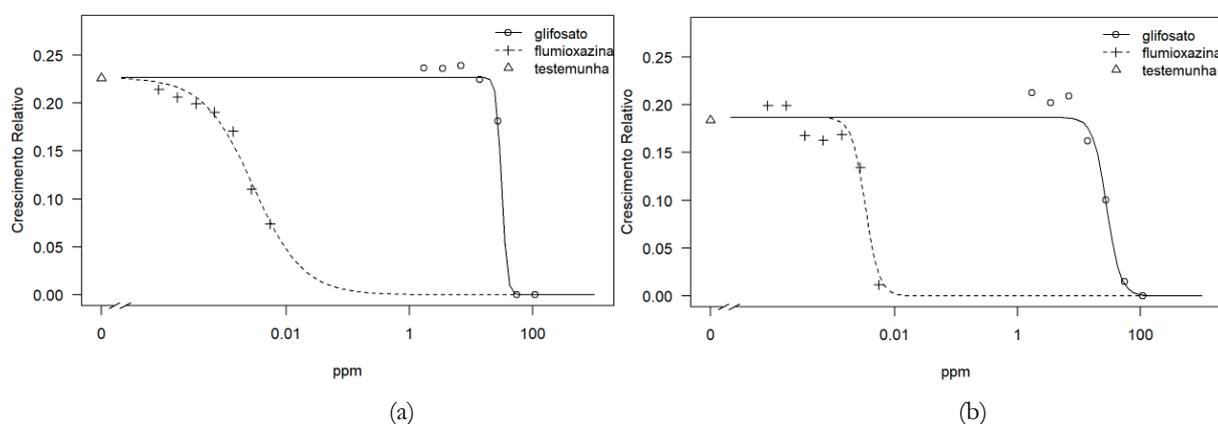


Figura 6. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas glifosato e flumioxazina, em formulação comercial, aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

Tabela 3. Resultados das curvas de dose-resposta para glifosato e flumioxazina em formulação comercial aplicados isoladamente, Paulínia – SP.

Herbicidas	b ^a	c	d	e [ppm]
Experimento a				
glifosato	10,323 (10,94) ^b	-	0,22 (0,002)	31,14 (7,92)
flumioxazina	1,0762 (0,207)	-		0,0029 (37e-5)
Experimento b				
glifosato		-		28,23 (1,92)
flumioxazina	3,94 (0,86)	-	0,18 (0,003)	0,0033 (2,2e-4)

^aPara o modelo Log-logístico de 4 parâmetros, b é a declividade da curva ao redor de e , c é a assíntota inferior da curva, d é a assíntota superior da curva, e é a dose correspondente à resposta no ponto de inflexão. ^bValores entre parênteses correspondem ao erro padrão dos coeficientes.

Com base na potência relativa dos herbicidas, é feito o cálculo e o planejamento das misturas em diferentes proporções de modo a se obter pontos bem distribuídos no isoblograma, evitando seu desbalanceamento, ou seja, aglomeração dos pontos das misturas perto de algum dos eixos. Isso pode acontecer se as misturas não forem planejadas em termos de potência relativa, mas somente em termos de doses absolutas (KUDSK; MATHIASSEN, 2004). No Apêndice H é apresentado um exemplo de isoblograma cujas misturas estão mal distribuídas e os códigos em R usados.

O ED50 encontrado para a flumioxazina teve uma variação de aproximadamente duas vezes o esperado inicialmente, mas essa diferença não impactou significativamente a distribuição dos pontos na isobole (Figuras 8, 9 e 10). É importante ressaltar que o modelo usado para traçar as isoboles foi o modelo levando em conta a análise de todas as curvas de dose-resposta ao mesmo tempo (KESHTKAR; KUDSK; MESGARAN, 2021). As curvas de dose-resposta dos herbicidas aplicados isoladamente, analisados com as mesmas restrições aplicadas à análise conjunta de todas as curvas, é usada para calcular a taxa de conversão entre os herbicidas. Desse modo, podem ocorrer pequenas variações nos parâmetros das curvas dos herbicidas aplicados isoladamente e do ajuste conjunto (Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros das curvas de dose-resposta de dois experimentos (a) e (b) para glifosato e flumioxazina em formulação comercial em três misturas de diferentes proporções (25:75, 50:50, 75:25) e isolados (0:100, 100:0), Paulínia – SP.

Herbicidas	b ^a	c	d	e [ppm]	p-valor ^e
flu:gli	Experimento a				
0:100	9,17 (10,81) ^b			1,59e-3 (2,8e-4)	
25:75	3,33 (0,65)			2,19e-3 (1,7e-4)	
50:50	6,21 (1,80)	- ^c	0,22 ^d (0,002)	2,09e-3 (1,8e-4)	0,82
75:25	3,91 (1,38)			2,78e-3 (1,8e-4)	
100:0	1,05 (0,21)			2,88e-3 (4,5e-4)	
flu:gli	Experimento b				
0:100				1,40e-3 (0,8e-4)	
25:75				1,72e-3 (1,1e-4)	
50:50	4,47 (0,59)	-	0,18 (0,002)	2,34e-3 (1,5e-4)	0,36
75:25				3,44e-3 (2,2e-4)	
100:0				3,29e-3 (2,1e-4)	

^aPara o modelo Log-logístico de 4 parâmetros, b é a declividade da curva ao redor de e , c é a assíntota inferior da curva, d é a assíntota superior da curva, e é a dose correspondente à resposta no ponto de inflexão. ^bValores entre parênteses correspondem ao erro padrão dos coeficientes. ^cQuando o parâmetro c está ausente, o modelo Log-logístico de 4 parâmetros pôde ser reduzido ao modelo de 3 parâmetros. ^dOnde há o mesmo valor para todas as curvas significa que houve ajuste com esse parâmetro fixo. ^ep-valor do teste para falta de ajuste das curvas ajustadas simultaneamente.

Considerando todas as misturas ao mesmo tempo, para os dois experimentos, o modelo log-logístico de 4 parâmetros pôde ser reduzido ao modelo de 3 parâmetros, ou seja, as doses máximas das curvas de dose-resposta resultaram em ausência de crescimento para todas as misturas. No experimento (a), para a curva do glifosato isoladamente (0:100), não houve informação suficiente ao redor do ED50 e o parâmetro b ficou mal estimado. Na análise conjunta, não se pôde considerar o mesmo parâmetro b para todas as curvas. Já para o experimento (b), as curvas foram consideradas paralelas. Levando em conta essas restrições, as curvas tiveram um ajuste satisfatório (p-valor = 0,82 para o experimento(a) e 0,36 para o experimento (b)) (Tabela 4).

Na Figura 7 observa-se que no experimento (a), a curva para a flumioxazina aplicada isoladamente resultou em inclinação diferentes das demais, impedindo que a restrição à inclinação fosse aplicada ao modelo. Isso não foi observado no experimento (b).

Os isobologramas aqui apresentados são a representação do nível de resposta ED50, escolhido previamente, em forma de superfície de resposta. A análise das curvas de dose-resposta traçadas em conjunto já pode indicar tendências de deslocamentos das misturas em relação aos herbicidas aplicados isoladamente. Na Figura 7 observa-se que não ocorreu deslocamento das curvas das misturas no sentido de maior efeito para as mesmas doses (à esquerda das curvas dos herbicidas aplicados isoladamente). Por outro lado, também não há deslocamento das curvas para a direita.

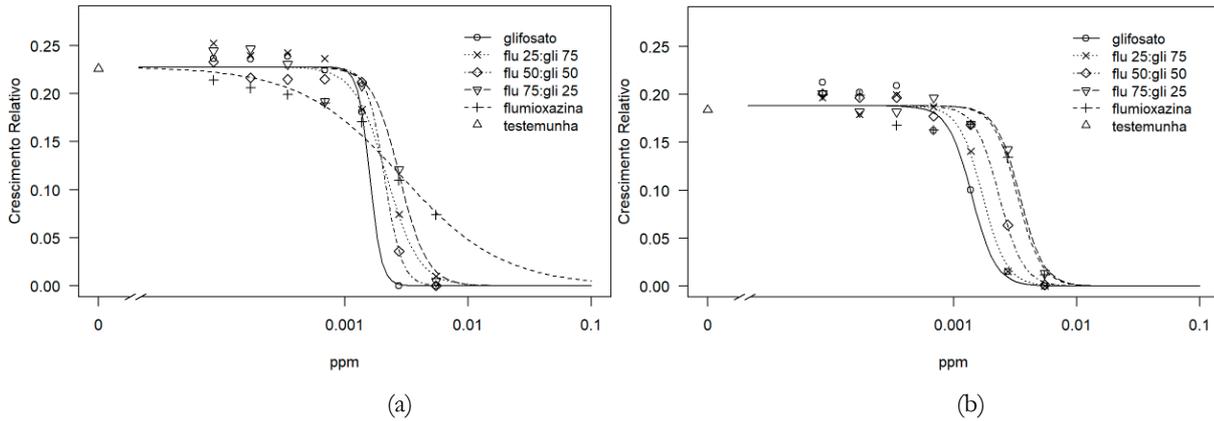


Figura 7. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas glifosato (gli) e flumioxazina (flu), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de gli e flu. Paulínia – SP.

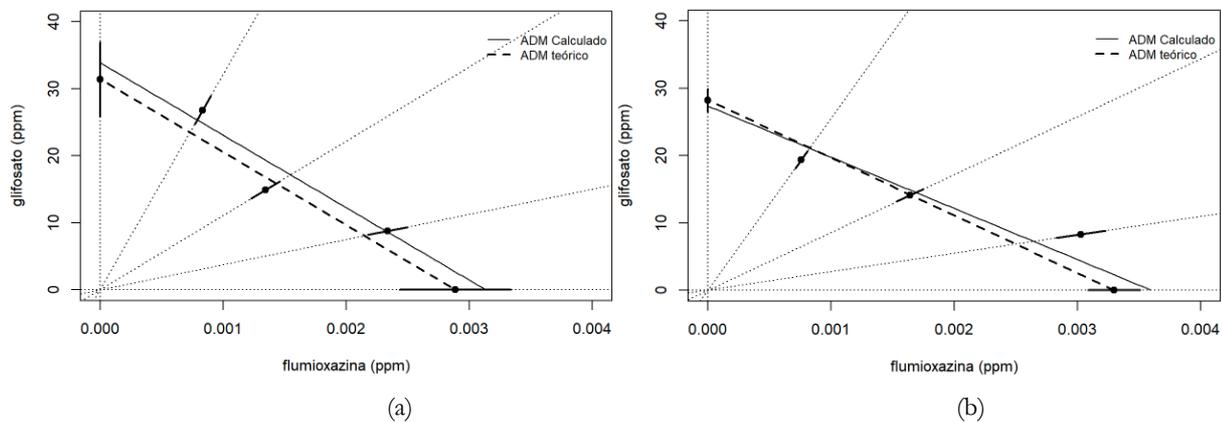


Figura 8. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas glifosato (gli) e flumioxazina (flu), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de gli e flu. ADM calculado (linha contínua) é a isobole segundo o modelo ADM levando em conta todos os pontos para traçar a isobole. ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

A isobole considerando ADM está ilustrada na Figura 8. A hipótese para o modelo aditivo (Equação 3) não pôde ser rejeitada para o experimento (a) (p -valor = 0,52) porém foi rejeitada para o experimento (b) (p -valor = 0,04), principalmente pelo efeito da mistura 25:75 glifosato:flumioxazina, acima da linha de aditividade. Essa mesma mistura ficou mais próxima da linha da aditividade no experimento (a).

A isobole considerando a Equação 7 não foi rejeitada para o experimento (a) (p -valor = 0,56, $\lambda = 0,79 \pm 0,22$), mesmo com a mistura 50:50 glifosato:flumioxazina estando bem próxima e levemente abaixo da linha teórica de aditividade (Figura 9). Para o experimento (b), o modelo de Hewlett (1969) foi rejeitado (p -valor = 0,01, $\lambda = 0,94 \pm 0,09$), assim como o modelo ADM.

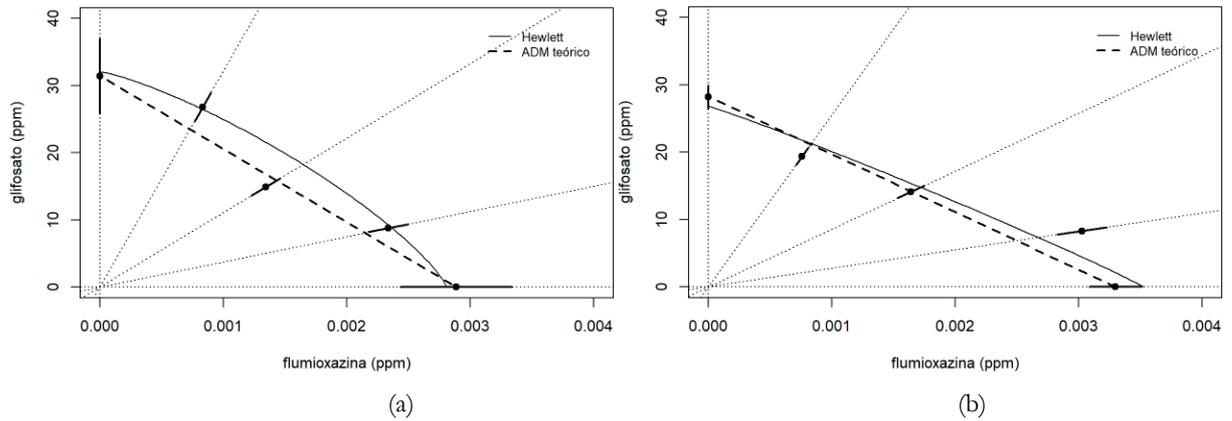


Figura 9. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas glifosato (gli) e flumioxazina (flu), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de gli e flu. Hewlett (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Hewlett (1969). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

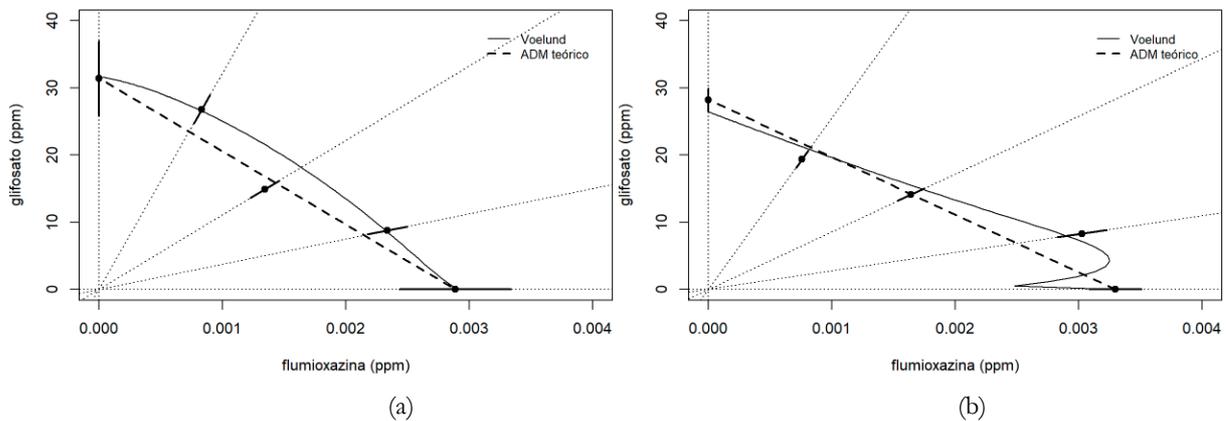


Figura 10. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas glifosato (gli) e flumioxazina (flu), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de gli e flu. Voelund (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Vølund (1992). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

A isobole considerando o modelo assimétrico de Vølund (1992) também não foi rejeitada para o experimento (a) (p -valor = 0,3). Porém, os parâmetros de interação (η_1 e η_2) foram não significativos. Para o experimento (b), o modelo de Vølund (1992) não foi rejeitado, mas com o p -valor quase significativo (p -valor = 0,06), com os parâmetros de interação $\eta_1 = 15,23 \pm 9,0$ não significativo e $\eta_2 = 0,13 \pm 0,05$ (Figura 10).

Na Tabela 5 encontram-se os resultados das análises dos seis experimentos de mistura de glifosato e flumioxazina em comparação ao modelo MSM (método de Colby). Na análise dos experimentos isoladamente, detectou-se em quatro experimentos a ação independente, porém também foi detectado sinergismo em um experimento (Experimento 2) e antagonismo em outro (Experimento 6).

Pela análise conjunta dos seis experimentos, segundo Flint, Cornelius e Barret (1988), considerando o modelo misto, a mistura tem efeito independente (p -valor = 0,1175).

Tabela 5. Resultados das análises individuais de seis experimentos de mistura entre os herbicidas glifosato e flumioxazina em formulação comercial em relação ao modelo MSM usando crescimento relativo de *Lemna minuta* 7 dias após a aplicação, transformado para % de redução de crescimento em relação à testemunha, Paulínia – SP.

Experimento	Valor Observado	Valor Esperado MSM	p-valor ¹	Definição em comparação ao MSM
1	58,62	60,64	0,0547	Ação independente
2	65,96	61,91	<0,001	Sinergismo
3	58,41	62,21	0,5799	Ação independente
4	53,72	62,78	0,0504	Ação independente
5	51,17	48,54	0,1539	Ação independente
6	47,50	50,14	<0,050	Antagonismo

¹Teste Qui-quadrado.

Para os experimentos de mistura em relação ao ADM, no experimento (a) não foram rejeitados os modelos ADM e Hewlett, tendo os dois o mesmo nível de significância. Se considerarmos o modelo Hewlett, a mistura de glifosato e flumioxazina necessitaria de 15% a mais de dose para resultar em efeito igual ao ADM. Porém, uma das misturas (50:50) ficou próxima da linha de aditividade e o próprio modelo ADM não pode ser rejeitado, o que indica que a mistura glifosato e flumioxazina para esse experimento resultou em efeito aditivo ou em necessidade de aumento da dose em 15% para resultar no mesmo controle. No experimento (b), a mistura 25:75 glifosato:flumioxazina ficou acima da linha de aditividade e o melhor ajuste foi para o modelo assimétrico de Vølund (1992). Considerando esse modelo, a mistura glifosato e flumioxazina necessitaria de 9% a mais de dose para obter o mesmo resultado segundo ADM, porém essa maior dose seria necessária somente para a mistura 25:75, sendo as outras misturas bem próximas do ADM. Isso é reforçado pelo fato de o parâmetro de interação η_1 não ser significativo.

Os autores Monquero, Christoffoleti e Santos (2001) estudaram o efeito de diversas misturas entre elas o glifosato e flumioxazina no controle de *Ipomoea grandifolia*, *Commelina benghalensis*, *Amaranthus hybridus*, *Galinsoga parviflora* e *Richardia brasiliensis*, aplicadas com o segundo par de folhas verdadeiras. As interações foram chamadas aditivas para as plantas daninhas *I. grandifolia*, *C. benghalensis*, *R. brasiliensis*, *A. hybridus*. A mistura do herbicida flumioxazina aplicado isoladamente e em mistura com glifosato, foi a que proporcionou, de forma geral, os melhores níveis de controle. Para *G. parviflora*, porém, houve controle total com a dose isolada de flumioxazina. Nesse experimento não foi observado efeito antagonístico da mistura de glifosato e flumioxazina para nenhuma planta daninha, entretanto as doses utilizadas resultaram em efeitos próximos ao máximo possível, o que dificulta observar, se existir, algum efeito de ganho de atividade herbicida.

Por outro lado, efeitos da interação entre esses herbicidas foram observados por Durigan et al. (2006). Em experimento para avaliar a eficácia de flumioxazina e glifosato aplicados isoladamente e em mistura no controle de plantas daninhas em citros, esses autores testaram os herbicidas em *Panicum maximum*, *Cenchrus echinatus*, *Digitaria horinzotalis*, *Alternanthera tenella*, *Bidens pilosa*, *Malvastrum coromandelianum*, *Commelina benghalensis*, *Amaranthus spinosus* e *Ageratum conyzoides*. Não foi feita comparação com nenhum modelo de referência, mas para efeito de discussão, pode ser feita a comparação dos resultados com o modelo MSM a partir das médias apresentadas nas avaliações em que não houve controle total das plantas daninhas com os herbicidas aplicados isoladamente. Se for considerado que há interação para valores de % de controle acima ou abaixo de 10% do valor esperado, houve sinergismo para *Alternanthera tenella*, *Digitaria horinzotalis* e *Malvastrum coromandelianum* observado entre 70 e 133 dias após a aplicação. Para *Commelina benghalensis* e *Ageratum conyzoides* houve sinergismo observado entre 7 e 29 dias após a aplicação. Houve ação

independente para *Panicum maximum*, *Cenchrus echinatus* e *Amaranthus spinosus* e houve antagonismo somente para *Bidens pilosa* aos 50 dias quando os herbicidas começaram a perder o controle.

Em outro experimento dessa mistura na cultura do citros, os autores Maciel e Constantin (2002) constataram que a mistura proporcionou morte mais rápida de *Bidens pilosa* aos 3 dias, com um controle de 93% frente a controles de 46 e 38% para glifosato e flumioxazina, respectivamente. Porém, esse incremento não foi observado para *Richardia brasiliensis* e *Brachiaria decumbens* pois para essas duas plantas daninhas o controle observado foi menor do que o esperado pelo MSM e para *Digitaria horizontalis* o controle observado foi semelhante ao esperado. Isso não resultou em deficiência de controle dessas plantas daninhas pela mistura, pois a partir dos 14 dias todas as plantas tiveram controle acima de 96%. Porém, o efeito da interação novamente não pode ser observado dado o alto controle (a partir de 97%) do herbicida glifosato aplicado isoladamente.

Com o objetivo de estudar falhas de controle de glifosato em *Spermacoce verticillata*, os autores Fadin et al. (2018) concluíram que as falhas do glifosato foram causadas por problemas de absorção e translocação. Como recomendação para complementar o controle do glifosato, foi recomendado o uso da flumioxazina dentre outros herbicidas. Essa mistura não resultou em perda do controle das plantas, mas pelo contrário, resultou em 100% de controle. Considerando que o objetivo do experimento era estudar a complementação, o efeito da interação não pôde ser estimado, já que a flumioxazina isoladamente resultou em controles acima de 99%.

No manejo de *Conyza* spp. resistente ao glifosato, Cesco et al. (2019) em seu segundo experimento usando a mistura de glifosato com o herbicida saflufenacil, inibidor da Protox, não encontraram interação entre os herbicidas, com o controle de *Conyza* spp. pela mistura pouco abaixo do esperado pelo MSM.

Em estudo da mistura de glifosato com o herbicida inibidor da Protox, carfentrazone-etílica, Werlang e Silva (2002) concluíram que o comportamento da mistura depende da espécie de planta daninha e da dose dos herbicidas utilizados. Poucas das combinações estudadas resultaram em efeito antagônico, prevalecendo o efeito independente em relação ao MSM. A redução no controle das plantas daninhas pela mistura de glifosato com um herbicida que possua ação de contato se deve à redução da quantidade de glifosato absorvido e translocado na planta. Os autores Eubank et al. (2013) também estudaram o efeito da interação de um herbicida inibidor da Protox, saflufenacil, com o glifosato e concluíram que o efeito foi independente em relação ao MSM. A adição de Saflufenacil reduziu em pelo menos 6% a translocação do glifosato em *Conyza canadensis*. Por outro lado, os autores Dalazen et al. (2015) estudando essa mesma mistura, relataram efeitos sinérgicos para a planta daninha *Conyza bonariensis* e ligam esse efeito às características físico-químicas do saflufenacil que lhe conferem caráter sistêmico.

No presente experimento, possíveis efeitos deletérios do herbicida inibidor da Protox na translocação do glifosato são menos significativos pois as *Lemna* ficam com uma das principais áreas de absorção e efeito (frondes) em contato com a solução herbicida durante todo o tempo do experimento.

De forma geral, na literatura não são encontrados muitos relatos da mistura entre glifosato e flumioxazina demonstrando interação significativa de forma consistente, sinérgica ou antagônica, e estudar o efeito da interação em relação a algum modelo preditivo não é o objetivo principal da maioria dos estudos, mas sim o efeito positivo que essa mistura traz ao manejo das plantas daninhas. Isso está de acordo com o que foi encontrado nesse experimento, seja na comparação das isoboles ao modelo aditivo (ADM) ou dos experimentos fatoriais em relação ao MSM.

3.4. Conclusão

Para o experimento (a), considerando o mesmo nível de significância, o modelo mais simples é mais provável. Para o experimento (b), o ponto da mistura 25:75 glifosato:flumioxazina se afastou mais do que as outras misturas da linha de aditividade. Isso resultou em melhor ajuste para o modelo assimétrico de Vølund (1992), porém sem ter todos os parâmetros significativos. Para os dois experimentos, caso se considere o efeito das misturas que se distanciaram mais da linha de aditividade usando os modelos de Hewlett (1969) e Vølund (1992), seria necessário ter um incremento de dose entre 9 e 15% para se obter o mesmo efeito previsto pelo modelo ADM. Porém, essa redução no efeito não foi presente em todas as misturas testadas e não foi replicada nos dois experimentos.

Desse modo, pode-se concluir que não foi observado sinergismo entre os herbicidas glifosato e flumioxazina usando o crescimento relativo em área de *Lemna minuta* como indicador. As misturas tiveram um comportamento mais bem representado pelo modelo aditivo.

Isso foi corroborado pela análise conjunta dos experimentos fatoriais em relação ao MSM, que foi não significativa, indicando ausência de interação.

Referências

- ANNETT, R.; HABIBI, H. R.; HONTELA, A. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 458–479, 2014.
- ÁVILA, M. B. de. **Biologia de Sistemas Computacional Aplicada à Via Metabólica do Chiquimato. Enfoque na Enzima 3-Desidroquinato Desidratase (EC 4.2.1.10)**. 2017. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CEDERGREEN, N.; KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K.; SØRENSEN, H.; STREIBIG, J. C. Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 149, 2007.
- CESCO, V. J. S.; NARDI, R.; KRENCHINSKI, F. H.; ALBRECHT, A. J. P.; RODRIGUES, D. M.; ALBRECHT, L. P. Management of Resistant *Conyza* spp. During Soybean Pre-sowing. **Planta Daninha**, v. 37, 2019.
- DALAZEN, G.; KRUSE, N. D.; MACHADO, S. L. de O.; BALBINOT, A. Sinergismo na combinação de glifosato e saflufenacil para o controle de buva. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 2, p. 249–256, 2015.
- DURIGAN, J. C.; CORREIA, N. M.; BELLOTTE, J. A. M.; REVOREDO, M. D. Eficácia do flumioxazin, aplicado isolado e em mistura com Glyphosate, para o controle de plantas daninhas em citros. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 5, n. 2, p. 45, 2006.
- EUBANK, T. W.; NANDULA, V. K.; REDDY, K. N.; POSTON, D. H.; SHAW, D. R. Saflufenacil efficacy on horseweed and its interaction with glyphosate. **Weed Biology and Management**, v. 13, n. 4, p. 135–143, dez. 2013.
- FADIN, D. A.; TORNISIELO, V. L.; BARROSO, A. A. M.; RAMOS, S.; DOS REIS, F. C.; MONQUERO, P. A. Absorption and translocation of glyphosate in *Spermacoce verticillata* and alternative herbicide control. **Weed Research**, v. 58, n. 5, p. 389–396, 2018.
- FLINT, J. L.; CORNELIUS, P. L.; BARRETT, M. Analyzing Herbicide Interactions: A Statistical Treatment of Colby's Method. **Weed Technology**, v. 2, n. 3, p. 304–309, 1988.
- GRANICK, S. Evolution of Heme and Chlorophyll. In: **Evolving Genes and Proteins**. [s.l.] Elsevier, 1965. p. 67–88.

- HEWLETT, P. S. Measurement of the Potencies of Drug Mixtures. **Biometrics**, v. 25, n. 3, p. 477, 1969.
- ISO CD 20079. **Water quality — Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (*Lemna minor*) — Duckweed growth inhibition test** - ISO 20079:2005(E). Geneva: ISO, 2005.
- IWASHITA, K.; HOSOKAWA, Y.; IHARA, R.; MIYAMOTO, T.; OTANI, M.; ABE, J.; ASANO, K.; MERCIER, O.; MIYATA, K.; BARLOW, S. Flumioxazin, a PPO inhibitor: A weight-of-evidence consideration of its mode of action as a developmental toxicant in the rat and its relevance to humans. **Toxicology**, v. 472, p. 1-10, 2022.
- JUNG, H. II; KUK, Y. I.; BACK, K.; BURGOS, N. R. Resistance pattern and antioxidant enzyme profiles of protoporphyrinogen oxidase (PROTOX) inhibitor-resistant transgenic rice. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 91, n. 1, p. 53–65, 2008.
- KESHTKAR, E.; KUDSK, P.; MESGARAN, M. B. Perspective: common errors in dose–response analysis and how to avoid them. **Pest Management Science**, v. 77, n. 6, p. 2599–2608, 2021.
- KISHORE, G. M.; SHAH, D. M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 627–663, 1988.
- KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K. Joint action of amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides. **Weed Research**, v. 44, n. 4, p. 313–322, 2004.
- MACIEL, C. D. de G.; CONSTANTIN, J. Misturas de flumioxazin com glyphosate e sulfosate para o manejo de plantas daninhas em citros. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 3, n. 2–3, p. 109–116, 2002.
- MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; SANTOS, C. T. D. Glyphosate em mistura com herbicidas alternativos para o manejo de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 19, n. 3, p. 375–380, 2001.
- ODERO, D. C. Response of Ragweed *Parthenium (Parthenium hysterophorus)* to Saflufenacil and Glyphosate. **Weed Technology**, v. 26, n. 3, p. 443–448, 2012.
- OECD. **OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS - Lemna sp. Growth Inhibition Test**. 2002, 22 p.
- RUEDEN, C. T.; SCHINDELIN, J.; HINER, M. C.; DEZONIA, B. E.; WALTER, A. E.; ARENA, E. T.; ELICEIRI, K. W. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 529, 2017.
- SØRENSEN, H.; CEDERGREEN, N.; SKOVGAARD, I. M.; STREIBIG, J. C. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. **Environmental and Ecological Statistics**, v. 14, n. 4, p. 383–397, 2007.
- STREIBIG, J. C.; JENSEN, J. E. Actions of herbicides in mixtures. In: COBB, A.; KIRKWOOD, R. C. (Ed.). **Herbicides and Their Mechanisms of Action**. [s.l.] CRC Press, 2000. p. 152–180.
- VILA-AIUB, M. M.; VIDAL, R. A.; BALBI, M. C.; GUNDEL, P. E.; TRUCCO, F.; GHERSA, C. M. Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 366–371, 2008.
- VØLUND, A. Dose response surface bioassay. In: XVth Biometric Conference, vol II, **Anais...**1992.
- WATANABE, N.; CHE, F.-S.; TERASHIMA, K.; TAKAYAMA, S.; YOSHIDA, S.; ISOGAI, A. Purification and Properties of Protoporphyrinogen Oxidase from Spinach Chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 41, n. 7, p. 889–892, 2000.
- WERLANG, R. C.; SILVA, A. A. Interação de glyphosate com carfentrazone-ethyl. **Planta Daninha**, v. 20, n. 1, p. 93–102, 2002.

4. TESTES PARA DETECÇÃO DE ADITIVIDADE, SINERGISMO OU ANTAGONISMO EM MISTURAS DE CLORIMURON ETÍLICO E SULFOMETUROM-METÍLICO, AMBOS EM FORMULAÇÃO COMERCIAL, USANDO ISOBOLOGRAMAS E *Lemna minuta* COMO BIOINDICADOR

Resumo

Existem herbicidas disponíveis no mercado que possuem dois ingredientes ativos com o mesmo mecanismo de ação. Isso ocorre porque, embora tenham o mesmo mecanismo de ação, podem existir diferenças na potência e alvos desses herbicidas, o que pode resultar em aumento do espectro de ação dessa mistura. O efeito de possíveis interações sinérgicas ou antagônicas entre os herbicidas sulfometurom-metílico e clorimuron etílico aplicados como os produtos comerciais Curavial® e Classic® foi estudado usando como bioindicador clones de macrófitas da espécie *Lemna minuta* e crescimento relativo em área como variável resposta. O modelo de referência foi o modelo aditivo (ADM) e foi utilizada a metodologia de isobologramas para comparação do resultado da mistura com o modelo de referência. Para a elaboração dos isobologramas, foram feitos dois experimentos no delineamento clássico de misturas binárias em diferentes proporções. As misturas consistiram em curvas de dose-resposta dos dois herbicidas aplicados individualmente e em proporções pré-definidas tal que cada herbicida tenha as seguintes contribuições em potência na mistura 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100, sendo 100:0 e 0:100 os dois herbicidas aplicados isoladamente. As isoboles foram comparadas com o modelo aditivo e com modelos que permitem testar a distribuição dos pontos no isoblograma de forma simétrica e assimétrica em relação à linha de aditividade. Os dois experimentos mostraram o mesmo padrão com todos os pontos da mistura situando-se abaixo da linha teórica da aditividade o que demonstra a ocorrência de sinergismo entre os dois herbicidas testados. O experimento (a) não teve um bom ajuste para nenhum modelo de referência pois uma das misturas (75:25 sulfometurom-metílico:clorimuron etílico) se distanciou de todos os outros pontos. Para o experimento (b) houve ajuste para o modelo simétrico de Hewlett (1969). Se o modelo de Hewlett (1969) for usado como referência, para se obter o resultado esperado segundo o modelo aditivo, a mistura poderia ser aplicada com redução de dose de 30 a 40%.

Palavras-chave: 1. Modelo Aditivo 2. ALS 3. Isobole 4. Classic 5. Curavial

Abstract

There are herbicides available on the market that have two actives with the same mode of action. Despite having the same mode of action, there may be differences in potency and herbicide targets, which may result in an increase in the spectrum of action of this mixture. The possible synergistic or antagonistic effect between herbicides sulfometuron-methyl and chlorimuron ethyl applied as commercial products Curavial® and Classic® was studied using clones of *Lemna minuta* macrophyte as bioindicator and relative growth rate of fronds as endpoint. The reference model was the Additive Dose Model (ADM) and the isobologram methodology was used to compare the mixture results with the reference model. To fit the isobolograms, two experiments were carried out in the classical design of binary mixtures in different proportions. The mixtures consisted in dose-response curves of the two herbicides applied individually and in pre-defined proportions such that each herbicide has the following potency contributions in the mixture 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100, with 100:0 and 0:100 being the two herbicides applied alone. The isoboles were compared with ADM and with models that allow the distribution of points in the isobologram symmetrically or asymmetrically in relation to the additivity line. The two experiments resulted in the same pattern with all mixture points plotted below the theoretical additivity line which demonstrate the synergism between the two tested herbicides. Experiment (a) did not have a good fit for any reference model because one of the mixtures (75:25 sulfometuron-methyl:chlorimuron-ethyl) was not close to all other points. For experiment (b) there was

adjustment for the symmetric model of Hewlett (1969). If the Hewlett (1969) model is used as a reference, to obtain the expected result according to ADM, the mixture can be applied with a dose reduction of 30 to 40%.

Keywords: 1. Additive Dose Model 2. ALS 3. Isobole 4. Classic 5. Curavial

4.1. Introdução

A valina, leucina e isoleucina formam o pequeno grupo de aminoácidos de cadeia ramificada (do inglês *Branched-chain amino acids* - BCAA), classificados assim por apresentarem pequenos resíduos de hidrocarbonetos ramificados (BINDER, 2010). Esses aminoácidos são sintetizados em todas as partes das plantas. Em cada órgão, essa biossíntese parece ocorrer principalmente no tecido jovem. A via biossintética de aminoácidos de cadeia ramificada é única no sentido de que um conjunto de quatro enzimas realiza reações em vias paralelas usando diferentes substratos (SINGH; SHANER, 1995). Essas enzimas são a aceto-hidroxiácido sintetase (AHAS) ou acetolactato sintase (ALS), a cetol ácido reduto isomerase (KARI), a dihidroxi ácido desidratase (DHAD) e a aminoácidos de cadeia ramificada aminotransferase (BCAT) (SINGH; SHANER, 1995; BINDER, 2010).

Na via que produz valina e leucina, a enzima ALS catalisa a condensação de duas moléculas de piruvato para produzir acetolactato. Seguindo na via da valina, a produção da leucina ramifica-se em outra via contendo quatro passos a partir do α -cetoisovalerato, que é o último intermediário para formar a valina. Na via que produz a isoleucina, a ALS (aqui chamada aceto-hidroxiácido sintetase - AHAS) catalisa a condensação de piruvato e 2-oxobutirato (2-cetobutirato) para produzir 2-aceto-2-hidroxiabutirato (SINGH; SHANER, 1995; MCCOURT et al., 2005; BINDER, 2010).

A pesquisa na via de síntese de aminoácidos de cadeia ramificada foi estimulada com a descoberta no início dos anos 80 de que a inibição da ALS é o mecanismo de ação de duas classes de herbicidas altamente ativas e de sucesso comercial, as imidazolinonas e as sulfonilureias (SINGH; SHANER, 1995). Outras classes de compostos que inibem a ALS foram descobertas desde então. Existem seis classes de herbicidas inibidores da enzima ALS: sulfonilureias, imidazolinonas, triazolpirimidinas (subdivididas em tipo 1 e tipo 2), pirimidinil benzoatos, triazolinonas e sulfonanilidas. O grupo das sulfonilureias é o grupo que tem mais herbicidas (HRAC, 2022).

Segundo Zhou et al. (2007) a interrupção do suprimento dos aminoácidos de cadeia ramificada com consequente diminuição da síntese de proteínas é em parte responsável pelo efeito desses herbicidas nas plantas. Foram também implicados outros efeitos como o acúmulo de 2-cetobutirato, a interrupção da translocação de fotoassimilados e a inibição da mitose.

Estes herbicidas têm alta eficácia no controle de várias espécies de plantas daninhas, baixas doses recomendadas; baixa toxicidade aos mamíferos e seletividade a várias culturas. Por esse motivo seu uso foi amplamente adotado (MONQUERO, 1999).

Porém, segundo Heap (2022), existem 170 espécies de plantas daninhas resistentes aos herbicidas inibidores da ALS, sendo que 52 dessas espécies possuem resistência múltipla.

Herbicidas inibidores da ALS são considerados de alto risco para a resistência (SHAW; WESLEY, 1993; MOSS; PERRYMAN; TATNELL, 2007). Diversos fatores contribuem com a elevada ocorrência de espécies de plantas daninhas resistentes a esses herbicidas. De acordo com Borgato (2018), o alto residual desses herbicidas aumenta a pressão de seleção e a alta eficácia seleciona indivíduos resistentes. Além disso, há elevado nível de resistência e ausência de custo adaptativo decorrente da resistência à inibidores da ALS. Outro fator relacionado com o número

de casos de resistência à ALS é a elevada frequência inicial de biótipos resistentes numa população de plantas daninhas e os alelos que conferem a resistência à inibidores da ALS são dominantes. O gene que codifica a ALS é nuclear e os alelos de resistência são dispersos tanto por sementes quanto por grãos-de-pólen. Além disso, diversas são as mutações na sequência de aminoácidos que constituem a ALS capazes de conferir resistência a esses herbicidas.

Dentro do grupo das sulfonilureias, estão os herbicidas Classic® (clorimuron etílico) e Curavial® (sulfometurom-metílico). O clorimuron etílico é registrado no Brasil em vários produtos comerciais e, quando está como ingrediente ativo isolado, é indicado basicamente para o controle de plantas daninhas dicotiledôneas (BRASIL, 2003). Esse herbicida é utilizado como alternativa de manejo para o controle de plantas daninhas resistentes ao glifosato em pós-emergência (MACHINESKI et al., 2019) e em dessecação pré-plantio (BRESSANIN et al., 2014). O sulfometurom-metílico é registrado no Brasil de forma isolada como maturador para a cultura da cana-de-açúcar e como herbicida em mistura com diurom e hexazinona (BRASIL, 2003). Porém, esse ingrediente ativo é registrado em outros países isoladamente como herbicida para plantas daninhas dicotiledôneas e monocotiledôneas anuais de fácil controle e para plantas daninhas monocotiledôneas anuais e perenes de difícil controle. Dessa forma, existe na mistura entre clorimuron etílico e sulfometurom-metílico a possibilidade de aumentar o espectro de ação do tratamento herbicida.

Na enzima ALS, a ligação desses herbicidas fica no final de um túnel hidrofóbico fundo. A sensibilidade dessa enzima a diferentes sulfonilureias varia substancialmente assim como o efeito das mutações nesse túnel. Por exemplo, as constantes de inibição da ALS de leveduras variam de 3,25 nM para o clorimuron etílico (CE) até 127 nM para o chlorsulfuron (CS). Além disso, a mutação G116S na ALS de leveduras aumenta a constante de inibição para o CE em mais de 1000 vezes enquanto para o CS o aumento é menor do que 5 vezes. Essas observações sugerem que as interações com a enzima devem diferir entre as várias sulfonilureias (MCCOURT et al., 2005).

Assim, o objetivo desse experimento foi estudar a interação da mistura de clorimuron etílico e sulfometurom-metílico aplicados na forma de produto comercial. Para isso, foram feitos bioensaios com a planta *Lemna minuta* e isobogramas em comparação ao ADM.

4.2. Material e Métodos

Para a realização dos experimentos, foram usados clones de *Lemna minuta* criados em laboratório do Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da FMC, em Paulínia – SP. A criação e preparação das macrófitas para os experimentos foram realizadas como explicado no capítulo 2.1.2.

Os experimentos foram realizados no mesmo ambiente onde as macrófitas foram criadas: câmaras de crescimento Conviron® com fotoperíodo de 12h, luminosidade de 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luz ao nível da borda superior das placas, luz branca fluorescente CW MASTER TL5 HO 54W/840 e 24 °C de temperatura média. Porém, para os experimentos utilizaram-se placas transparentes de polimetilmetacrilato para cultivo de células de 24 poços e volume de 3 cm^3 .

Cada poço foi considerado uma unidade experimental. No dia do experimento, para cada poço, foi selecionada 1 planta com duas frondes e com área das frondes semelhantes. As plantas foram acondicionadas inicialmente nos poços com 1 mL de meio Steinberg modificado. Após todas as plantas serem acondicionadas nas unidades experimentais, os diferentes tratamentos herbicidas foram aplicados utilizando pipeta com o volume de 1 mL com concentração tal que resultasse na concentração final desejada por tratamento no volume final de 2 mL/poço. Assim, não houve nenhum contato com as plantas após a aplicação do herbicida. Logo após a aplicação herbicida, foi tirada

uma foto de cada bandeja com o objetivo de se medir a área inicial de cada planta. As placas foram acondicionadas em negatoscópio com iluminação fluorescente branca ligado em ambiente com cortinas escuras para evitar a entrada de luz e com todas as outras luzes artificiais do ambiente apagadas. A câmera fotográfica utilizada foi da marca GoPro modelo Hero 7 com controle remoto. A câmera foi montada em suporte de modo a ficar sempre na mesma altura, acima das placas. Para a medição da área inicial e final, foi utilizado o software ImageJ (RUEDEN et al., 2017).

Após 7 dias, as plantas foram fotografadas novamente no mesmo ambiente e condições das fotos iniciais. Desse modo, é possível estimar a diferença de área foliar com sua medida inicial e final. A variável resposta utilizada nesse experimento foi o crescimento de área foliar relativo (Crescimento Relativo) calculado pela Equação 9.

Os herbicidas utilizados foram Curavial® (sulfometurom-metílico) (Lote: 032-17-0700) e Classic® (clorimuron etílico) (Lote: 067-17-5500).

Com o objetivo de se testar a mistura dos dois herbicidas assumindo ADM e usando isobogramas, os experimentos de mistura foram realizados no delineamento clássico de misturas binárias em diferentes proporções (CEDERGREEN et al., 2007a). As diferentes proporções consistiram em curvas de dose-resposta dos dois herbicidas aplicados individualmente e em curvas de dose-resposta dos herbicidas misturados em proporções pré-definidas. As misturas foram calculadas com o objetivo de se obter uma contribuição virtual (curvas equipotentes) de cada herbicida da mistura nas seguintes proporções 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100, sendo 100:0 e 0:100 os dois herbicidas aplicados isoladamente. Para ajustar as doses de modo a conseguir assíntotas mínimas próximas entre as curvas dos dois herbicidas isolados e para definir a concentração de cada herbicida necessária na mistura para se obter as contribuições virtuais desejadas, foram realizados experimentos de dose-resposta prévios, com os herbicidas isolados, seguindo a mesma metodologia. Foram consideradas as ED50 de 0,296e-3 ppm para sulfometurom-metílico e 0,106e-3 ppm para clorimuron etílico.

Tabela 6. Distribuição das doses para as curvas de dose-resposta dos herbicidas sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em 3 misturas de diferentes proporções, Paulínia – SP.

sulfometurom-metílico (ppm)								
Proporção	Diluições							
sulf:clo	1	2	3	4	5	6	7	8
100:0	0,08936	0,01787	3,574e-3	0,714e-3	0,142e-3	0,285e-6	0,571e-7	0,114e-7
75:25	0,06702	0,01340	2,68e-3	0,536e-3	0,107e-3	0,214e-4	0,428e-5	0,857e-6
50:50	0,04468	0,00893	0,00178	0,357e-3	0,714e-4	0,142e-4	0,286e-5	0,572e-6
25:75	0,02233	0,00446	0,00089	0,178e-3	0,357e-4	0,714e-5	0,142e-5	0,285e-6
0:100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
clorimuron etílico (ppm)								
Proporção	Diluições							
sulf:clo	1	2	3	4	5	6	7	8
100:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
75:25	0,008	0,0016	0,32e-3	0,64e-4	0,128e-4	0,256e-5	0,512e-6	0,1024e-6
50:50	0,016	0,0032	0,00064	0,128e-3	0,256e-4	0,512e-5	0,1024e-5	0,2048e-6
25:75	0,024	0,0048	0,96e-3	0,192e-3	0,384e-4	0,768e-5	0,1536e-5	0,3072e-6
0:100	0,032	0,0064	0,00128	0,256e-3	0,512e-4	0,1024e-4	0,2048e-5	0,4096e-6

Para se obter as diferentes diluições de cada dose-resposta, foi feita uma solução inicial com concentração definida para cada proporção e essa solução foi diluída com fator 5 para gerar os diferentes tratamentos (8 doses). As doses utilizadas encontram-se na Tabela 6.

Cada tratamento teve 3 repetições com exceção da testemunha, comum a todas as misturas, que teve 24 repetições. O delineamento experimental considerado foi o inteiramente casualizado. Os experimentos foram realizados duas vezes (março de 2021 e setembro de 2021).

As curvas de todas as misturas foram ajustadas simultaneamente (KESHTKAR; KUDSK; MESGARAN, 2021). Para testar o ajuste das curvas foi feito um teste para falta de ajuste e foram realizados testes para similaridades entre os parâmetros b e c da Equação 4 para checar a possibilidade de redução do modelo.

O ajustes das isoboles para ADM, Hewlett (1969) e Vølund (1992) foram testados segundo o proposto por Sørensen et al. (2007).

4.3. Resultados e Discussão

O herbicida de referência usado nessa mistura foi o clorimuron etílico e os parâmetros das curvas dos herbicidas aplicados isoladamente (Figura 11) estão na Tabela 7. O ED50 encontrado para o clorimuron etílico teve uma variação de 1,3 a 2,9 vezes o esperado inicialmente. O ED50 encontrado para o sulfometurom-metílico teve uma variação de 0,6 a 1,8 vezes o esperado inicialmente. Essa diferença não impactou significativamente a distribuição dos pontos na isobole (Figuras 13 e 14). O modelo usado para traçar as isoboles foi o modelo levando em conta a análise de todas as curvas de dose-resposta ao mesmo tempo (KESHTKAR; KUDSK; MESGARAN, 2021). As curvas de dose-resposta dos herbicidas aplicados isoladamente, analisadas com as mesmas restrições aplicadas à análise conjunta de todas as curvas, foram usadas para calcular a taxa de conversão entre os herbicidas. Desse modo, podem ocorrer pequenas variações nos parâmetros das curvas dos herbicidas aplicados isoladamente e do ajuste conjunto (Tabela 7 e Tabela 8).

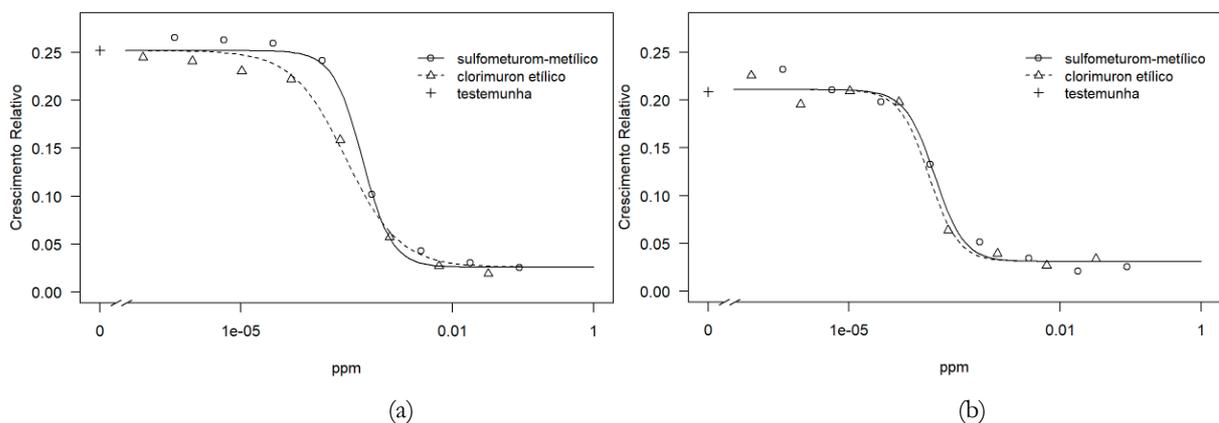


Figura 11. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas sulfometurom-metílico e clorimuron etílico, em formulação comercial, aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

Tabela 7. Parâmetros das curvas de dose-resposta para sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo) em formulação comercial aplicados isoladamente, Paulínia – SP.

Herbicidas	b ^a	c	d	e [ppm]
Experimento a				
sulf	2,09 (0,52) ^b	0,025 (0,51e-2)	0,25 (2,38e-3)	0,526e-3 (5,5e-5)
clo	1,14 (0,18)			0,310e-3 (4,5e-5)
Experimento b				
sulf	2,08 (0,53)	0,031 (0,50e-2)	0,21 (3,30e-3)	0,164e-3 (2,4e-5)
clo				0,135e-3 (2,2e-5)

^aPara o modelo Log-logístico de 4 parâmetros, *b* é a declividade da curva ao redor de *e*, *c* é a assíntota inferior da curva, *d* é a assíntota superior da curva, *e* é a dose correspondente à resposta no ponto de inflexão. ^bValores entre parênteses correspondem ao erro padrão dos coeficientes.

Tabela 8. Parâmetros das curvas de dose-resposta de dois experimentos (a) e (b) para sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo) em formulação comercial em três misturas de diferentes proporções (25:75, 50:50, 75:25) e isolados (0:100, 100:0), Paulínia – SP.

Herbicidas	b ^a	c	d	e [ppm]	p-valor ^d
Experimento a					
sulf:clo					
0:100	1,11 (0,17) ^b			0,338e-3 (4,7e-5)	
25:75	1,60 (0,30)			0,252e-3 (2,7e-5)	
50:50	1,02 (0,16)	0,02 (3e-3)	0,25 (2,3e-3)	0,165e-3 (2,41e-5)	0,30
75:25	0,95 (0,13)			0,0836e-3 (1,3e-5)	
100:0	2,01 (0,51)			0,196e-3 (1,9e-5)	
Experimento b					
sulf:clo					
0:100				0,140e-3 (2,1e-5)	
25:75				0,0971e-3 (1,6e-5)	
50:50	2,00 ^c (0,31)	0,02 (3e-3)	0,21 (2,5e-3)	0,0638e-3 (8,8e-6)	0,67
75:25				0,0602e-3 (7,8e-6)	
100:0				0,0613e-3 (8,7e-6)	

^aPara o modelo Log-logístico de 4 parâmetros, *b* é a declividade da curva ao redor de *e*, *c* é a assíntota inferior da curva, *d* é a assíntota superior da curva, *e* é a dose correspondente à resposta no ponto de inflexão. ^bValores entre parênteses correspondem ao erro padrão dos coeficientes. ^cOnde há o mesmo valor para todas as curvas significa que houve ajuste com esse parâmetro fixo. ^dp-valor do teste para falta de ajuste das curvas ajustadas simultaneamente.

Em alguns experimentos a possibilidade de se obter um limite diferente de zero para doses altas não pode ser excluída. Assim, um limite inferior é introduzido ao modelo. Considerando que a assíntota superior é a mesma para todas as curvas, pois elas compartilham a mesma testemunha, é necessário notar, entretanto, que os valores de ED50 para as diferentes misturas são somente comparáveis, isso é, resultam em mesmo efeito, se as assíntotas e inferiores forem as mesmas (mas não necessariamente iguais a zero) para todas as misturas (SØRENSEN et al., 2007).

Mesmo nas maiores doses utilizadas, as macrófitas ainda tiveram um pouco de crescimento de área das frondes. Desse modo, esse crescimento foi considerado como a assíntota inferior das curvas e o modelo log-logístico de 4 parâmetros não pôde ser reduzido ao modelo de 3 parâmetros (Tabela 8). Para o experimento (a), as curvas não foram consideradas paralelas. A mistura na maior proporção em potência de sulfometurom-metílico teve menor inclinação e resultou em menor ED50 em relação às outras curvas. Para o experimento (b), as curvas foram

consideradas paralelas (Tabela 8, Figura 12). Levando em conta essas restrições, o teste para falta de ajuste das curvas para o experimento (a) (p -valor = 0,30) e para o experimento (b) (p -valor = 0,67) foram não significativos.

Na Figura 12, observa-se que a curva para o clorimuron etílico ficou deslocada para a direita das outras curvas ao redor do ponto de ED50 para os dois experimentos. No experimento (a), as curvas das misturas 75:25 e 50:50 sulf:clo ficaram deslocadas à esquerda das duas curvas dos herbicidas aplicados isoladamente. No experimento (b), as curvas das misturas ficaram entre as curvas dos herbicidas aplicados isoladamente.

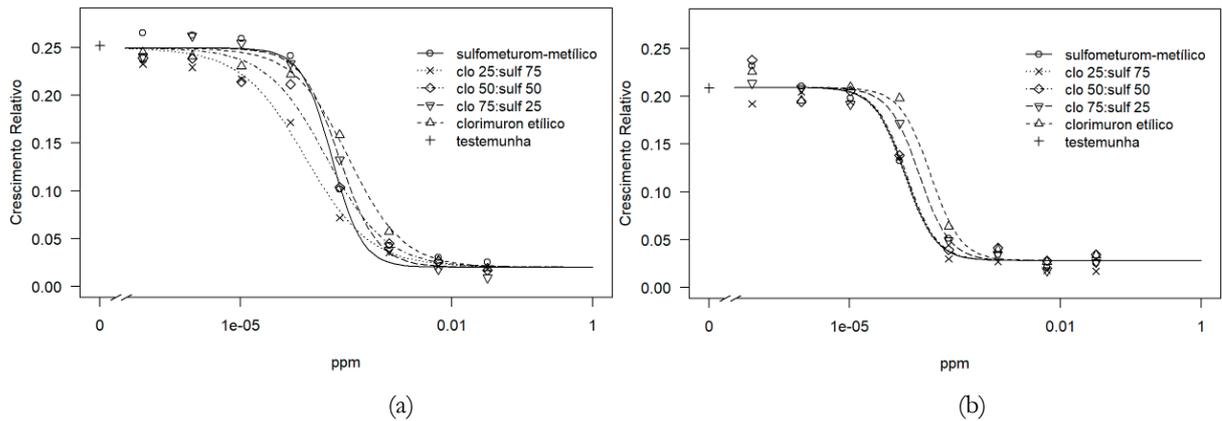


Figura 12. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de sulf e clo. Paulínia – SP.

A isobole considerando ADM está ilustrada na Figura 13. A hipótese para o modelo aditivo (Equação 3) foi rejeitada para o experimento (a) (p -valor < 0,01) e ficou na região limítrofe para o experimento (b) (p -valor = 0,052). Nos dois experimentos, os pontos das misturas ficaram na região abaixo da linha teórica de aditividade.

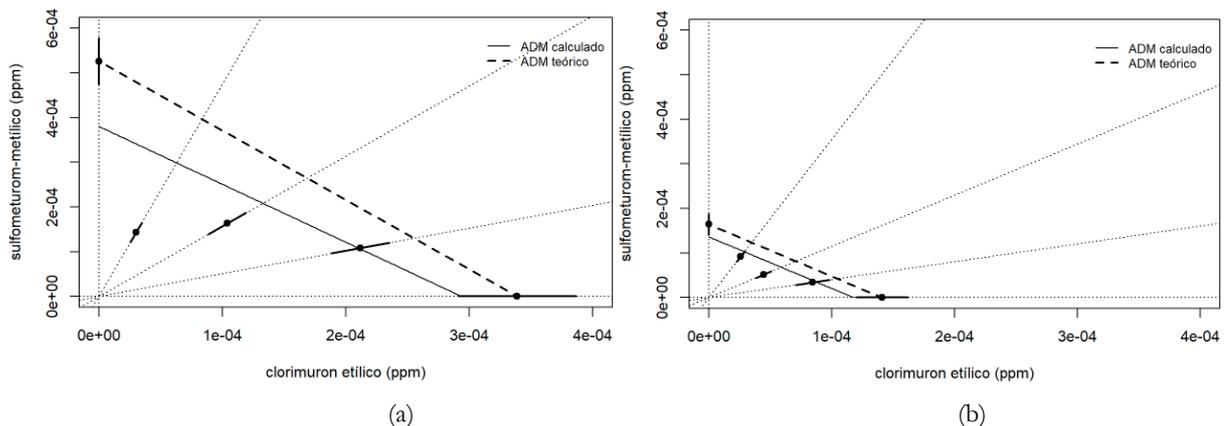


Figura 13. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de sulf e clo. ADM calculado (linha contínua) é a isobole segundo o modelo ADM levando em conta todos os pontos para traçar a isobole. ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

Nas Figuras 13 e 14, os dois experimentos são apresentados na mesma escala para demonstrar a variabilidade encontrada. A ED50 para clorimuron etílico variou em 2,18 vezes para os dois experimentos e para sulfometurom-metílico variou em 3,02 vezes. Essa variação está dentro da encontrada por outros autores em

experimentos semelhantes. Os autores Cedergreen et al. (2007a) em experimento para testar a variabilidade e repetibilidade de experimentos de misturas binárias utilizando *Lemna minor* como bioindicador e crescimento relativo em área como resposta, encontraram valores de ED50 que variavam entre 1,5 vezes para glifosato; 2,57 vezes para mesotriona; 2,09 vezes para mecoprop e 3,15 vezes para terbutilazina. Esses autores consideraram que a repetibilidade dos experimentos foi baixa, mas consideraram as *Lemna* como um sistema teste de menor variabilidade quando comparado com plantas em vaso.

A variável resposta crescimento relativo em área, medida através de análise de imagens, é uma resposta não subjetiva e por isso demonstra a real variabilidade nos dados. A utilização de sistemas teste como *Lemna* permite fazer mais experimentos em um menor espaço e permite fazer experimentos mais rápidos, porém não elimina a necessidade de se repetir os experimentos (CEDERGREEN et al., 2007a).

A isobole considerando a Equação 7 também foi rejeitada para o experimento (a) (p -valor $< 0,01$; $\lambda = 1,79 \pm 0,18$). Apesar dessa isobole ter um melhor ajuste, quando comparada com a isobole segundo ADM, pois conseguiu se aproximar mais da maioria dos pontos no isobolograma, a mistura 75:25 sulfometurom-metílico:clorimuron etílico ficou mais abaixo da linha de aditividade teórica quando comparada com as outras misturas. Para o experimento (b), o modelo de Hewlett (1969) não foi rejeitado (p -valor = 0,60; $\lambda = 1,53 \pm 0,19$) (Figura 14), indicando sinergismo.

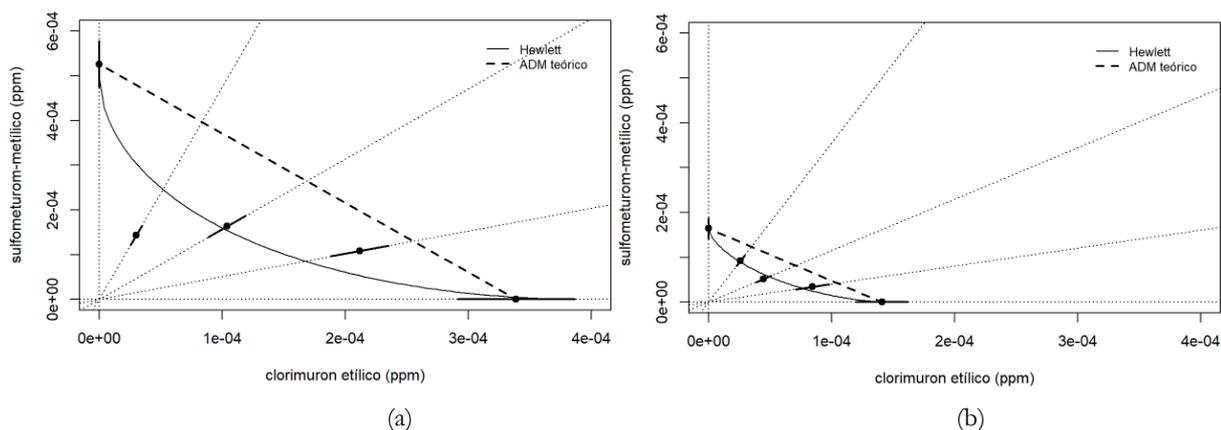


Figura 14. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas sulfometurom-metílico (sulf) e clorimuron etílico (clo), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de sulf e clo. Hewlett (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Hewlett (1969). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

O modelo assimétrico de Vølund (1992) não teve ajuste para nenhum dos experimentos. No experimento (a) houve assimetria, mas de maneira muito alta para apenas uma mistura. No experimento (b), caso fosse ajustado, o modelo de Vølund (1992) provavelmente não iria agregar muita informação em comparação ao ajuste do modelo de Hewlett (1969).

Os autores Sørensen et al. (2007) consideram que raramente há justificativa biológica para usar modelos muito complexos para determinar as interações sinérgicas ou antagônicas e que os parâmetros desses modelos são raramente reproduzíveis, mas o mesmo não ocorre para a distribuição dos pontos na mistura que podem apresentar um padrão.

O conceito de testar a forma das isoboles, ou seja, se λ é significativamente diferente de 1, mostra claramente que uma evidência sólida de sinergismo e/ou antagonismo requer a precisa determinação do ED50. Isso significa que os experimentos devem ser repetidos várias vezes e de forma independente para ilustrar desvios do ADM

de forma convincente. Além disso, os experimentos podem incluir mais proporções pois tornam a determinação das isoboles mais confiáveis, desde que estejam distribuídos uniformemente ao longo do isobograma (KAUSHIK et al., 2006).

Se for considerado o modelo Hewlett para ambos os experimentos, a mistura de sulfometurom-metílico e clorimuron etílico necessitaria de aproximadamente 0,6 vezes a dose em comparação ao ADM para obter 50% de efeito para o experimento (a) e 0,7 vezes para o experimento (b). Ou seja, em comparação à hipótese de uma mistura na qual os efeitos dos herbicidas na mistura seriam iguais aos efeitos dos herbicidas isolados, com o efeito observado da mistura, poderia ocorrer uma redução de 40% ou 30% da dose para se obter o mesmo efeito esperado. Porém, o ajuste para o experimento (a) ficou comprometido pela mistura 75:25 sulfometurom-metílico:clorimuron etílico.

Segundo Barbieri et al. (2022), é comum encontrar interação sinérgica entre os herbicidas inibidores da ALS, citando relatos de interação sinérgica de imazapir ou imazapic com imazaquim ou imazetapir. Entretanto, segundo os mesmos autores, a combinação entre dois herbicidas inibidores da ALS também pode resultar em antagonismo.

A mistura de duas sulfonilureias já foi usada como produto comercial. Segundo Moss, Perryman e Tatnell (2007), a mistura das sulfonilureias mesosulfurom + iodossulfurom foi um produto introduzido no mercado europeu em 2002 e essa mistura era altamente efetiva no controle de plantas daninhas monocotiledôneas. Porém, populações de *Alopecurus myosuroides* resistentes a esse herbicida já foram encontradas em 2004.

Os pesquisadores Kaushik et al. (2006) estudaram o efeito da mistura de outras duas sulfonilureias, chlorsulfurom e metsulfurom-metílico, aplicadas em pré-emergência, usando arroz (*Oryza sativa* L.) como bioindicador. Os resultados mostraram que essa mistura seguiu o modelo aditivo.

Porém, Paris Junior (2018) encontrou efeito antagônico da mistura de sulfometurom-metílico e clorimuron etílico aplicados como produtos comerciais em pré-emergência de *Digitaria insularis*, em substrato, tendo ajustes com $\lambda = 0,33 \pm 0,21$ para o modelo de Hewlett (1969) e $\eta_1 = 0,71 \pm 0,28$ não significativo e $\eta_2 = 7,2 \pm 3,68$ para o modelo de Vølund (1992). Para os dois modelos de referência, isso corresponde a necessidade de aumento de aproximadamente 60% da dose da mistura para se obter o efeito esperado pelo ADM. Entretanto, só foi realizada uma repetição do experimento dada a quantidade de vasos necessários para se testar somente a mistura de dois herbicidas em um alvo.

Para herbicidas aplicados em pré-emergência, há grande influência do meio no resultado do herbicida sobre a planta daninha e diferenças nas propriedades físico-químicas dos herbicidas ajudam a explicar sua interação com o meio e o resultado. Os dois herbicidas testados no presente experimento são considerados ácidos fracos, moderadamente móveis (Koc de 85 mL g⁻¹ para sulfometurom-metílico e 106 mL g⁻¹ para clorimuron etílico), com coeficiente de partição octanol-água baixo mas possuem diferença de solubilidade, sendo considerada alta para o clorimuron etílico (1200 mg L⁻¹) e moderada para o sulfometurom-metílico (70 mg L⁻¹) (LEWIS et al., 2016)

No presente experimento, possíveis efeitos da interação do herbicida com o meio são mais controlados, senão inexistentes, já que não existe solo para interagir com os herbicidas, somente o meio líquido nutritivo para as plantas.

4.4. Conclusão

Para o experimento (a), não houve bom ajuste para o modelo ADM nem para o modelo de Hewlett (1969) pois uma das misturas (75:25 sulfometurom-metílico:clorimuron etílico) se distanciou muito da linha de aditividade. Porém, os pontos referentes a todas as misturas ficaram abaixo da linha de aditividade teórica.

Para o experimento (b), não houve ajuste para o modelo ADM, mas houve ajuste para o modelo de Hewlett (1969) com o valor de $\lambda = 1,53 \pm 0,19$, indicando sinergismo.

Mesmo sem ter um bom ajuste para o experimento (a), o padrão dos pontos no isobolograma e o ajuste do experimento (b) comprovam o sinergismo encontrado entre a mistura de sulfometurom-metílico e clorimuron etílico para *Lemna minuta* para a variável resposta crescimento relativo em área de frondes. Desse modo, para se obter o resultado esperado segundo o ADM, a mistura poderia ser aplicada com redução de dose em 30% a 40%.

Referências

- BARBIERI, G. F.; YOUNG, B. G.; DAYAN, F. E.; STREIBIG, J. C.; TAKANO, H. K.; MEROTTO, A.; AVILA, L. A. Herbicide mixtures: interactions and modeling. **Advances in Weed Science**, v. 40, n. spe1, p. 1–25, 2022.
- BINDER, S. Branched-Chain Amino Acid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. **The Arabidopsis Book**, v. 8, n. 8, p. 1–14, 2010.
- BORGATO, E. A. **Identificação de *Amaranthus palmeri*, caracterização da resistência múltipla aos herbicidas inibidores da ALS e da EPSPS e controle químico baseado no uso das novas tecnologias transgênicas**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BRASIL. **Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 12 out. 2022.
- BRESSANIN, F. N.; JAYME NETO, N.; MARTINS, J. F.; MARTINS, J. V. F.; ALVES, P. L. D. C. A. Controle de biótipos resistentes de *Conyza bonariensis* com glyphosate + clorimuron-etílico em função do estágio de desenvolvimento. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 13, n. 1, p. 68–72, 2014.
- CEDERGREEN, N.; KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K.; SØRENSEN, H.; STREIBIG, J. C. Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 149, 2007.
- HEAP, I. **The International Herbicide-Resistant Weed Database**. Disponível em: <www.weedscience.org>. Acesso em: 18 out. 2022.
- HEWLETT, P. S. Measurement of the Potencies of Drug Mixtures. **Biometrics**, v. 25, n. 3, p. 477, 1969.
- HRAC. **HRAC Mode of Action Classification 2022**. Disponível em: <<https://hracglobal.com/tools/hrac-mode-of-action-classification-2022-map>>. Acesso em: 23 out. 2022.
- KAUSHIK, S.; INDERJIT; STREIBIG, J. C.; CEDERGREEN, N. Activities of mixtures of soil-applied herbicides with different molecular targets. **Pest Management Science**, v. 62, n. 11, p. 1092–1097, 2006.
- KESHTKAR, E.; KUDSK, P.; MESGARAN, M. B. Perspective: common errors in dose–response analysis and how to avoid them. **Pest Management Science**, v. 77, n. 6, p. 2599–2608, 2021.
- LEWIS, K. A.; TZILIVAKIS, J.; WARNER, D. J.; GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 22, n. 4, p. 1050–1064, 2016.
- MACHINESKI, G. S.; DALAZEN, G.; VICTOLA, C. A. G.; COLOMBO, L. A.; BIDOIA, F. L. Viabilidade técnica e econômica da adição de inibidores da ACCase e da ALS ao glyphosate no controle de plantas daninhas e no rendimento de grãos da soja. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 18, n. 3, p. 1–10, 2019.
- MCCOURT, J. A.; PANG, S. S.; GUDDAT, L. W.; DUGGLEBY, R. G. Elucidating the Specificity of Binding of Sulfonylurea Herbicides to Acetohydroxyacid Synthase. **Biochemistry**, v. 44, n. 7, p. 2330–2338, 2005.

- MONQUERO, P. A. **Biologia, manejo e caracterização bioquímica e genética de biótipos resistentes aos herbicidas inibidores da acetolactato sintase**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MOSS, S. R.; PERRYMAN, S. A. M.; TATNELL, L. V. Managing Herbicide-resistant Blackgrass (*Alopecurus myosuroides*): Theory and Practice. **Weed Technology**, v. 21, n. 2, p. 300–309, 2007.
- PARIS JUNIOR, M. A. **Curvas de dose resposta e isobologramas como forma de descrever a associação dos inibidores da ALS (sulfometuron-methyl e chlorimuron-ethyl) em *Digitaria insularis* (L.) Fedde**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- RUEDEN, C. T.; SCHINDELIN, J.; HINER, M. C.; DEZONIA, B. E.; WALTER, A. E.; ARENA, E. T.; ELICEIRI, K. W. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 529, 2017.
- SHAW, D. R.; WESLEY, M. T. Interacting Effects on Absorption and Translocation from Tank Mixtures of ALS-Inhibiting and Diphenylether Herbicides. **Weed Technology**, v. 7, p. 693–698, 1993.
- SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Biosynthesis of Branched Chain Amino Acids: From Test Tube to Field. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 935, 1995.
- SØRENSEN, H.; CEDERGREEN, N.; SKOVGAARD, I. M.; STREIBIG, J. C. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. **Environmental and Ecological Statistics**, v. 14, n. 4, p. 383–397, 2007.
- VØLUND, A. Dose response surface bioassay. In: XVth Biometric Conference, vol II, **Anais...**1992.
- ZHOU, Q.; LIU, W.; ZHANG, Y.; LIU, K. K. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 2, p. 89–96, 2007.

5. TESTES PARA DETECÇÃO DE ADITIVIDADE, SINERGISMO OU ANTAGONISMO EM MISTURAS DE ATRAZINA E MESOTRIONA, AMBOS EM FORMULAÇÃO COMERCIAL E COMO PRODUTOS TÉCNICOS, USANDO ISOBOLOGRAMAS E *Lemna minuta* COMO BIOINDICADOR

Resumo

Na literatura sobre misturas de herbicidas, a interação entre atrazina e mesotriona tem destaque como uma das misturas que mais apresentam consistência em gerar respostas sinérgicas em diferentes alvos e situações. Por isso, essa mistura pode ser considerada uma referência no estudo de metodologias de identificação e análise de novas misturas. Além disso, poder comparar os resultados da mesma mistura entre produtos comerciais e produtos técnicos possibilita maior embasamento nas conclusões. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da mistura dos herbicidas atrazina e mesotriona aplicados como produtos comerciais Proof® e Callisto® e como produtos técnicos usando como bioindicador clones de macrófitas da espécie *Lemna minuta* e crescimento relativo em área como variável resposta, tomando como base o modelo aditivo (ADM) e usando isobologramas. Para a elaboração dos isobologramas, para os produtos comerciais e técnicos, foram feitos dois experimentos (a) e (b) no delineamento clássico de misturas binárias em diferentes proporções. As misturas consistiram em curvas de dose-resposta dos dois herbicidas aplicados individualmente e em proporções pré-definidas tal que cada herbicida tenha as seguintes contribuições em potência na mistura 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100, sendo 100:0 e 0:100 os dois herbicidas aplicados isoladamente. As isoboles foram comparadas com o ADM e com modelos que permitem testar a distribuição dos pontos no isobograma de forma simétrica e assimétrica em relação à linha de aditividade. O efeito da formulação dos herbicidas foi observado pela maior potência relativa entre os produtos comerciais em comparação aos produtos técnicos. Ambos os ingredientes ativos demonstraram maior poder herbicida quando em formulação comercial. Considerando os experimentos com produtos comerciais, ambos os experimentos (a) e (b) resultaram em efeito aditivo, com todos os pontos dispostos próximos à linha teórica de aditividade. Para os experimentos com produtos técnicos, no experimento (a), uma das misturas (50:50 atrazina tec.:mesotriona tec.) se deslocou para a região de antagonismo, porém os coeficientes de Hewlett (1969) foram não significativos, indicando efeito aditivo. Para o experimento (b), os coeficientes de Hewlett (1969) foram próximos de 1, também indicando efeito aditivo da mistura. Conclui-se que não foi observado sinergismo entre os herbicidas atrazina e mesotriona como produtos comerciais ou como produtos técnicos, usando o crescimento relativo em área de *Lemna minuta* como indicador. As misturas tiveram um comportamento aditivo. Supõe-se que a capacidade de dissipação não fotoquímica de energia no fotossistema II das *Lemna* pode ter contribuído para esse resultado.

Palavras-chave: 1. Modelo Aditivo 2. Fotossistema II 3. 4-HPPD 4. Bioensaio 5. Isobole

Abstract

In the herbicide mixtures literature, the interaction between atrazine and mesotrione is one of the mixtures that show the most consistency in generating synergistic responses in different targets and situations. Therefore, this mixture can be considered a reference in the study of methodologies for identifying and analyzing new mixtures. In addition, being able to compare the results of the same mixture between commercial products and technical products provides a better basis for conclusions. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of the mixture of atrazine and mesotrione herbicides applied as commercial products Proof® and Callisto® and as technical products, using clones of macrophytes of the species *Lemna minuta* as a bioindicator and relative growth in area as endpoint, based on the additive model (ADM) and using isobolograms. To create the isobolograms, for both commercial and technical products, two experiments were carried out (a) and (b) in the classic design of binary mixtures in different proportions. The mixtures consisted of dose-response curves of the two

herbicidas aplicados individualmente e em proporções predefinidas de modo que cada herbicida tenha as seguintes contribuições de potência na mistura 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100, com 100:0 e 0:100 sendo os dois herbicidas aplicados individualmente. As isobolas foram comparadas com o ADM e com modelos que permitem testar a distribuição de pontos no isobograma simetricamente e assimetricamente em relação à linha de aditividade. O efeito da formulação de herbicidas foi observado pela maior potência relativa entre os produtos comerciais quando comparados com os produtos técnicos. Ambos os ingredientes ativos mostraram maior atividade herbicida quando em uma formulação comercial. Considerando os experimentos com produtos comerciais, ambos os experimentos (a) e (b) resultaram em um efeito aditivo, com todos os pontos da mistura estando próximos à linha teórica de aditividade. Para os experimentos com produtos técnicos, no experimento (a), uma das misturas (50:50 atrazina tec.:mesotrione tec.) ficou na área de antagonismo, porém os coeficientes de Hewlett's (1969) não foram significativos, indicando efeito aditivo. Para o experimento (b), os coeficientes de Hewlett's (1969) foram próximos a 1, também indicando efeito aditivo da mistura. Em conclusão, não foi observado sinergismo entre os herbicidas atrazina e mesotrione em produtos comerciais ou em produtos técnicos, usando o crescimento relativo na área de *Lemna minuta* como indicador. As misturas apresentaram comportamento aditivo. É hipotetizado que a capacidade de quenching fotoquímico no sistema II de fotossíntese de *Lemna* pode ter contribuído para este resultado.

Keywords: 1. Additive Dose Model 2. Photosystem II 3. 4-HPPD 4. Bioassay 5. Isobole

5.1. Introdução

A fotossíntese é o único processo de importância biológica que pode colher a energia derivada do sol. O termo fotossíntese significa literalmente “síntese usando luz”. Mais especificamente, a energia luminosa impulsiona a síntese de carboidratos a partir do dióxido de carbono e da água, com a geração de oxigênio. Organismos fotossintetizantes usam energia solar para sintetizar compostos orgânicos que não podem ser formados sem o uso de energia. A conversão da energia solar em energia química de compostos orgânicos é um processo complexo que inclui o transporte de elétrons e o metabolismo de carbono. O processo geral da fotossíntese é uma reação de redução química, na qual elétrons são removidos de uma espécie química, oxidando-a, e são adicionados a outra espécie química, reduzindo-a. A planta usa energia solar para oxidar a água, liberando oxigênio, e para reduzir o dióxido de carbono, formando grandes compostos orgânicos, principalmente açúcares. A energia guardada nessas moléculas pode ser usada mais tarde para sustentar processos celulares na planta e pode servir como fonte de energia para todas as formas de vida (TAIZ; ZEIGER, 2002).

Nos cloroplastos, a energia do sol é primeiramente absorvida pelos pigmentos da planta, como clorofilas e carotenoides, em um chamado sistema de antena, pois capta a luz solar. O sistema de captação de luz chamado fotossistema II (FSII) realiza duas funções essenciais, mas conflitantes: a coleta eficiente de energia luminosa para a fotossíntese e a dissipação regulada da energia de excitação em excesso desse sistema. Por um lado, a coleta eficiente de luz solar é necessária para fornecer energia de excitação ao centro de reação fotossintética em quantidade suficiente para conduzir o transporte de elétrons em grande volume e de forma sustentável. Por outro lado, estados excitados da clorofila e a presença de oxigênio molecular fornecem um coquetel potencialmente letal que pode danificar irreversivelmente as proteínas, lipídios e pigmentos da membrana fotossintética. Para combater isso, existem características constitutivas do fotossistema como a presença de carotenoides (HORTON, 2004).

Os carotenoides são chamados pigmentos acessórios pois servem como pigmentos de antena e agentes fotoprotetores, pois eles também desempenham papéis importantes na proteção do aparato fotossintético de reações prejudiciais dos estados excitados da clorofila (clorofila tripleto) e do oxigênio (oxigênio singleto). Essa é uma das principais funções biológicas dos carotenoides (TAIZ; ZEIGER, 2002; FRANK; BRUDVIG, 2004; DOMONKOS et al., 2013).

O FSII está presente fisicamente nas membranas dos cloroplastos chamadas de tilacoides. Ali, nas reações dependentes de luz da fotossíntese, os elétrons extraídos da reação de oxidação da água são transferidos a compostos orgânicos carregadores de elétrons, chamados plastoquinonas. Os carregadores de elétrons primários e secundários são chamados de plastoquinonas QA e QB, respectivamente (YADAV et al., 2014). Além disso, as plastoquinonas são componentes essenciais na síntese de carotenoides (NORRIS; BARRETTE; DELLAPENNA, 1995).

Os herbicidas inibidores do FSII agem na inibição da fotossíntese pelo bloqueio do transporte de elétrons no FSII. Eles competem com a plastoquinona no seu sítio de ligação na proteína D1 dentro do complexo do FSII. A inibição do transporte de elétrons interrompe a produção de NADPH e ATP e o ciclo de redução de carbono, levando à falta de carboidratos e estresse oxidativo (POWLES; YU, 2010).

Herbicidas inibidores do FSII têm muitas classes químicas estruturalmente distintas, incluindo triazinas, triazinonas, uracilas, ureias, fenilcarbamatos, amidas, nitrilas e outros compostos sem uma classe química definida (HRAC, 2022). A atrazina, um herbicida da classe das triazinas, é o herbicida inibidor do FSII mais proeminente, com décadas de uso global em plantações de milho (HUAN et al., 2011).

A biossíntese de pigmentos fotossintéticos, carotenoides e clorofilas, é vital para as plantas daninhas e as interrupções em sua biossíntese têm sido usadas para selecionar moléculas como herbicidas. Como os inibidores da biossíntese de pigmentos causam um efeito de branqueamento característico após a aplicação, eles geralmente são classificados como herbicidas de branqueamento, descoloração, albinismo ou como herbicidas inibidores da biossíntese de carotenoides. Esses herbicidas geralmente têm baixa toxicidade para mamíferos e têm atraído interesse crescente de químicos (ZHANG et al., 2021).

Os herbicidas inibidores da biossíntese de carotenoides são divididos em quatro grupos com diferentes mecanismos de ação, sendo eles os herbicidas Inibidores da PDS, Inibidores da HPPD, Inibidores da Licopeno Ciclase e Inibidores da DOXP sintetase (HRAC, 2022).

Novos mecanismos de ação de herbicidas comerciais são raros, com os herbicidas inibidores da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD), sendo herbicidas relativamente novos (LU et al., 2020). Dentro desse mecanismo de ação existem os grupos químicos das tricetonas e pirazois (HRAC, 2022).

Herbicidas que inibem a enzima 4-hidroxifenil-piruvato dioxigenase (4-HPPD) agem na rota metabólica da biossíntese de plastoquinona, necessária na biossíntese de carotenoides. Esses herbicidas tornaram-se amplamente e globalmente usados devido ao seu amplo espectro de controle de plantas daninhas, baixas taxas de aplicação, seletividade de culturas e baixa toxicidade. 4-HPPD é componente da rota bioquímica que converte tirosina em plastoquinona (PQ) e tocoferol. Tocoferol é um antioxidante protetor de membranas e a PQ não é apenas um transportador de elétrons na fotossíntese, mas um cofator na biossíntese de carotenoides. Quando a HPPD é inibida, os níveis de tocoferol e PQ diminuem e há acúmulo de fitoeno, levando à diminuição de carotenoides e ao branqueamento das folhas e morte da planta (MITCHELL et al., 2001; LU et al., 2020).

A mesotriona é um herbicida inibidor da 4-HPPD, do grupo das tricetonas, seletivo ao milho e usado em pré e pós-emergência de plantas daninhas de folha larga e gramíneas (MITCHELL et al., 2001).

Herbicidas em formulações comerciais são usados na maioria dos estudos presentes na literatura de misturas. Isso é, claro, de interesse ao usuário final e ao fabricante, mas os produtos das formulações irão inevitavelmente obscurecer o efeito conjunto dos herbicidas isoladamente. Fisiologicamente é extremamente difícil senão impossível de separar o efeito dos constituintes da formulação dos herbicidas puros (STREIBIG; JENSEN, 2000).

Assim, o objetivo desse experimento foi estudar a interação da mistura de atrazina e mesotriona aplicados na forma de produto comercial e como produtos técnicos. Para isso, foram feitos bioensaios com a planta *Lemna minuta* e isobogramas em comparação ao ADM.

5.2. Material e Métodos

Para a realização dos experimentos, foram usados clones de *Lemna minuta* criados em laboratório do Centro de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da FMC, em Paulínia – SP. A criação e preparação das macrófitas para os experimentos foram realizadas como explicado no capítulo 2.1.2.

Os experimentos foram realizados no mesmo ambiente onde as macrófitas foram criadas: câmaras de crescimento Conviron® com fotoperíodo de 12h, luminosidade de 90 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ de luz ao nível da borda superior das placas, luz branca fluorescente CW MASTER TL5 HO 54W/840 e 24 °C de temperatura média. Porém, para os experimentos utilizaram-se placas transparentes de polimetilmetacrilato para cultivo de células de 24 poços e volume de 3 cm^3 .

Cada poço foi considerado uma unidade experimental. No dia do experimento, para cada poço, foi selecionada 1 planta com duas frondes e com área das frondes semelhantes. As plantas foram acondicionadas inicialmente nos poços com 1 mL de meio Steinberg modificado. Após todas as plantas serem acondicionadas nas unidades experimentais, os diferentes tratamentos herbicidas foram aplicados utilizando pipeta com o volume de 1 mL com concentração tal que resultasse na concentração final desejada por tratamento no volume final de 2 mL/poço. Assim, não houve nenhum contato com as plantas após a aplicação do herbicida. Logo após a aplicação herbicida, foi tirada uma foto de cada bandeja com o objetivo de se medir a área inicial de cada planta. As placas foram acondicionadas em negatoscópio com iluminação fluorescente branca ligado em ambiente com cortinas escuras para evitar a entrada de luz e com todas as outras luzes artificiais do ambiente apagadas. A câmera fotográfica utilizada foi da marca GoPro modelo Hero 7 com controle remoto. A câmera foi montada em suporte de modo a ficar sempre na mesma altura, acima das placas. Para a medição da área inicial e final, foi utilizado o software ImageJ (RUE DEN et al., 2017).

Após 7 dias, as plantas foram fotografadas novamente no mesmo ambiente e condições das fotos iniciais. Desse modo, é possível estimar a diferença de área foliar com sua medida inicial e final. A variável resposta utilizada nesse experimento foi o crescimento de área foliar relativo (Crescimento Relativo) calculado pela Equação 9.

Foram realizados experimentos para a mistura de atrazina e mesotriona utilizando produtos comerciais e produtos técnicos. Os herbicidas utilizados como produtos comerciais foram Proof® (atrazina) (Lote: 0237-20-21600) e Callisto® (mesotriona) (Lote: 0038-20-19000). Os produtos técnicos foram atrazina 97% e mesotriona 98% (Shandong Chemical Lote: 001-17-10).

Com o objetivo de se testar a mistura dos dois herbicidas assumindo ADM e usando isobogramas, os experimentos de mistura foram realizados no delineamento clássico de misturas binárias em diferentes proporções (CEDERGREEN et al., 2007a). As diferentes proporções consistiram em curvas de dose-resposta dos dois herbicidas aplicados individualmente e em curvas de dose-resposta dos herbicidas misturados em proporções pré-definidas. As misturas foram calculadas com o objetivo de se obter uma contribuição virtual (curvas equipotentes) de cada herbicida da mistura nas seguintes proporções 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100, sendo 100:0 e 0:100 os dois herbicidas aplicados isoladamente. Para ajustar as doses de modo a conseguir assíntotas mínimas próximas entre as curvas dos dois herbicidas isolados e para definir a concentração de cada herbicida necessária na mistura para se obter as contribuições virtuais desejadas, foram realizados experimentos de dose-resposta prévios, com os herbicidas isolados, seguindo a

mesma metodologia, para os produtos em formulação comercial e para os produtos técnicos. Foram consideradas as ED50 de 0,18 ppm para atrazina e 0,018 ppm para mesotriona como produtos comerciais e ED50 de 0,2 ppm para atrazina e 0,065 ppm para mesotriona como produtos técnicos.

Para se obter as diferentes diluições de cada dose-resposta, foi feita uma solução inicial com concentração definida para cada proporção e essa solução foi diluída com fator 5 para gerar os diferentes tratamentos (7 doses) para os produtos comerciais e com fator 10 para gerar os diferentes tratamentos (7 doses) para os produtos técnicos. As doses utilizadas encontram-se na Tabela 9 para os produtos comerciais e na Tabela 10 para os produtos técnicos.

A diluição dos produtos técnicos foi feita com acetona de modo a não se obter mais do que 2% de concentração de acetona na solução inicial. Para fazer a solução estoque de atrazina, foi usada a concentração de 40% de acetona e para a solução estoque de mesotriona foi usada a concentração de 25% de acetona.

Cada tratamento teve 3 repetições para os experimentos com produtos comerciais e produtos técnicos. A testemunha, comum a todas as misturas, teve 24 repetições nos experimentos com produtos comerciais. Nos experimentos com produtos técnicos a testemunha teve 12 repetições e foi feito um tratamento a mais com 12 repetições em que se adicionou à solução a maior concentração (2%) do solvente Acetona nos tratamentos. O delineamento experimental considerado foi o inteiramente casualizado. Os experimentos foram realizados duas vezes (junho e julho de 2021 para os produtos comerciais e maio e junho de 2022 para os produtos técnicos).

Para os experimentos com produtos comerciais e produtos técnicos, as curvas de todas as misturas foram ajustadas simultaneamente (KESHTKAR; KUDSK; MESGARAN, 2021). Para testar o ajuste das curvas foi feito um teste para falta de ajuste e foram realizados testes para similaridades entre os parâmetros b e c da Equação 4 para checar a possibilidade de redução do modelo.

O ajustes das isoboles para ADM, Hewlett (1969) e Vølund (1992) foram testados segundo o proposto por Sørensen et al. (2007).

Tabela 9. Distribuição das doses para as curvas de dose-resposta dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em 3 misturas de diferentes proporções, Paulínia – SP.

atrazina (ppm)							
Proporção	Diluições						
atra:meso	1	2	3	4	5	6	7
100:0	5	1	0,2	0,04	0,008	0,0016	0,00032
75:25	3,75	0,75	0,15	0,03	0,006	0,0012	0,00024
50:50	2,5	0,5	0,1	0,02	0,004	0,0008	0,00016
25:75	1,25	0,25	0,05	0,01	0,002	0,0004	0,00008
0:100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
mesotriona (ppm)							
Proporção	Diluições						
atra:meso	1	2	3	4	5	6	7
100:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
75:25	0,125	0,025	0,005	0,001	0,0002	0,00004	0,000008
50:50	0,25	0,05	0,01	0,002	0,0004	0,00008	0,000016
25:75	0,375	0,075	0,015	0,003	0,0006	0,00012	0,000024
0:100	0,5	0,1	0,02	0,004	0,0008	0,00016	0,000032

Tabela 10. Distribuição das doses para as curvas de dose-resposta dos herbicidas como produtos técnicos atrazina (atra tec.) e mesotriona (meso tec.), aplicados isoladamente e em 3 misturas de diferentes proporções, Paulínia – SP.

atrazina tec. (ppm)							
Proporção	Diluições						
atra tec.:meso tec.	1	2	3	4	5	6	7
100:0	52,20	5,22	0,52	0,052	0,0052	0,00052	0,52e-4
75:25	39,15	3,91	0,39	0,039	0,0039	0,00039	0,39e-4
50:50	26,1	2,61	0,26	0,026	0,0026	0,00026	0,26e-4
25:75	13,05	1,305	0,13	0,013	0,0013	0,00013	0,13e-4
0:100	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
mesotriona tec. (ppm)							
Proporção	Diluições						
atra tec.:meso tec.	1	2	3	4	5	6	7
100:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
75:25	4,24	0,42	0,04	0,004	0,0004	0,00004	0,04e-4
50:50	8,48	0,84	0,08	0,008	0,0008	0,00008	0,08e-4
25:75	12,72	1,27	0,12	0,012	0,0012	0,00012	0,12e-4
0:100	16,96	1,69	0,169	0,016	0,0016	0,00016	0,16e-4

5.3. Resultados e Discussão

O herbicida de referência usado na mistura com os produtos comerciais foi o Proof[®] (atrazina) e os parâmetros das curvas dos herbicidas aplicados isoladamente (Figura 15) estão na Tabela 11. O ED50 encontrado para a atrazina teve uma variação de 1,1 a 1,2 vezes o esperado inicialmente. O ED50 encontrado para a mesotriona teve uma variação de 1,2 a 1,6 vezes o esperado inicialmente. Essa diferença não impactou significativamente a distribuição dos pontos na isobole (Figuras 17, 18 e 19). O modelo usado para traçar as isoboles foi o modelo levando em conta a análise de todas as curvas de dose-resposta ao mesmo tempo (KESHITKAR; KUDSK; MESGARAN, 2021). As curvas de dose-resposta dos herbicidas aplicados isoladamente, analisadas com as mesmas restrições aplicadas à análise conjunta de todas as curvas, foram usadas para calcular a taxa de conversão entre os herbicidas. Desse modo, podem ocorrer pequenas variações nos parâmetros das curvas dos herbicidas aplicados isoladamente e do ajuste conjunto (Tabela 11 e Tabela 12).

Pelo que pode ser observado na Figura 15 e Figura 16, para o experimento (a), foi possível considerar a assíntota inferior como zero com a redução do modelo log-logístico de quatro parâmetros para o modelo log-logístico de 3 parâmetros. Para o experimento (b), considerou-se a assíntota inferior diferente de zero (Tabela 11, Tabela 12), pois as maiores doses do herbicida mesotriona resultaram em pouco crescimento.

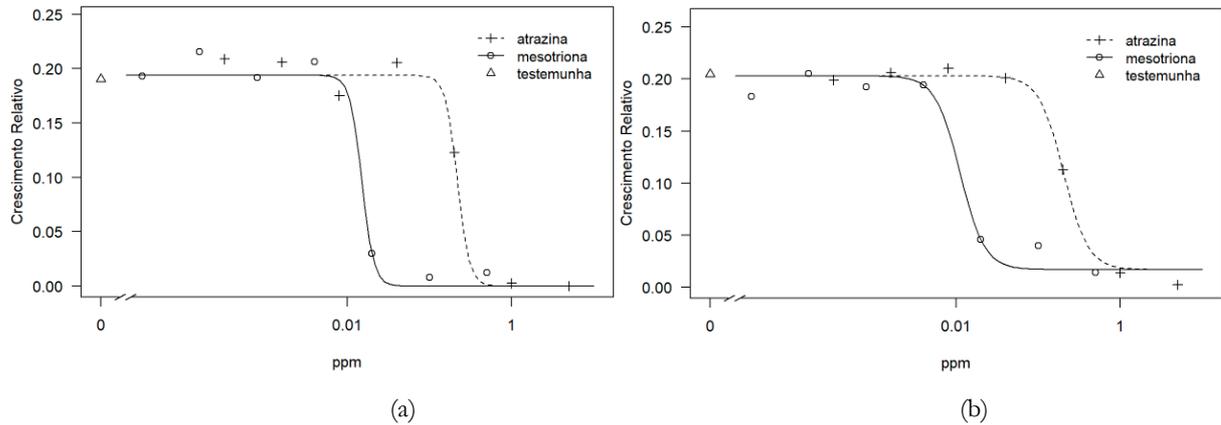


Figura 15. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina e mesotriona, em formulação comercial, aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

Tabela 11. Parâmetros das curvas de dose-resposta para atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente, Paulínia – SP.

Herbicidas	b ^a	c	d	e [ppm]
Experimento a				
atra		- ^c	0,19 (0,003)	0,22 (0,03)
meso	5,95 (0,8) ^b			0,015 (0,006)
Experimento b				
atra		0,017 (0,006)	0,20 (0,02)	0,20 (0,02)
meso	2,9 (0,99)			0,011 (0,002)

^aPara o modelo Log-logístico de 4 parâmetros, *b* é a declividade da curva ao redor de *e*, *c* é a assíntota inferior da curva, *d* é a assíntota superior da curva, *e* é a dose correspondente à resposta no ponto de inflexão. ^bValores entre parênteses correspondem ao erro padrão dos coeficientes. ^cQuando o parâmetro *c* está ausente, o modelo Log-logístico de 4 parâmetros pôde ser reduzido ao modelo de 3 parâmetros.

Com relação à inclinação, as curvas do experimento (a) tiveram maior inclinação do que as curvas do experimento (b), porém as inclinações foram consideradas iguais dentro de cada experimento, indicando que a redução no crescimento relativo das *Lemna* se deu na mesma proporção com o aumento da dose para ambos os herbicidas. Consideradas essas restrições, as curvas tiveram um bom ajuste pelo teste para a falta de ajuste (p-valor = 0,79 para o experimento (a) e p-valor = 0,15 para o experimento (b)) (Tabela 12).

Nas curvas de dose-resposta para as misturas, na Figura 16, observa-se que a curva para a mesotriona isoladamente ficou à esquerda das curvas das misturas e da atrazina isoladamente. O mesmo ocorreu nos experimentos (a) e (b).

Na Figura 17 está a isobole dada pelo modelo aditivo. A hipótese para o modelo aditivo não foi rejeitada para o experimento (a) (p-valor = 0,707) e para o experimento (b) (p-valor = 0,329). Em ambos os experimentos, os pontos referentes às misturas ficaram distribuídos próximos à linha teórica de aditividade, sendo que para o experimento (a) todas as misturas tocam na linha teórica de aditividade e no modelo ADM ajustado. Para o experimento (b), a maior parte dos pontos também toca as duas linhas (ADM teórico e calculado) com exceção das misturas 50:50 e 75:25 atrazina:mesotriona que ficaram próximas, mas acima da linha teórica de aditividade, e da mistura 50:50 atrazina:mesotriona, que ficou um pouco acima do ajuste do modelo ADM.

Tabela 12. Parâmetros das curvas de dose-resposta de dois experimentos (a) e (b) para atrazina (atra) e mesotriona (meso) em formulação comercial em três misturas de diferentes proporções (25:75, 50:50, 75:25) e isolados (0:100, 100:0), Paulínia – SP.

Herbicidas	b ^a	c	d	e [ppm]	p-valor ^e
Experimento a					
atra:meso					
0:100				0,136 (0,05)	
25:75				0,136 (0,05)	
50:50	4,4 (0,43) ^b	- ^d	0,195 (0,002)	0,170 (0,03)	0,79
75:25				0,190 (0,014)	
100:0				0,225 (0,03)	
Experimento b					
atra:meso					
0:100				0,125 (0,05)	
25:75				0,139 (0,03)	
50:50	3,55 ^c (0,25)	0,014 (0,004)	0,204 (0,003)	0,191 (0,017)	0,15
75:25				0,212 (0,02)	
100:0				0,204 (0,017)	

^aPara o modelo Log-logístico de 4 parâmetros, b é a declividade da curva ao redor de e , c é a assíntota inferior da curva, d é a assíntota superior da curva, e é a dose correspondente à resposta no ponto de inflexão. ^bValores entre parênteses correspondem ao erro padrão dos coeficientes. ^cOnde há o mesmo valor para todas as curvas significa que houve ajuste com esse parâmetro fixo. ^dQuando o parâmetro c está ausente, o modelo Log-logístico de 4 parâmetros pôde ser reduzido ao modelo de 3 parâmetros. ^ep-valor do teste para falta de ajuste das curvas ajustadas simultaneamente.

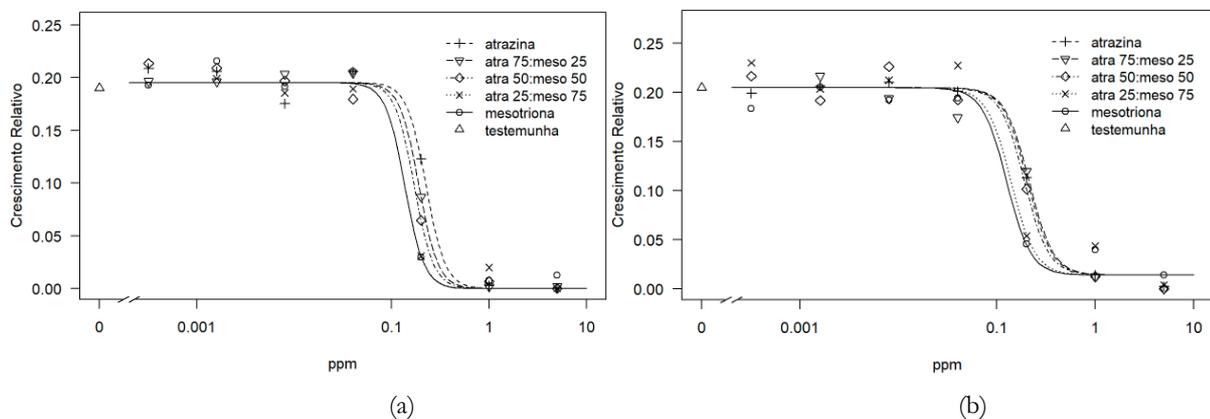


Figura 16. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. Paulínia – SP.

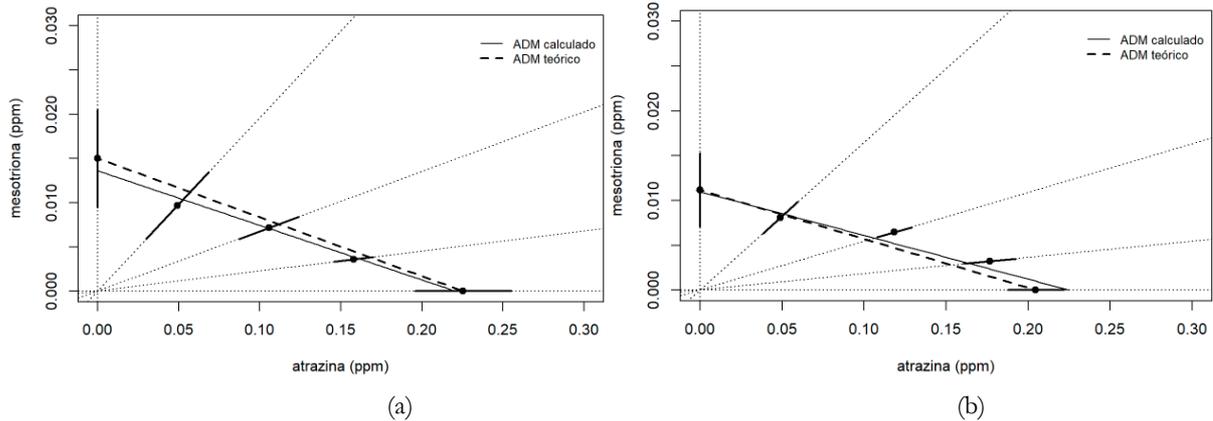


Figura 17. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. ADM calculado (linha contínua) é a isobole segundo o modelo ADM levando em conta todos os pontos para traçar a isobole. ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

A isobole considerando o modelo de Hewlett (1969) (Equação 7) também não foi rejeitada para o experimento (a) (p -valor = 0,734; $\lambda = 1,05 \pm 0,15$) e para o experimento (b) (p -valor = 0,624; $\lambda = 0,68 \pm 0,22$). Porém, essas isoboles têm pior ajuste quando comparadas às isoboles segundo o ADM, principalmente com relação à posição da mesotriona isoladamente no eixo y do isobograma (Figura 18).

A isobole considerando o modelo assimétrico de Vølund (1992) (Figura 19) também não foi rejeitada para o experimento (a) (p -valor = 0,254) e para o experimento (b) (p -valor = 0,492). Porém, os parâmetros de interação (η_1 e η_2) foram não significativos em ambos os experimentos. Apesar de ter um ajuste, a assimetria do modelo de Vølund (1992) fica demasiadamente em destaque na proximidade do eixo x representado pela atrazina aplicada isoladamente, entretanto não há dados para suportar essa mudança, o que também justifica que esse não foi o melhor modelo para descrever os dados.

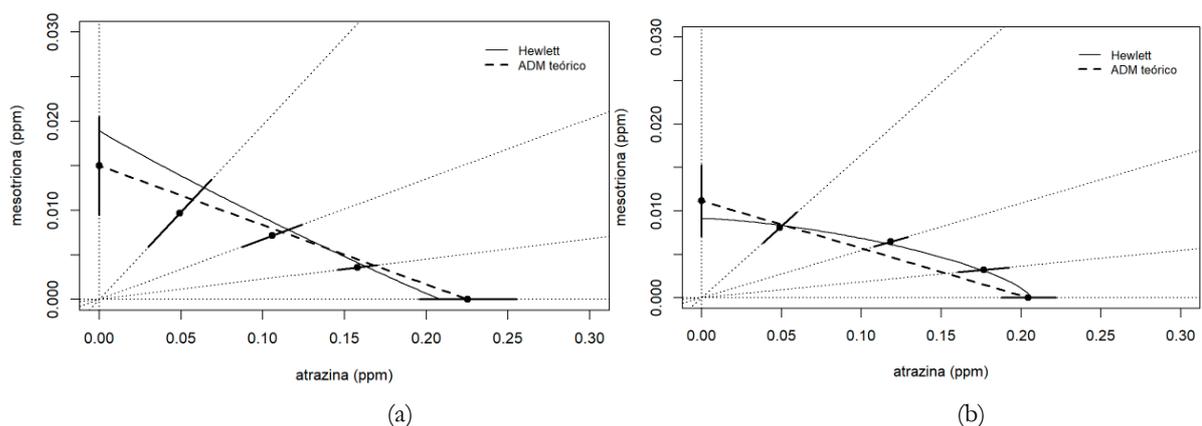


Figura 18. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. Hewlett (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Hewlett (1969). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

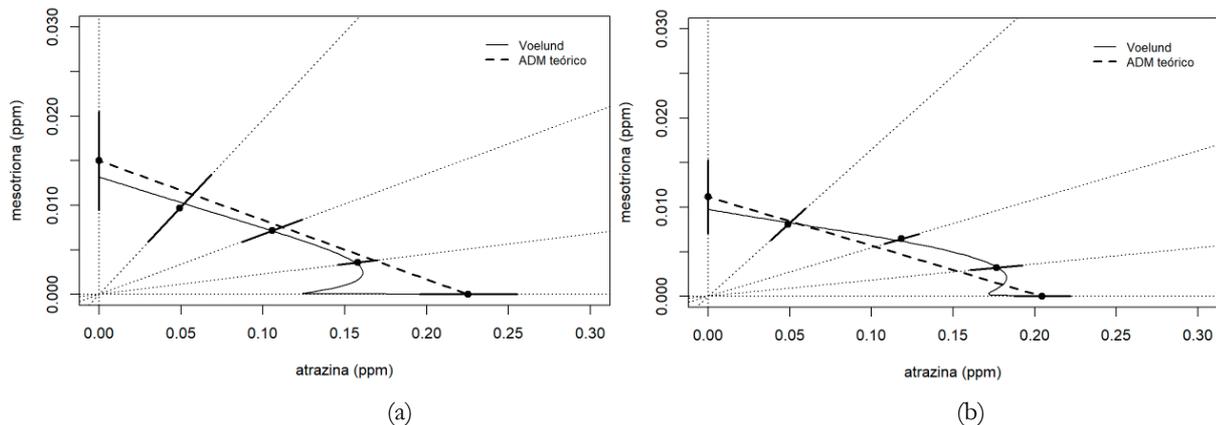


Figura 19. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), em formulação comercial, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. Voelund (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Voelund (1992). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

Para fazer a diluição dos produtos técnicos, foram testados inicialmente o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) e a acetona. O DMSO foi escolhido a princípio pelo maior potencial de diluição dos ingredientes ativos em comparação com a acetona, porém a atrazina dissolvida em DMSO apresentou coágulos quando em contato com o meio Steinberg modificado. Esse comportamento não ocorreu para a acetona que foi usada, então, como solvente em todos os experimentos com os produtos técnicos. Em testes prévios, constatou-se que a concentração de 2% de acetona, suficiente para proporcionar completa dissolução dos ingredientes ativos nas maiores concentrações que tiveram contato com as macrófitas, não resultou em diminuição do seu crescimento. Na Figura 20 são apresentados os diagramas de caixa dos tratamentos Testemunha (somente meio) e Testemunha com solvente (meio com acetona a 2%). Um teste t de comparação entre esses dois tratamentos não foi significativo ($p = 0,253$), o que não indica necessariamente que esses tratamentos são iguais, mas sim que, se são diferentes, não há evidência suficiente para demonstrar isso.

Nos experimentos com os produtos técnicos, o herbicida de referência foi a atrazina. Os parâmetros das curvas dos herbicidas aplicados isoladamente (Figura 21) estão na Tabela 13. O ED50 encontrado para a atrazina teve uma variação de 1,35 a 2,95 vezes o esperado inicialmente. O ED50 encontrado para a mesotriona teve uma variação de 2,7 a 3,5 vezes o esperado inicialmente. Ou seja, as curvas dos experimentos tiveram menor potência do que o encontrado nos experimentos prévios de ajuste de doses. Embora essas diferenças sejam maiores do que as diferenças encontradas para a atrazina, a razão entre as duas curvas de mesotriona isoladamente para os experimentos (a) e (b) foi de somente 1,27 e os pontos das misturas ficaram bem distribuídos nas isoboles (Figuras 23, 24 e 25). A importância de se ter segurança na potência relativa entre os dois herbicidas aplicados isoladamente se deve ao fato de que todos os cálculos das diferentes quantidades de produto em cada dose dos experimentos com misturas dependem do valor da potência relativa entre os herbicidas.

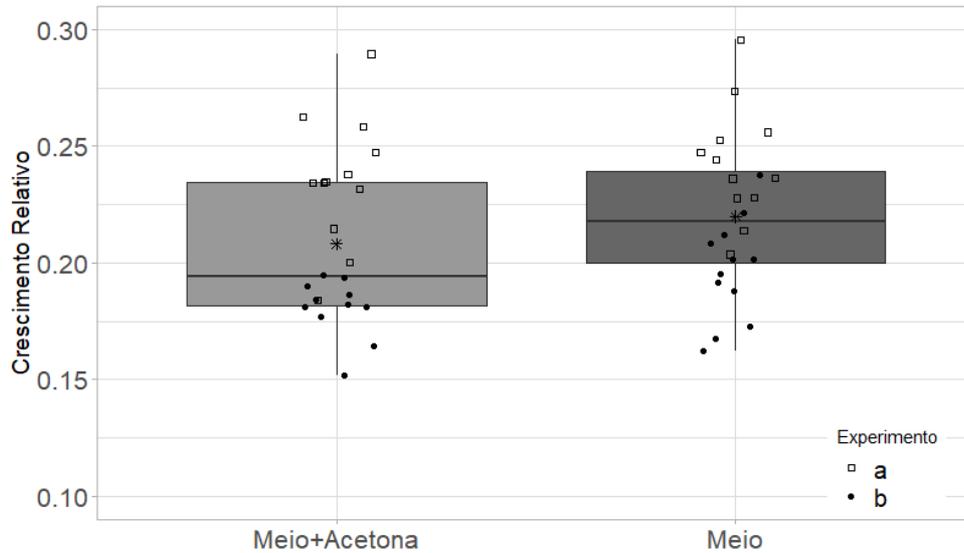


Figura 20. Diagramas de caixa do crescimento relativo aos 7 dias após aplicação para o tratamento Testemunha absoluta (Meio) e o tratamento Testemunha para o solvente (Meio + Acetona a 2%), maior dose de solvente presente nos tratamentos, para dois experimentos (a) e (b). * corresponde à média. “Meio” refere-se ao meio Steinberg modificado. Paulínia – SP.

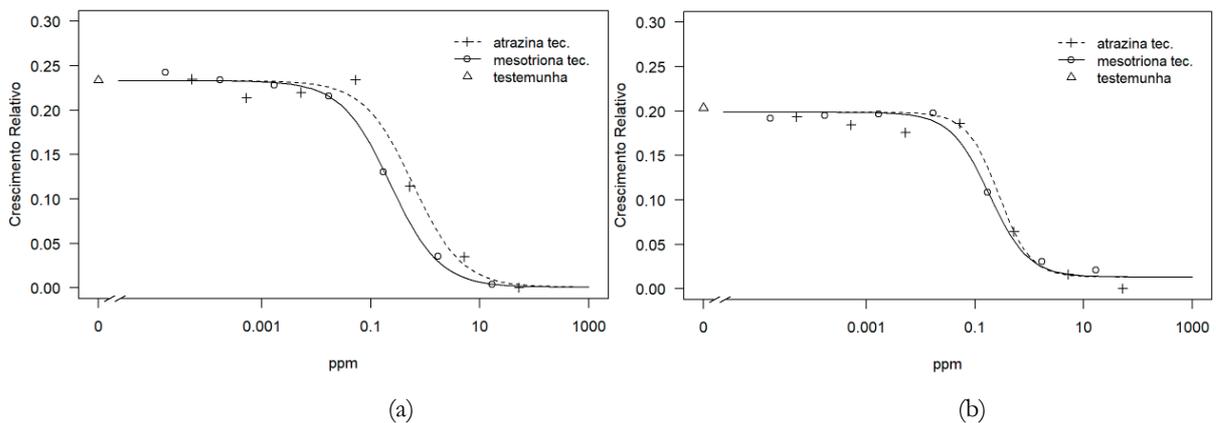


Figura 21. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina e mesotriona, como produtos técnicos, aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

O modelo usado para traçar as isoboles foi o modelo levando em conta a análise de todas as curvas de dose-resposta ao mesmo tempo (KESHTKAR; KUDSK; MESGARAN, 2021). As curvas de dose-resposta dos herbicidas aplicados isoladamente, analisadas com as mesmas restrições aplicadas à análise conjunta de todas as curvas, foram usadas para calcular a taxa de conversão entre os herbicidas. Desse modo, podem ocorrer pequenas variações entre os parâmetros das curvas dos herbicidas aplicados isoladamente e do ajuste conjunto (Tabela 13 e Tabela 14).

Comparando a Figura 15 com a Figura 21, a potência relativa entre os dois herbicidas aplicados isoladamente é maior quando foram usados os produtos comerciais (variando de 14,7 a 18,2) do que quando foram usados os produtos técnicos (variando de 1,5 a 2,6). Além disso, a potência herbicida é maior nos produtos comerciais, principalmente para a mesotriona. A potência foi 1,3 a 2,7 vezes maior para a atrazina e 15,3 a 16,4 vezes maior para a mesotriona, indicando que há efeito da formulação dos produtos na potência herbicida.

Tabela 13. Parâmetros das curvas de dose-resposta para atrazina (atra tec.) e mesotriona (meso tec.) como produtos técnicos aplicados isoladamente, Paulínia – SP.

Herbicidas	b ^a	c	d	e [ppm]
Experimento a				
atra tec.	0,96 (0,2) ^b	<0,001	0,233 (0,003)	0,59 (0,16)
meso tec.				0,23 (0,06)
Experimento b				
atra tec.	1,48 (0,43)	0,013 (0,007)	0,198 (0,003)	0,27 (0,06)
meso tec.	1,21 (0,40)			0,18 (0,04)

^aPara o modelo Log-logístico de 4 parâmetros, *b* é a declividade da curva ao redor de *e*, *c* é a assíntota inferior da curva, *d* é a assíntota superior da curva, *e* é a dose correspondente à resposta no ponto de inflexão. ^bValores entre parênteses correspondem ao erro padrão dos coeficientes.

Em experimentos de misturas de herbicidas inibidores da biossíntese de aminoácidos aplicados como produtos técnicos e produtos formulados, os autores Kudsk e Mathiassen (2004) notaram que, quando presente, o sinergismo foi mais pronunciado nos produtos formulados do que nos produtos técnicos, implicando que o sinergismo foi causado pela presença dos constituintes das formulações comerciais, mesmo considerando que o mecanismo da interação não foi elucidado.

Tabela 14. Parâmetros das curvas de dose-resposta de dois experimentos (a) e (b) para atrazina (atra tec.) e mesotriona (meso tec.) como produtos técnicos em três misturas de diferentes proporções (25:75, 50:50, 75:25) e isolados (0:100, 100:0), Paulínia – SP.

Herbicidas	b ^a	c	d	e [ppm]	p-valor ^d
Experimento a					
atra tec.:meso tec.					
0:100				0,703 (0,17)	
25:75				0,769 (0,20)	
50:50	1,00 (0,14) ^b	0,00	0,231 ^c (0,003)	0,944 (0,21)	0,92
75:25				0,697 (0,16)	
100:0				0,590 (0,14)	
Experimento b					
atra tec.:meso tec.					
0:100	1,07 (0,31)			0,576 (0,14)	
25:75	4,05 (1,04)			0,419 (0,23)	
50:50	2,69 (0,34)	0,01 (0,004)	0,203 (0,002)	0,365 (0,17)	0,46
75:25	4,35 (1,17)			0,440 (0,20)	
100:0	1,32 (0,37)			0,260 (0,06)	

^aPara o modelo Log-logístico de 4 parâmetros, *b* é a declividade da curva ao redor de *e*, *c* é a assíntota inferior da curva, *d* é a assíntota superior da curva, *e* é a dose correspondente à resposta no ponto de inflexão. ^bValores entre parênteses correspondem ao erro padrão dos coeficientes. ^cOnde há o mesmo valor para todas as curvas significa que houve ajuste com esse parâmetro fixo. ^dp-valor do teste para falta de ajuste das curvas ajustadas simultaneamente.

Considerando todas as misturas ao mesmo tempo, o modelo log-logístico de 4 parâmetros não pôde ser reduzido ao modelo de 3 parâmetros, porém, para o experimento (a) a assíntota inferior foi próxima de zero (Tabela 14). No experimento (a), as curvas foram consideradas paralelas (Tabela 14, Figura 22). No experimento (b), as curvas não foram consideradas paralelas, sendo que os herbicidas isoladamente apresentaram o *slope* próximo de 1, semelhante

ao experimento (a), e as misturas apresentaram maiores inclinações. Nesse experimento, a terceira maior dose resultou em maior crescimento para o herbicida mesotriona técnico aplicado isoladamente quando comparado às misturas e ao herbicida atrazina técnico aplicado isoladamente. Além disso, para o herbicida atrazina técnico aplicado isoladamente, a terceira e quarta menores doses resultaram em menores médias de crescimento quando comparadas aos outros tratamentos, o que explica o ajuste de menor *slope* para os herbicidas aplicados isoladamente em comparação às misturas. Dadas essas condições, o teste para a falta de ajuste foi não significativo para o experimento (a) (p -valor = 0,92) e para o experimento (b) (p -valor = 0,46) (Tabela 14).

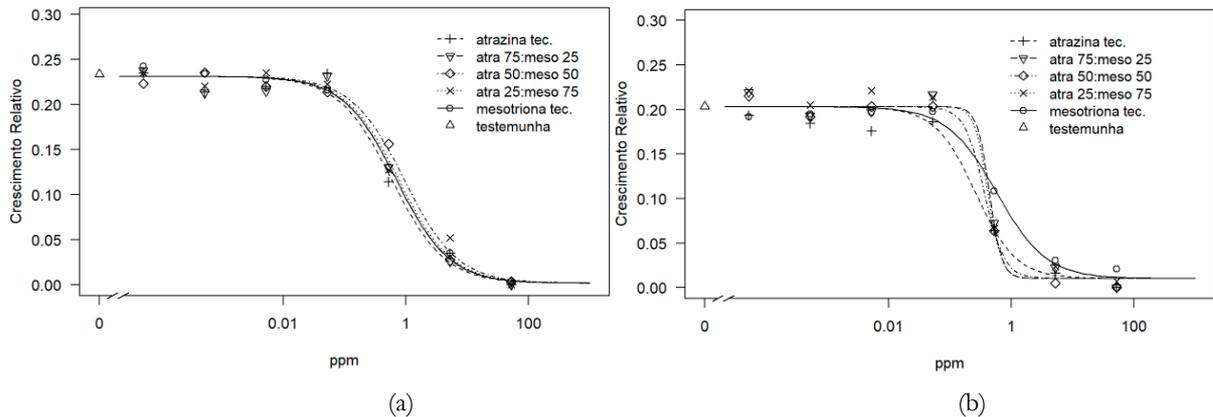


Figura 22. Curvas de dose-resposta para dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), como produtos técnicos, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. Paulínia – SP.

A isobole segundo o modelo ADM (Equação 3) está na Figura 23. O modelo aditivo não foi rejeitado para o experimento (a) (p -valor = 0,53) e para o experimento (b) (p -valor = 0,89). No experimento (a), o ponto referente à mistura 50:50 atrazina tec.:mesotriona tec. ficou deslocado para fora da linha de aditividade na região de antagonismo, sendo a única mistura que não toca a linha teórica de aditividade. Porém, todos os tratamentos estão dentro da isobole ADM ajustada, corroborando o ajuste observado do modelo ADM. Para o experimento (b), todos os tratamentos tocam a isobole teórica de aditividade e a isobole ADM ajustada. Nesse experimento, duas misturas (25:75, 50:50 atrazina tec.:mesotriona tec.) se deslocaram pouco abaixo da isobole ADM na região de sinergismo.

Como pode ser observado na Figura 24, visualmente há um bom ajuste para o modelo de Hewlett (1969) no experimento (a), principalmente porque há um deslocamento para a região de antagonismo na mistura 50:50 atrazina tec.:mesotriona tec. (p -valor = 0,82), entretanto o coeficiente de Hewlett foi não significativo ($\lambda = 0,48 \pm 0,46$). Para o experimento (b), o modelo de Hewlett (1969) (Equação 7) também não foi rejeitado (p -valor = 0,79), porém, apesar de significativo i.e. ser diferente de zero (p -valor = 0,03), o valor do coeficiente de Hewlett foi próximo de 1 ($\lambda = 0,86 \pm 0,4$).

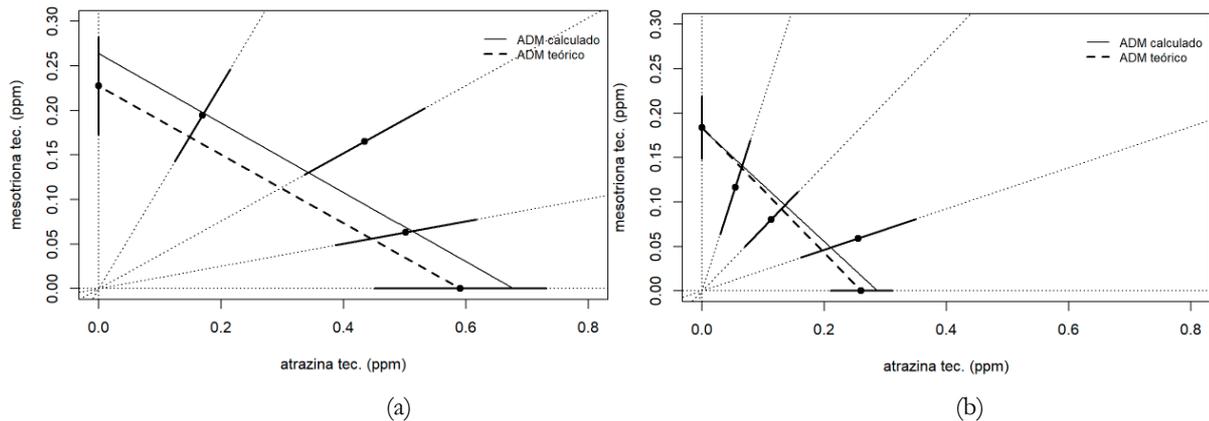


Figura 23. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina tec. (atra) e mesotriona tec. (meso), como produtos técnicos, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. ADM calculado (linha contínua) é a isobole segundo o modelo ADM levando em conta todos os pontos para traçar a isobole. ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

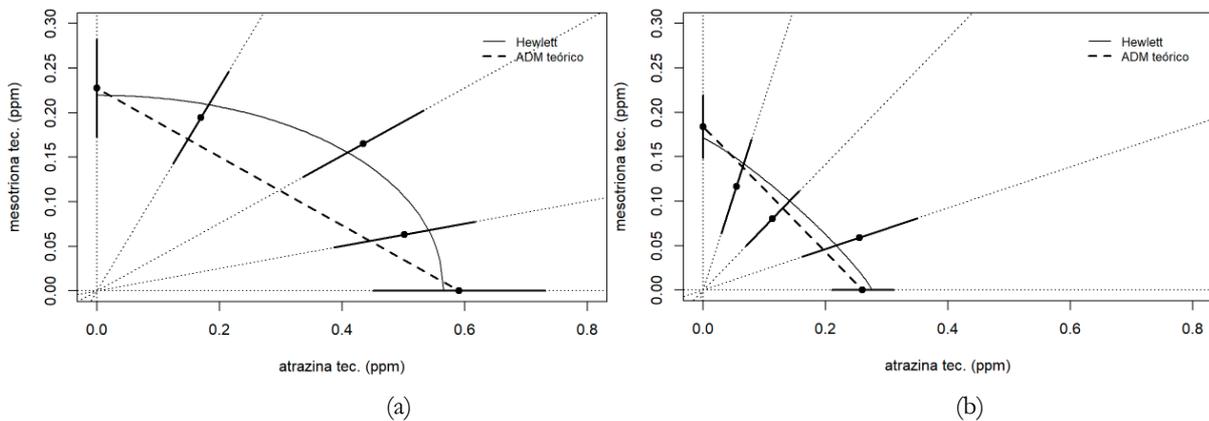


Figura 24. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atra) e mesotriona (meso), como produtos técnicos, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atra e meso. Hewlett (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Hewlett (1969). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

O modelo assimétrico de Vølund (1992) (Figura 25), não foi rejeitado para o experimento (a) (p -valor = 0,52) e para o experimento (b) (p -valor = 0,68). Porém, os parâmetros de interação (η_1 e η_2) foram não significativos (não diferentes de zero) em ambos os experimentos, similar ao observado nos ajustes para o modelo de Hewlett.

Segundo Duke (2022), poucos artigos que afirmam sobre sinergismo provam isso rigorosamente. Porém, talvez uma das interações herbicidas sinérgicas mais reconhecidas e consistentes em pesquisas e aplicações comerciais tenha sido a das misturas de FSII e HPPD (BARBIERI et al., 2022).

Os autores Abendroth, Martin e Roeth (2006) encontraram sinergismo na mistura entre atrazina e mesotriona usando o modelo MSM para girassol em três experimentos de campo, usando os produtos comerciais Callisto (mesotriona) e AAtrex (atrazina). Para *Amaranthus palmeri*, o sinergismo foi observado em um de dois experimentos de campo, para todas as doses testadas. Em um dos experimentos a dose de 280 g ha⁻¹ de atrazina resultou em 93% de necrose enquanto no outro experimento, a mesma dose resultou em 27% de necrose. Quando a dose de um herbicida da mistura isoladamente já confere alta resposta, a observação da interação entre os herbicidas,

se existente, fica comprometida. Para a planta daninha *Abutilon theophrasti* Medicus, o sinergismo só não foi observado para a mistura nas doses 35 + 280 (mesotriona + atrazina, em g ha⁻¹) no segundo experimento de campo.

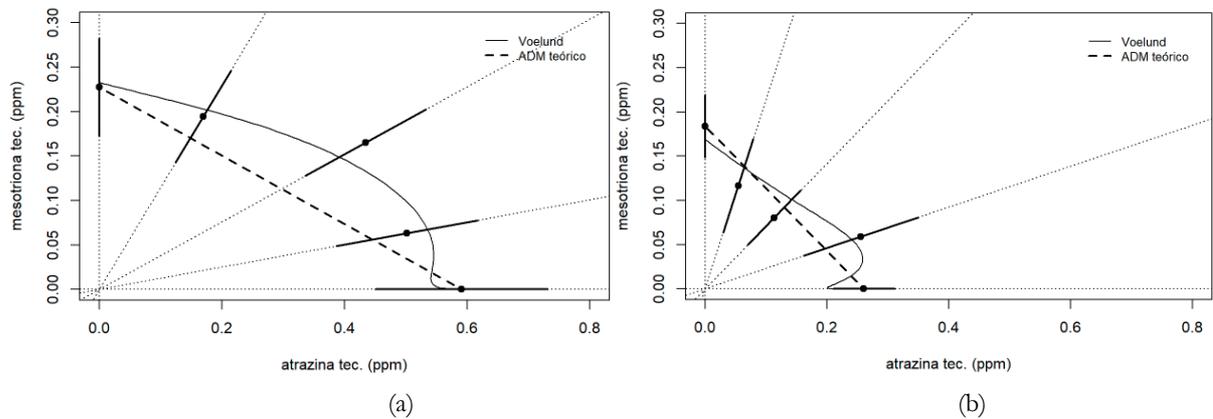


Figura 25. Isobogramas ED50 de dois experimentos (a) e (b) de crescimento relativo em área de *Lemna minuta* sete dias após a aplicação dos herbicidas atrazina (atrazina tec.) e mesotriona (mesotriona tec.), como produtos técnicos, aplicados isoladamente e em misturas nas proporções de 75:25, 50:50 e 25:75 em potência de atrazina e mesotriona. Voelund (linha contínua) é a isobole segundo o modelo de Voelund (1992). ADM teórico (linha tracejada) é a isobole traçada levando em conta somente os dois herbicidas aplicados isoladamente. Paulínia – SP.

Existem relatos na literatura de que essa mistura demonstrou efeito sinérgico no controle de plantas de *Amaranthus retroflexus* L. susceptíveis e resistentes às triazinas (WOODYARD; HUGIE; RIECHERS, 2009) e de *Rapbanus raphanistrum* L., em várias doses para plantas susceptíveis e em algumas doses para plantas resistentes às triazinas (WALSH et al., 2012). Já Kohrt e Sprague (2017), estudando o controle de populações de *Amaranthus palmeri* S. Wats. com resistência múltipla e sem resistência com a aplicação de quatro herbicidas inibidores da HPPD (mesotriona, tembotriona, tolpirilate e topamezona) em mistura com atrazina concluíram que respostas sinérgicas foram encontradas nas misturas entre atrazina e mesotriona ou tembotriona (tricetonas) e que houve efeito aditivo nas misturas entre atrazina e tolpirilate ou topamezona (pirazois), indicando que o sinergismo ocorre mais na mistura de atrazina com tricetonas em comparação a pirazois.

Usando isobogramas para analisar a interação entre os herbicidas atrazina e mesotriona (Inibidores da HPPD), Armel et al. (2007) encontraram sinergismo dessa mistura para as plantas daninhas *Ipomoea coccinea*, *Xanthium strumarium* e *Setaria faberi*. Os mesmos resultados foram encontrados para a mistura de atrazina com fosmidomicina (Inibidores da DOXP sintetase). Porém, quando a atrazina foi misturada com outros inibidores da biossíntese de carotenoides os resultados variaram. Para atrazina misturada com clomazone (Inibidores da DOXP sintetase) houve sinergismo para *I. coccinea*, porém antagonismo para *X. strumarium* e *S. faberi*. Para atrazina misturada com CPTA (Inibidores da Licopeno Ciclase) houve sinergismo para *X. strumarium* e *S. faberi* e antagonismo para *I. coccinea*. Para atrazina misturada com norflurazon (Inibidores da PDS) houve sinergismo para *I. coccinea*, antagonismo para *S. faberi* e efeito aditivo para *X. strumarium*. Ou seja, para a atrazina misturada com diferentes Inibidores da DOXP sintetase, diferentes efeitos de interação (sinergismo e antagonismo) foram encontrados dependendo do herbicida para as plantas daninhas *X. strumarium* e *S. faberi* e para a mesma planta daninha, dependendo do grupo químico herbicida usado na mistura, encontrou-se sinergismo ou antagonismo.

Com base nas proporções de mesotriona para atrazina (g ha⁻¹) em tratamentos que resultaram em sinergismo, Hugie et al. (2008) sugeriram que não apenas a dose de cada herbicida é importante para a ocorrência do sinergismo, mas que existe um limite para cada herbicida e uma exigência de proporção dos dois herbicidas que deve

ser atendida para que o sinergismo ocorra. Em seus experimentos, foi necessária uma proporção de pelo menos 1:2 (g ha⁻¹) de mesotriona para atrazina para obter sinergismo em caruru resistente à triazinas. No presente trabalho, proporções usadas próximas a essas não resultaram em sinergismo. Para as curvas com produtos comerciais, as proporções mais próximas de 1:2 de mesotriona para atrazina usadas foram as curvas 75:25 mesotriona:atrazina em potência, resultando em 1:3,33 (ppm) de mesotriona para atrazina. Nos experimentos (a) e (b), esses pontos, para o nível ED50 analisado, foram considerados aditivos. Para os produtos técnicos, as proporções mais próximas de 1:2 de mesotriona para atrazina usadas foram as curvas 50:50 mesotriona:atrazina em potência, resultando em 1:3 (ppm) de mesotriona para atrazina. Para o nível ED50 analisado, no experimento (a) esse ponto ficou na região de antagonismo, sendo o único ponto nessa região dentre todas as misturas testadas nesse experimento. No experimento (b), esse ponto ficou dentro da região da isobole teórica de aditividade, deslocado para baixo.

Em artigo sobre o uso de herbicidas na cultura do milho, Woodyard, Bollero e Riechers (2009) salientam que o sinergismo entre mesotriona e atrazina nem sempre é consistente entre as espécies de plantas daninhas ou ao variar as doses de herbicida. Além disso, também salientaram que diferenças no tamanho das plantas daninhas, estágio de crescimento no momento da aplicação do herbicida, ou fatores ambientais, como chuva antes ou depois da aplicação do herbicida, podem afetar o potencial de expressão do sinergismo.

Como há grande possibilidade de variação nos resultados esperados das misturas em diferentes alvos sob diferentes condições, reduzir doses em função de possível sinergismo é arriscado pois a manutenção do controle em níveis satisfatórios pode não ocorrer em todos os alvos e condições.

Os autores Bollman, Kells e Penner (2006) concluíram que as interações em pré-emergência entre a mesotriona e a atrazina tiveram efeito independente ou foram sinérgicas no controle de *Abutilon theophrasti* Medicus e *Ipomoea hederaceae* (L.). Citam também que a combinação dos dois herbicidas se complementa muito bem porque eles possuem diferentes modos de ação e variam na eficácia nas plantas daninhas alvo. Porém, nesse trabalho, das 18 combinações testadas e analisadas segundo o MSM, 6 combinações apresentaram sinergismo e 12 combinações apresentaram efeito independente.

Usando ¹⁴C-atrazina e ¹⁴C-mesotriona aplicados em *Ipomoea hederifolia*, Silveira et al. (2020) concluíram que a atrazina sozinha ou em mistura não foi absorvida de forma diferente (62,5% e 60% respectivamente), assim como a mesotriona sozinha ou em mistura (42,8% e 46,6% respectivamente). Além disso, observaram que a mesotriona quando em mistura translocou-se menos (2,5% de translocação) quando comparada à aplicação isoladamente (8,6% de translocação). Para a variável resposta % de Controle, os autores encontraram respostas variando entre sinergismo e efeito aditivo. Porém, para a variável resposta matéria seca, obtiveram efeitos aditivos ou antagonísticos, pois já houve alta redução de massa seca para as doses aplicadas isoladamente. Esses resultados reforçam as hipóteses de que o efeito sinérgico entre a atrazina e mesotriona se dá bioquimicamente (ABENDROTH; MARTIN; ROETH, 2006; ARMEL et al., 2007).

Usando a combinação de 24 herbicidas comerciais, em trabalho recente, os autores Sukhoverkov e Mylene (2021) criaram uma matriz de 276 misturas para encontrar sinergias em ágar usando o bioindicador *Arabidopsis thaliana*. Foi detectado sinergia entre as misturas mesotriona-norflurazona, mesotriona-cletodim e clomazone-paraquat, sendo consideradas novas misturas sinérgicas. Também foi identificado sinergismo entre atrazina-mesotriona e clomazone-atrazina. Todas as misturas sinérgicas encontradas envolveram a mesotriona ou o clomazone, herbicidas inibidores da biossíntese de carotenoides.

Um importante mecanismo de fotoproteção nas plantas envolve a dissipação não fotoquímica do excesso de energia captada pela clorofila, que requer a presença de algumas xantofilas, por exemplo, a zeaxantina. O local mais

provável da dissipação não fotoquímica é o FSII (LI et al., 2000). Segundo Stewart et al. (2021), em estudo com plantas de *Lemna* (*Lemna minor* e *Lemna gibba*), comparando o seu crescimento em diferentes condições e com outras plantas, descobriram que as plantas de *Lemna* combatem efetivamente o acúmulo de excesso de excitação potencialmente perigoso no FSII por meio de uma combinação de forte regulação negativa do tamanho da antena com forte dissipação não fotoquímica do excesso de luz absorvida com a conversão de uma grande fração do ciclo da xantofila em zeaxantina (STEWART et al., 2021). A dissipação não fotoquímica diminui a produção de espécies químicas altamente reativas e a acidificação excessiva do lúmen do tilacoide, que são conhecidos por sensibilizar o FSII ao dano. Assim, a zeaxantina tem uma atuação intensa na regulação de dissipação de energia no FSII quando este tem sobrecarga energética (RAMALHO et al., 2003). Especula-se, então, que essa característica das *Lemna* pode mascarar ou atenuar o efeito sinérgico entre os herbicidas, pensando o excedente de oxidação do FSII.

Pesquisas mais aprofundadas sobre absorção, translocação e metabolismo de herbicidas ou inibição enzimática para um ou ambos os herbicidas na mistura podem ser necessárias para designar conclusivamente um herbicida como antagonista ou sinérgico (BARBIERI et al., 2022).

5.4. Conclusão

O efeito da formulação dos herbicidas foi observado pela maior potência relativa entre os produtos comerciais quando comparados aos produtos técnicos. Além disso, comparando-se o mesmo ingrediente ativo, quando em formulação comercial, apresentou sempre menor parâmetro e (ppm).

Considerando os experimentos com produtos comerciais, ambos os experimentos (a) e (b) demonstraram claramente um efeito aditivo, com todos os pontos dispostos próximos à linha teórica de aditividade.

Para os experimentos com produtos técnicos, no experimento (a), uma das misturas (50:50 atrazina tec.:mesotriona tec.) se deslocou para a região de antagonismo, porém os coeficientes de Hewlett (1969) foram não significativos, indicando efeito aditivo. Para o experimento (b), os coeficientes de Hewlett (1969) foram próximos de 1, também indicando efeito aditivo da mistura.

Conclui-se que não foi observado sinérgico entre os herbicidas atrazina e mesotriona como produtos comerciais ou como produtos técnicos, usando o crescimento relativo em área de *Lemna minuta* como indicador. As misturas tiveram um comportamento aditivo. A hipótese de que a conversão de xantofilas em zeaxantina exacerbada em *Lemna* contribuiu para esse resultado deve ser melhor investigada.

Referências

- ABENDROTH, J. A.; MARTIN, A. R.; ROETH, F. W. Plant Response to Combinations of Mesotrione and Photosystem II Inhibitors. **Weed Technology**, v. 20, n. 1, p. 267–274, 2006.
- ARMEL, G. R.; RARDON, P. L.; MCCOMRICK, M. C.; FERRY, N. M. Differential Response of Several Carotenoid Biosynthesis Inhibitors in Mixtures with Atrazine. **Weed Technology**, v. 21, n. 4, p. 947–953, 2007.
- BARBIERI, G. F.; YOUNG, B. G.; DAYAN, F. E.; STREIBIG, J. C.; TAKANO, H. K.; MEROTTO, A.; AVILA, L. A. Herbicide mixtures: interactions and modeling. **Advances in Weed Science**, v. 40, n. spe1, p. 1–25, 2022.
- BOLLMAN, S. L.; KELLS, J. J.; PENNER, D. Weed Response to Mesotrione and Atrazine Applied Alone and in Combination Preemergence. **Weed Technology**, v. 20, n. 4, p. 903–907, 2006.

- CEDERGREEN, N.; KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K.; SØRENSEN, H.; STREIBIG, J. C. Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 149, 2007.
- DOMONKOS, I.; KIS, M.; GOMBOS, Z.; UGHY, B. Carotenoids, versatile components of oxygenic photosynthesis. **Progress in Lipid Research**, v. 52, n. 4, p. 539–561, 2013.
- DUKE, S. O. Success, despite another plague year. **Pest Management Science**, v. 78, n. 1, p. 7–11, 2022.
- FRANK, H. A.; BRUDVIG, G. W. Redox Functions of Carotenoids in Photosynthesis. **Biochemistry**, v. 43, n. 27, p. 8607–8615, 2004.
- HEWLETT, P. S. Measurement of the Potencies of Drug Mixtures. **Biometrics**, v. 25, n. 3, p. 477, 1969.
- HORTON, P. Molecular design of the photosystem II light-harvesting antenna: photosynthesis and photoprotection. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 411, p. 365–373, 2004.
- HRAC. **HRAC Mode of Action Classification 2022**. Disponível em: <<https://hracglobal.com/tools/hrac-mode-of-action-classification-2022-map>>. Acesso em: 23 out. 2022.
- HUAN, Z. bo; ZHANG, H. jun; HOU, Z.; ZHANG, S. yi; ZHANG, Y.; LIU, W. tang; BI, Y. ling; WANG, J. xin. Resistance level and metabolism of barnyard-grass (*Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv.) populations to quizalofop-p-ethyl in heilongjiang province, China. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 12, p. 1914–1922, 2011.
- HUGIE, J. A.; BOLLERO, G. A.; TRANEL, P. J.; RIECHERS, D. E. Defining the Rate Requirements for Synergism Between Mesotrione and Atrazine in Redroot Pigweed (*Amaranthus retroflexus*). **Weed Science**, v. 56, n. 2, p. 265–270, 2008.
- KESHTKAR, E.; KUDSK, P.; MESGARAN, M. B. Perspective: common errors in dose–response analysis and how to avoid them. **Pest Management Science**, v. 77, n. 6, p. 2599–2608, 2021.
- KISHORE, G. M.; SHAH, D. M. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. **Annual Review of Biochemistry**, v. 57, n. 1, p. 627–663, 1988.
- KOVRT, J. R.; SPRAGUE, C. L. Response of a Multiple-Resistant Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*) Population to Four HPPD-Inhibiting Herbicides Applied Alone and with Atrazine. **Weed Science**, v. 65, n. 4, p. 534–545, 2017.
- KUDSK, P.; MATHIASSEN, S. K. Joint action of amino acid biosynthesis-inhibiting herbicides. **Weed Research**, v. 44, n. 4, p. 313–322, 2004.
- LI, X.-P.; BJÖRKMAN, O.; SHIH, C.; GROSSMAN, A. R.; ROSENQUIST, M.; JANSSON, S.; NIYOGI, K. K. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. **Nature**, v. 403, p. 391–395, 2000.
- LU, H.; YU, Q.; HAN, H.; OWEN, M. J.; POWLES, S. B. Evolution of resistance to HPPD-inhibiting herbicides in a wild radish population via enhanced herbicide metabolism. **Pest Management Science**, v. 76, n. 5, p. 1929–1937, 2020.
- MITCHELL, G.; BARTLETT, D. W.; FRASER, T. E. M.; HAWKES, T. R.; HOLT, D. C.; TOWNSON, J. K.; WICHERT, R. A. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. **Pest Management Science**, v. 57, n. 2, p. 120–128, fev. 2001.
- NORRIS, S. R.; BARRETTE, T. R.; DELLAPENNA, D. Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. **Plant Cell**, v. 7, n. 12, p. 2139–2149, 1995.
- POWLES, S. B.; YU, Q. Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. **Annual Review of Plant Biology**, v. 61, n. 1, p. 317–347, 2010.

- RAMALHO, J. C.; QUARTIN, V. L.; LEITÃO, E.; CAMPOS, P. S.; CARELLI, M. L. C.; FAHL, J. I.; NUNES, M. A. Cold Acclimation Ability and Photosynthesis among Species of the Tropical Coffea Genus. **Plant Biology**, v. 5, n. 6, p. 631–641, 2003.
- RUEDEN, C. T.; SCHINDELIN, J.; HINER, M. C.; DEZONIA, B. E.; WALTER, A. E.; ARENA, E. T.; ELICEIRI, K. W. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. **BMC Bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 529, 2017.
- SILVEIRA, R. F.; TAKESHITA, V.; MENDES, K. F.; DOS REIS, F. C.; PIMPINATO, R. F.; TORNISIELO, V. L. Interacting effects on absorption and translocation of ¹⁴C-mesotrione and ¹⁴C-atrazine mixture for morning glory (*Ipomoea hederifolia*) control. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 326, n. 1, p. 563–573, 2020.
- SØRENSEN, H.; CEDERGREEN, N.; SKOVGAARD, I. M.; STREIBIG, J. C. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. **Environmental and Ecological Statistics**, v. 14, n. 4, p. 383–397, 2007.
- STEWART, J. J.; ADAMS, W. W.; LÓPEZ-POZO, M.; DOHERTY GARCIA, N.; MCNAMARA, M.; ESCOBAR, C. M.; DEMMIG-ADAMS, B. Features of the Duckweed Lemna That Support Rapid Growth under Extremes of Light Intensity. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1481, 2021.
- STREIBIG, J. C.; JENSEN, J. E. Actions of herbicides in mixtures. In: COBB, A.; KIRKWOOD, R. C. (Ed.). **Herbicides and Their Mechanisms of Action**. [s.l.] CRC Press, 2000. p. 152–180.
- SUKHOVERKOV, K. V.; MYLNE, J. S. Systematic, small-scale screening with *Arabidopsis* reveals herbicides synergies that extend to lettuce. **Pest Management Science**, v. 77, n. 11, p. 4930–4941, 2021.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. 3. ed. [s.l.] Sinauer Associates, 2002.
- VØLUND, A. Dose response surface bioassay. In: XVth Biometric Conference, vol II, **Anais...**1992.
- WALSH, M. J.; STRATFORD, K.; STONE, K.; POWLES, S. B. Synergistic Effects of Atrazine and Mesotrione on Susceptible and Resistant Wild Radish (*Raphanus raphanistrum*) Populations and the Potential for Overcoming Resistance to Triazine Herbicides. **Weed Technology**, v. 26, n. 2, p. 341–347, 2012.
- WOODYARD, A. J.; BOLLERO, G. A.; RIECHERS, D. E. Broadleaf Weed Management in Corn Utilizing Synergistic Postemergence Herbicide Combinations. **Weed Technology**, v. 23, n. 4, p. 513–518, 20 dez. 2009.
- WOODYARD, A. J.; HUGIE, J. A.; RIECHERS, D. E. Interactions of Mesotrione and Atrazine in Two Weed Species with Different Mechanisms for Atrazine Resistance. **Weed Science**, v. 57, n. 4, p. 369–378, 2009.
- YADAV, D. K.; PRASAD, A.; KRUK, J.; POSPÍŠIL, P. Evidence for the Involvement of Loosely Bound Plastosemiquinones in Superoxide Anion Radical Production in Photosystem II. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-15, 2014.
- ZHANG, H.; WANG, J.; JI, Z.; SUN, X.; TIAN, Q.; WEI, S.; JI, Z. Discovery, SAR, and putative mode of action of N-benzyl-2-methoxybenzamides as potential bleaching herbicides. **Pest Management Science**, v. 77, n. 6, p. 2804–2811, 2021.

6. CONCLUSÕES

Não foi observado sinergismo entre os herbicidas glifosato e flumioxazina, como produtos comerciais, usando o crescimento relativo em área de *Lemna minuta* como indicador. As misturas tiveram um comportamento aditivo. Isso foi corroborado pela análise conjunta dos experimentos fatoriais em relação ao MSM, que foi não significativa.

Foi observado sinergismo entre a mistura de sulfometurom-metilico e clorimuron etílico, como produtos comerciais, usando o crescimento relativo em área de *Lemna minuta* como indicador. Para se obter o resultado esperado segundo o ADM, a mistura poderia ser aplicada com redução de dose em 30% a 40%.

Não foi observado sinergismo entre os herbicidas atrazina e mesotriona como produtos comerciais ou como produtos técnicos, usando o crescimento relativo em área de *Lemna minuta* como indicador. As misturas tiveram um comportamento aditivo. A hipótese de que a conversão de xantofilas em zeaxantina exacerbada em *Lemna* contribuiu para esse resultado deve ser melhor investigada.

Clones de *Lemna minuta* foram usados com sucesso para descrever diferentes interações entre misturas binárias de herbicidas usando o crescimento relativo em área, variável resposta não subjetiva, possibilitando detectar de forma recorrente a ocorrência de sinergismo e efeito aditivo. Por serem pequenas, crescerem rápido, poderem ser criadas em laboratório e serem sensíveis a diferentes herbicidas, as *Lemna* são um bioindicador útil no estudo de misturas, principalmente quando existem restrições quanto à quantidade de ingrediente ativo disponível para os experimentos. Porém, não devem ser consideradas como única fonte de informação, mas sim estarem na lista de evidências no estudo das misturas.

Experimentos de misturas são muitas vezes feitos com o objetivo de buscar a combinação mais eficaz no controle de determinadas plantas daninhas, o que é um propósito lógico e válido no uso de herbicidas. Para isso, porém, são usadas muitas vezes doses isoladas elevadas e variáveis respostas subjetivas, o que dificulta tirar conclusões sobre interações (sinérgicas, aditivas, independentes ou antagonicas) entre os herbicidas.

É comum em experimentos de misturas binárias de herbicidas encontrar resultados que variam entre antagonismo, efeito independente ou sinergismo. Por isso é importante repetir os experimentos e levar em conta a variação entre os experimentos através de uma análise conjunta. A análise estatística dos resultados de experimentos segundo MSM (Colby) é importante. Respostas individuais de vários experimentos podem ser sumarizadas em uma análise conjunta. A metodologia proposta por Flint, Cornelius e Barrett (1988) é uma alternativa nessa situação.

Experimentos segundo MSM são mais viáveis pois exigem menos tratamentos e permitem estudar mais misturas, porém esse modelo é mais susceptível a críticas, como abordado na discussão.

Experimentos segundo ADM e o uso de isobogramas têm a desvantagem de serem mais trabalhosos e custosos em termos experimentais, o que pode inviabilizá-los em estudos de campo. Porém, não possuem falhas teóricas e, embora tenha sido difundido na literatura que devem ser usados somente em misturas de herbicidas com o mesmo mecanismo de ação, essa limitação não existe. Assim, miniaturização e experimentos controlados são benéficos no estudo de misturas, pois viabilizam o uso do ADM como referência. Além disso, a determinação do ED50 com precisão é necessária e é importante diferenciar entre dose e potência herbicida quando se trabalha com misturas de herbicidas.

As respostas de misturas tomando como base o modelo MSM podem variar de acordo com as doses utilizadas nas misturas e isso pode ser considerado uma desvantagem do modelo MSM. Porém, análises segundo o modelo ADM (que requerem curvas de dose-resposta para os dois herbicidas em teste isoladamente) também podem

variar de acordo com o nível de resposta se as curvas de dose-resposta de referência não forem similares (paralelas), pois a potência relativa entre os herbicidas vai variar de acordo com o nível de resposta. Ainda resta resolver, se isso for possível, como investigar desvios do ADM para níveis de resposta diferentes do ED50 com base em curvas com diferentes inclinações ou para quaisquer outros ED baseados em dados de curvas com diferentes valores mínimos (RITZ; STREIBIG; KNISS, 2021).

Seguindo a metodologia de Sørensen et al. (2007), a possibilidade de análise da distribuição dos pontos em relação ao ADM e em relação ao modelo simétrico de Hewlett (1969) demonstrou-se viável. Com três misturas além dos dois herbicidas referência aplicados isoladamente (ou seja, cinco curvas de dose-resposta) tendências foram encontradas usando isobogramas. O modelo de Vølund (1992), por outro lado, é de difícil reprodução pois cinco curvas de dose-resposta não foram suficientes para gerar parâmetros significativos.

De acordo com a literatura consultada, grupos de herbicidas que possuem sinergismo em alguns alvos não necessariamente terão sinergismo em todos os alvos em que serão aplicados. A melhoria do resultado da aplicação de misturas em termos de sinergismo pode variar dependendo de vários fatores (experimentais, físico-químicos, bioquímicos, vegetais e ambientais) que determinam essas interações.

O fato de uma mistura ser aditiva ou independente é benéfico, já que muitas vezes a maior utilidade da mistura é aumentar o espectro de ação da aplicação.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Definições sobre o modelo multiplicativo, de Bliss ou de Colby e o teorema da soma de probabilidades para eventos não mutuamente exclusivos.

Em probabilidade, se a ocorrência de um evento não impede a ocorrência do outro evento, eles são ditos não mutuamente exclusivos. Então, a probabilidade de ocorrer A ou B é dada por:

$$p(A \cup B) = p(A) + p(B) - p(A \cap B)$$

Se os eventos A e B forem independentes (ou seja, se a ocorrência de um não interferir na probabilidade de ocorrer o outro), a fórmula para o cálculo da probabilidade da intersecção é:

$$p(A \cap B) = p(A) * p(B)$$

Logo,

$$p(A \cup B) = p(A) + p(B) - p(A) * p(B)$$

Que é a fórmula de Bliss (1939) ou similar à de Colby (1967) para dados de % de Controle.

APÊNDICE B.

Prova do modelo aditivo (ADM) para misturas de dois herbicidas, utilizando trigonometria.

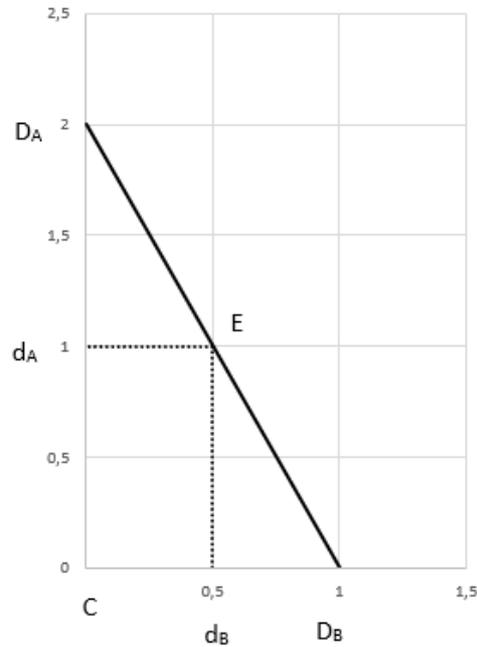


Figura 26. Isoblograma representativo de uma dada isobole de X% segundo o modelo ADM, sendo D_A e D_B , respectivamente as doses do herbicida A e B isoladamente que correspondem a X% de controle e d_A e d_B , respectivamente, as doses do herbicida A e B na mistura.

Dadas as áreas dos triângulos e do quadrilátero da Figura 26,

$$\text{Área do triângulo } A_{D_A C D_B} = \frac{D_A \times D_B}{2},$$

$$\text{Área do triângulo } A_{D_A d_A E} = \frac{(D_A - d_A) \times d_B}{2},$$

$$\text{Área do triângulo } A_{E d_B D_B} = \frac{(D_B - d_B) \times d_A}{2},$$

$$\text{Área do quadrilátero } A_{d_A C d_B E} = d_B \times d_A,$$

temos que $A_{D_A C D_B} = A_{D_A d_A E} + A_{E d_B D_B} + A_{d_A C d_B E}$.

$$\frac{D_A \times D_B}{2} = \frac{(D_A - d_A) \times d_B}{2} + \frac{(D_B - d_B) \times d_A}{2} + d_B \times d_A$$

$$D_A D_B = 2 \left[\frac{(D_A - d_A) d_B}{2} + \frac{(D_B - d_B) d_A}{2} + d_B d_A \right]$$

$$D_A D_B = (D_A - d_A) d_B + (D_B - d_B) d_A + 2 d_B d_A$$

$$D_A D_B = D_A d_B - d_A d_B + D_B d_A - d_B d_A + 2 d_B d_A$$

$$D_A D_B = D_A d_B + D_B d_A$$

$$\frac{D_A D_B}{D_A D_B} = \frac{D_A d_B}{D_A D_B} + \frac{D_B d_A}{D_A D_B}$$

Logo,

$$\frac{d_A}{D_A} + \frac{d_B}{D_B} = 1$$

APÊNDICE C. Equação inversa do modelo Log-logístico de 4 parâmetros, equação da reta da isobole do ADM e substituição da equação inversa do modelo Log-logístico de 4 parâmetros na equação da reta do modelo ADM.

A partir do modelo Log-logístico, a equação inversa é obtida.

$$y = \min + \frac{\max - \min}{1 + \left(\frac{x}{ED_{50}}\right)^b}$$

$$(y - \min) \left(1 + \left(\frac{x}{ED_{50}}\right)^b\right) = \max - \min$$

$$\left(\frac{x}{ED_{50}}\right)^b = \frac{\max - \min}{y - \min} - 1$$

$$\frac{x}{ED_{50}} = \left(\frac{\max - \min - (y - \min)}{y - \min}\right)^{\frac{1}{b}}$$

$$x = ED_{50} \left(\frac{\max - y}{y - \min}\right)^{\frac{1}{b}}$$

A partir da equação do modelo ADM, substitui-se D_A e D_B com a equação inversa do modelo Log-logístico. Os termos da equação do modelo ADM podem ser isolados ou não.

$$\frac{d_A}{D_A} + \frac{d_B}{D_B} = 1$$

Então,

$$\frac{d_A}{ED_{50A} \left(\frac{\max_A - y}{y - \min_A}\right)^{\frac{1}{b_A}}} + \frac{d_B}{ED_{50B} \left(\frac{\max_B - y}{y - \min_B}\right)^{\frac{1}{b_B}}} - 1 = 0$$

Ou, isolando os termos do modelo ADM,

$$\frac{d_A}{D_A} + \frac{d_B}{D_B} = 1$$

$$\frac{d_A}{D_A} = 1 - \frac{d_B}{D_B}$$

$$d_A = D_A \left(1 - \frac{d_B}{D_B}\right)$$

$$d_A = D_A \left(1 - \frac{d_B}{D_B}\right)$$

$$D_A \left(\frac{d_B}{D_B} - 1\right) + d_A = 0$$

Substituindo D_A e D_B com a equação inversa do modelo Log-logístico:

$$\left(ED_{50A} \left(\frac{\max_A - y}{y - \min_A} \right)^{\frac{1}{b_A}} \right) \left(\frac{d_B}{ED_{50B} \left(\frac{\max_B - y}{y - \min_B} \right)^{\frac{1}{b_B}}} - 1 \right) + d_A = 0$$

Uma vez que se conhece a curva de dose-resposta dos dois herbicidas isolados, os valores de ED_{50A} , \max_A , \min_A , b_A e ED_{50B} , \max_B , \min_B e b_B são conhecidos. Portanto, pode-se obter a raiz (valor de y) da equação acima, que corresponde à resposta esperada pelo modelo ADM para a mistura de qualquer d_A e d_B que possuam uma potência relativa. Isso pode ser realizado com a função `uniroot` do pacote `stats` do R (Apêndice D).

APÊNDICE D. Função para encontrar valor teórico do modelo aditivo (ADM) para mistura de dois herbicidas.

```
#####
#Abaixo, função para encontrar o valor teórico do modelo ADM para uma mistura binária
de herbicidas. Essa função é baseada no modelo sigmoide Log-logístico de 4 parâmetros,
ou modelo de Hill, pois esses modelos são similares.
#Para cada curva, caso o valor mínimo seja 0 (zero), o modelo passa a ter 3 parâmetros.
#Considerações para o uso da função:
#Para termos uma estimativa de isobole de ADM, primeiro é necessário que exista uma
potência relativa para o nível de resposta desejado. Por exemplo, se a assíntota
mínima do Herb A (minA) é zero e a assíntota mínima do Herb B (minB) é 20, não existe
uma potência relativa correspondente para valores de resposta entre zero e vinte.
Isso também vale para valores divergentes do limite superior (maxA, maxB).
#Além disso, caso a dose usada na mistura de um dos herbicidas resulte isoladamente
em resposta superior ao máximo do outro herbicida, não existe uma potência relativa
correspondente, logo, não há isobole para aquele valor de resposta. Por exemplo, se
maxA = 90 e a dose 5 do Herb B isoladamente resulta em resposta de 92 (que é maior
que maxA), qualquer mistura do HerbA com a dose 5 do HerbB não terá uma isobole
correspondente.
#
#Para usar esse script, mudar os valores das variáveis abaixo, segundo curvas geradas
inicialmente com os herbicidas isolados. Exemplo segundo Streibig e Jensen (2000).
#####
HerbA <- "Herb A" #nome do Herbicida
minA <- 0 #limite inferior da curva ou assíntota mínima
maxA <- 100 #limite superior
bA <- 1 #proporcional ao slope em ED50
ED50A <- 2 #dose necessária para reduzir a resposta pela metade entre o máximo
e mínimo
HerbB <- "Herb B" #nome do Herbicida
minB <- 0 #limite inferior da curva ou assíntota mínima
maxB <- 100 #limite superior
bB <- 1.5 #proporcional ao slope em ED50
ED50B <- 1 #dose necessária para reduzir a resposta pela metade entre o máximo
e mínimo

#Dois vetores com os valores das doses usadas em mistura dos Herbicidas A (HerbA) e
B (HerbB)
dA <- c(0,0.2,1,5,25) #doses para o "Herbicida A" (primeiro Herbicida)
dB <- c(0,0.2,1,5,25) #doses para o "Herbicida B" (segundo Herbicida)
#####
#Data.frame para armazenar os resultados
df.results <- NULL
#Headers para a Data.frame com os resultados
col_headings <- c(HerbA,HerbB, "ADM")
```

```

#Intervalo de valores para uniroot estimar o valor de y
intervalEDx <- c(max(minA,minB)+0.001,min(maxA,maxB)-0.001)
maxIterations <- 1e-15
#Função
for(i in dA){
  for(j in dB){
    get.Y.Inv.Log.log <- function(y) {
      ED50A*((maxA-y)/(y-minA))^(1/bA))*((j/(ED50B*((maxB-y)/(y-
minB))^(1/bB)))-1)+i}
    if(i != 0 | j != 0){
      ADM.isobole = uniroot(get.Y.Inv.Log.log, interval = intervalEDx, tol =
maxIterations)$root
    }else{
      if(i == 0 & j == 0){
        ADM.isobole = 100}
      else{
        ADM.isobole = i}}
    de <- data.frame(HerbA = i,HerbB = j, "ADM" = ADM.isobole)
    df.results <- rbind(df.results,de)}}
names(df.results) <- col_headings
round(df.results,2)

```

Na Tabela 15 temos a comparação dos resultados. Nos valores apresentados por Streibig e Jensen (2000) há uma diferença no valor de ED₅₀ para o Herbicida B. O valor de ED₅₀ para o Herbicida B apresentado pelos autores na descrição de uma tabela de referência é 1,5 (Tabela 7.1 de Streibig e Jensen (2000)). Porém, como informado pelos próprios autores nas Tabelas 7.1, 7.2 e 7.3, na primeira linha, o valor 50 aparece na coluna da dose 1 para o Herbicida B, indicando que o real valor do ED₅₀ do Herbicida B no exemplo é 1 (como utilizado aqui).

Tabela 15. Respostas esperadas (100 = sem efeito, 0 = morte total) para misturas do Herbicida A e Herbicida B, cada um aplicado em doses de 0 a 25 em unidades quaisquer segundo o Modelo aditivo (ADM). Os efeitos dos Herbicidas A e B isoladamente são previstos por curvas de dose-resposta e modelo log-logístico (pela Equação 4, $d = 100$ e $c = 0$ para ambos, ED₅₀ = 2 para o Herbicida A, ED₅₀ = 1 para o Herbicida B, $b = 1,0$ para o Herbicida A, $b = 1,5$ para o Herbicida B). Adaptado de Streibig, Jensen, 2000.

Herbicida A	Herbicida B				
	0	0,2	1	5	25
0	100,00	91,79	50,00	8,21	0,79
0,2	90,91	81,91	46,58	8,11	0,79
1	66,67	59,68	37,15	7,74	0,79
5	28,57	26,45	19,61	6,34	0,77
25	7,41	7,16	6,26	3,49	0,69

APÊNDICE E. Comparação/prova do resultado da função `modelFit()` e `anova()` do pacote `drc`, no R.

```

#library("drc") install.packages("devtools")
#devtools::install_github("DoseResponse/drcData")
library("drcData")
#Abaixo são listados conjuntos de dados com o mesmo delineamento ou com
delineamento que permite a comparação.
#Conjuntos de dados do pacote "drcData" para testar o resultado da função
modelFit() e anova().
#Usar como exemplo uma das definições data.test a seguir para comparação dos
resultados.
data.test <- algae
data.test <- barley
data.test <- lemna
data.test <- lepidium
data.test <- M.bahia
data.test <- O.mykiss

#Padronizando os nomes das colunas dos diferentes conjuntos de dados
names(data.test) <- c("rates", "resp")
reg_drm <- drm(resp~rates, fct=LL.4(), data=data.test)
summary(reg_drm)
modelFit(reg_drm)

m1.aov <- aov(resp~as.factor(rates), data=data.test)
#summary(m1.aov)

#Prova da função modelFit() do pacote drc
SQRreg <- sum(resid(reg_drm)^2)
SQRanova <- sum(resid(m1.aov)^2)
DFreg <- reg_drm$df.residual
DFanova <- m1.aov$df.residual
Fratio_aj <- ((SQRreg-SQRanova)/(DFreg-DFanova))/(SQRanova/DFanova)
DFnumerator <- DFreg - DFanova #Graus de liberdade (df, numerador) = (df Regressão
- df ANOVA)
DFdenominator <- DFanova #Graus de liberdade do resíduo da Regressão (denominador)
modelFit_pValue <- pf(Fratio_aj, DFnumerator, DFdenominator, lower.tail = FALSE)
round(modelFit_pValue, digits = 4)

#Prova da função anova() do pacote drc
#Uma vez que temos uma regressão com 4 parâmetros, testa-se uma com 3 parâmetros
e as duas são comparadas
reg_drm_red <- drm(resp~rates, fct=LL.3(), data=data.test)
anova(reg_drm, reg_drm_red)

```

```
reg1 <- reg_drm #mais parâmetros
reg2 <- reg_drm_red #menos parâmetros

SQRreg1 <- sum(resid(reg1)^2)
SQRreg2 <- sum(resid(reg2)^2)
DFreg1 <- reg1$df.residual
DFreg2 <- reg2$df.residual
Fratio_reg <- ((SQRreg2-SQRreg1)/(DFreg2-DFreg1))/(SQRreg1/DFreg1)
DFnumerator <- DFreg2 - DFreg1 #GL (numerador) = (GL Reg menos - GL Reg mais
parâmetros)
DFdenominator <- DFreg1 #GL Res da Regressão c/ menos parâmetros (denominador)
Fratio_reg_pValue <- pf(Fratio_reg, DFnumerator, DFdenominator, lower.tail =
FALSE)
round(Fratio_reg_pValue, digits = 4)
```

APÊNDICE F. Scripts em R para cálculo de % de Controle, cálculo dos valores esperados E segundo Colby (1967) e teste Qui-quadrado sobre os valores observados e esperados. O primeiro script exemplifica o cálculo do valor de Controle e E para cada repetição, a partir de dados adicionados diretamente no R. O segundo script exemplifica o cálculo do teste qui-quadrado para dados adicionados diretamente no R. O terceiro script faz todos os cálculos a partir de dados adicionados ao R a partir de arquivo de texto.

```
#Primeiro script

#Exemplo de cálculo de % de Controle
#a partir de dados de biomassa e
#do cálculo dos valores esperados E para
#cada repetição
#Com os valores Esperados calculados
#segundo Colby (1967) e com os valores Observados,
#pode-se fazer um teste Qui-quadrado.
#O exemplo a seguir é de um experimento em esquema
#fatorial, sendo o fator Herbicida A com dois níveis
#(doses 0 e 1 gramas de ativo/ha) e o fator Herbicida B
#com dois níveis #(doses 0 e 10 gramas de ativo/ha),
#totalizando 4 tratamentos.
#O tratamento testemunha tem que ser identificado
#como 999
#Os dados de biomassa são fictícios
treat <- c(rep(999,3),rep(2,3),rep(3,3),rep(4,3))
HerbA_rate <- c(0,0,0,
               1,1,1,
               0,0,0,
               1,1,1)
HerbB_rate <- c(0,0,0,
               0,0,0,
               10,10,10,
               10,10,10)
Eval.data <- c(4.132, 4.322, 4.567,
              2.143, 2.879, 1.987,
              1.988, 2.123, 1.789,
              1.587, 2.354, 1.769)
dat <- as.data.frame(cbind(treat, HerbA_rate, HerbB_rate, Eval.data))
#Calculando a % de Controle
avg999 <- mean(dat$Eval.data[dat$treat=="999"])
#Modo 1, calculando para todas as linhas da tabela
#dat$Ctrl_perc <- with(dat, (Eval.data*100)/avg999)

#Alternativa, calculando para todas as linhas da tabela,
#porém, com possibilidade de colocar condições ao cálculo
mylist <- list() #criando uma lista vazia
for (i in 1:nrow(dat)) {
  if(dat$treat[i] != "999"){
```

```

    mylist[i] <- (100-(dat$Eval.data[i]*100)/avg999)
  }else{
    mylist[i] <- NA
  }
}
mylist <- data.frame(mylist)
dat$Ctrl_perc <- cbind(t(mylist))
#Calculando o valor E de Colby
mylist_HerbA <- NULL
mylist_HerbB <- NULL
mylist_AB_obs <- NULL
for(i in 1:nrow(dat)){
  if(dat[i,"HerbA_rate"] != 0 &
    dat[i,"HerbB_rate"] == 0){
    mylist_HerbA[i] <- dat$Ctrl_perc[i]
  }
  if(dat[i,"HerbB_rate"] != 0 &
    dat[i,"HerbA_rate"] == 0){
    mylist_HerbB[i] <- dat$Ctrl_perc[i]
  }
  if(dat[i,"HerbB_rate"] != 0 &
    dat[i,"HerbA_rate"] != 0){
    mylist_AB_obs[i] <- dat$Ctrl_perc[i]
  }
}
mylist_HerbA <- na.exclude(data.frame(mylist_HerbA))
mylist_HerbB <- na.exclude(data.frame(mylist_HerbB))
mylist_AB_obs <- na.exclude(data.frame(mylist_AB_obs))
EColby_table <- cbind(mylist_HerbA,mylist_HerbB,mylist_AB_obs)
E_Colby_list <- list()
for (i in 1:nrow(EColby_table)){
  E_Colby_list[i] <- EColby_table[i,1]+
    EColby_table[i,2]-
    ((EColby_table[i,1]*EColby_table[i,2])/100)}
E_Colby <- data.frame(E_Colby_list)
EColby_table$E_Colby <- cbind(t(E_Colby))
names(EColby_table)[names(EColby_table) == "mylist_HerbA"] = "Ctrl_HA"
names(EColby_table)[names(EColby_table) == "mylist_HerbB"] = "Ctrl_HB"
names(EColby_table)[names(EColby_table) == "E_Colby"] = "Ctrl_Expect_E"
names(EColby_table)[names(EColby_table) == "mylist_AB_obs"] = "Ctrl_Obser"
rownames(EColby_table) <- NULL
EColby_table

```

```
#Segundo Script

#Se os valores observados e esperados são
#calculados individualmente para cada repetição,
#então um teste qui-quadrado pode ser usado para
#determinar a significância das diferenças
#entre os valores observados e esperados (Colby, 1967)
#'observed' são os valores observados para cada repetição.
#'expected' são os valores E de Colby,
#' calculados para cada repetição.
#Os dois conjuntos devem ter o mesmo número de observações.
#Este exemplo considera valores de % de Controle
#calculados com base em redução de biomassa.
observed <- c(23.03, 43.56, 35.62)
expected <- c(84.36, 78.58, 77.84)
alpha_value <- 0.05

#Teste Qui-quadrado sobre os valores observados
#e esperados segundo Colby (1967)
#Linha 1 vai sempre ser o "observed" e Linha 2 o "expected"
Colby_Chisquare <- as.table(rbind(observed,expected))
chisq.test(Colby_Chisquare)
```

```

#Terceiro Script

#Carregar os dados, fazer o cálculo de Controle a partir
#da redução de biomassa, calcular os valores
#esperados de Colby para cada repetição e calcular o teste
#qui-quadrado para a mistura.
#Nesse exemplo os dados são lidos no R a partir
#de um arquivo em .txt com decimais separados por vírgulas.
#Esse script somente irá fazer o cálculo de uma mistura
#por vez, por arquivo carregado. #Ou seja, os dados
#devem ser organizados em cada arquivo de forma a
#ter nos tratamentos somente dois níveis por fator
#(duas doses para cada herbicida, sendo zero uma das doses).
#Para casos com mais doses, deve-se organizar
#os arquivos dividindo os tratamentos
setwd("C:/Users/Danilo/Desktop")
dat <- read.table('EColby_Xsq.txt',sep = "\t", header = TRUE, dec = ",")
#Renomeando as colunas
names(dat)
#Deve-se adaptar essa parte do código de acordo
#com a nomenclatura das colunas
names(dat)[names(dat) == "TRAT"] = "treat"
names(dat)[names(dat) == "Dose_HerbA"] = "HerbA_rate"
names(dat)[names(dat) == "Dose_HerbB"] = "HerbB_rate"
names(dat)[names(dat) == "biomass"] = "Eval.data"
#Deve-se adaptar essa parte do código de acordo
#com a nomenclatura do tratamento testemunha
#de modo a sempre mudar o tratamento testemunha para 999
library(dplyr)
dat$treat <- recode_factor(dat$treat, T1 = "999")
#Uma vez que as colunas estão renomeadas de acordo com o padrão
#desse script ("treat", #"HerbA_rate", "HerbB_rate" e "Eval.data")
#e a numeração da testemunha for 999, pode-se executar
#o código abaixo sem nenhuma mudança.
#Calculando a % de Controle
avg999 <- mean(dat$Eval.data[dat$treat=="999"])
#Alternativa, calculando para todas as linhas da tabela,
#porém, com possibilidade de colocar condições ao cálculo
mylist <- list() #criando uma lista vazia
for (i in 1:nrow(dat)) {
  if(dat$treat[i] != "999"){
    mylist[i] <- (100-(dat$Eval.data[i]*100)/avg999)
  }else{
    mylist[i] <- NA
  }
}
}

```

```

mylist <- data.frame(mylist)
dat$Ctrl_perc <- cbind(t(mylist))
#Calculando o valor E de Colby
mylist_HerbA <- NULL
mylist_HerbB <- NULL
mylist_AB_obs <- NULL
for(i in 1:nrow(dat)){
  if(dat[i,"HerbA_rate"] != 0 &
     dat[i,"HerbB_rate"] == 0){
    mylist_HerbA[i] <- dat$Ctrl_perc[i]
  }
  if(dat[i,"HerbB_rate"] != 0 &
     dat[i,"HerbA_rate"] == 0){
    mylist_HerbB[i] <- dat$Ctrl_perc[i]
  }
  if(dat[i,"HerbB_rate"] != 0 &
     dat[i,"HerbA_rate"] != 0){
    mylist_AB_obs[i] <- dat$Ctrl_perc[i]
  }
}

mylist_HerbA <- na.exclude(data.frame(mylist_HerbA))
mylist_HerbB <- na.exclude(data.frame(mylist_HerbB))
mylist_AB_obs <- na.exclude(data.frame(mylist_AB_obs))
EColby_table <- cbind(mylist_HerbA,mylist_HerbB,mylist_AB_obs)
E_Colby_list <- list()
for (i in 1:nrow(EColby_table)){
  E_Colby_list[i] <- EColby_table[i,1]+
    EColby_table[i,2]-
    ((EColby_table[i,1]*EColby_table[i,2])/100)}
E_Colby <- data.frame(E_Colby_list)
EColby_table$E_Colby <- cbind(t(E_Colby))
names(EColby_table)[names(EColby_table) == "mylist_HerbA"] = "Ctrl_HA"
names(EColby_table)[names(EColby_table) == "mylist_HerbB"] = "Ctrl_HB"
names(EColby_table)[names(EColby_table) == "E_Colby"] = "Ctrl_Expec_E"
names(EColby_table)[names(EColby_table) == "mylist_AB_obs"] = "Ctrl_Obser"
rownames(EColby_table) <- NULL

EColby_table

observed <- as.numeric(EColby_table$Ctrl_Obser)
expected <- as.numeric(EColby_table$Ctrl_Expec_E)

```

```
#Teste Qui-quadrado sobre os valores observados
#e esperados segundo Colby (1967).
#Linha 1 vai sempre ser o "observed" e Linha 2 o "expected"
Colby_Chisquare <- as.table(rbind(observed,expected))
chisq.test(Colby_Chisquare)
```

APÊNDICE G. Demonstração e códigos em R para o cálculo da estatística para o método de Colby (1967) segundo proposto por Flint, Cornelius e Barrett (1988).

Segundo Flint, Cornelius e Barrett (1988), Colby definiu a ação de dois herbicidas como “aditiva” (considerada nesse trabalho como independente) se o crescimento da planta, para qualquer tratamento T_{ij} de um Herbicida A na dose i associado a um Herbicida B na dose j , pode ser previsto por

$$P_{ij} = \frac{A_{i0}B_{0j}}{AB_{00}} \quad (10)$$

para $i, j \neq 0$, onde A_{i0} e B_{0j} representam o crescimento da planta quando o Herbicida A ou o Herbicida B são aplicados isoladamente nas doses i e j , respectivamente, e AB_{00} é o crescimento da testemunha. Ou seja, T_{ij} é o efeito Observado e P_{ij} é o efeito Esperado (E) segundo Colby.

Se não há interação entre os herbicidas associados, o efeito observado é igual ao efeito esperado, ou seja, $T_{ij} = P_{ij}$, ou

$$\frac{T_{ij}}{P_{ij}} = 1 \quad (11)$$

Tomando o logaritmo e substituindo P_{ij} pela Equação 10:

$$\begin{aligned} \log_n \left(\frac{T_{ij}}{P_{ij}} \right) &= \log_n(1) \\ \log_n \left(\frac{T_{ij}}{\left(\frac{A_{i0}B_{0j}}{AB_{00}} \right)} \right) &= 0 \\ \log_n(T_{ij}) - \log_n \left(\frac{A_{i0}B_{0j}}{AB_{00}} \right) &= 0 \\ \log_n(T_{ij}) - [\log_n(A_{i0}B_{0j}) - \log_n(AB_{00})] &= 0 \\ \log_n(T_{ij}) - [\log_n(A_{i0}) + \log_n(B_{0j}) - \log_n(AB_{00})] &= 0 \\ \log_n(T_{ij}) - \log_n(A_{i0}) - \log_n(B_{0j}) + \log_n(AB_{00}) &= 0 \end{aligned} \quad (12)$$

Pela Equação 12, se os dados são transformados para logaritmo, então os herbicidas nos níveis i e j são independentes segundo Colby quando

$$I_{ij} = \mu_{ij} - \mu_{i0} - \mu_{0j} + \mu_{00} \quad (13)$$

é igual a zero, onde μ_{ij} é a média dos dados transformados para logaritmo para a combinação de herbicida ij , μ_{i0} é a média dos dados transformados para logaritmo para o nível i do herbicida A, μ_{0j} é a média dos dados transformados para logaritmo para o nível j do herbicida B e μ_{00} é a média dos dados transformados para logaritmo da testemunha.

Se a Equação 1 é válida, quando significativo, para qualquer variável que decresce com o aumento da dose, sinergismo ocorre se $I_{ij} < 0$, antagonismo ocorre se $I_{ij} > 0$. Do mesmo modo, para qualquer variável que cresce com o

aumento da dose, sinergismo ocorre se $I_{ij} > 0$, antagonismo ocorre se $I_{ij} < 0$. Quando I_{ij} não for diferente de zero (não for significativo), ocorre efeito independente, ou seja, $I_{ij} = 0$, independente do crescimento ou decréscimo da variável em função do aumento da dose de Herbicida.

Para que o modelo proposto seja apropriado, toda variável resposta de crescimento deve ser transformada para logaritmo e as pressuposições da análise de variância devem ser razoavelmente bem satisfeitas na escala logarítmica, sendo a heterogeneidade de variância a mais importante (FLINT; CORNELIUS; BARRETT, 1988).

No software R (R CORE TEAM, 2020), a Equação 13 e o teste estatístico para checar se $I_{ij} \neq 0$ (Teste t) é dado pelo resultado da função *lm()* da interação entre Herbicida A e Herbicida B.

Código para demonstrar esses cálculos utilizando dados de biomassa fictícios:

```
#Carregando pacotes necessários
if(!require(dplyr)){install.packages("dplyr")}

#Carregando e armazenando os dados em "df"
#Experimento fatorial com 8 tratamentos, 5 repetições, sendo
#4 níveis do herbicida A (doses 0, 4, 8 e 12 de uma dada unidade)
#2 níveis do herbicida B (doses 0 e 10 de uma dada unidade)
#Dados de biomassa (biomass)
df <- structure(list(
  treatment = c(1,1,1,1,1,2,2,2,2,2,
    3,3,3,3,3,4,4,4,4,4,
    5,5,5,5,5,6,6,6,6,6,
    7,7,7,7,7,8,8,8,8,8),
  block = c(1,2,3,4,5,1,2,3,4,5,
    1,2,3,4,5,1,2,3,4,5,
    1,2,3,4,5,1,2,3,4,5,
    1,2,3,4,5,1,2,3,4,5),
  herbicideA = c(0,0,0,0,0,4,4,4,4,4,
    8,8,8,8,8,12,12,12,12,12,
    0,0,0,0,0,4,4,4,4,4,
    8,8,8,8,8,12,12,12,12,12),
  herbicideB = c(0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
    0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,
    10,10,10,10,10,10,10,10,10,10,
    10,10,10,10,10,10,10,10,10,10),
  biomass = c(4.293,4.384,3.792,4.061,4.453,
    2.451,2.7277,2.528,2.960,2.586,
    1.951,1.928,1.826,1.984,1.954,
    1.091,1.098,1.088,1.091,1.092,
    1.415,1.679,1.396,1.355,1.429,
    3.929,3.838,3.979,4.123,3.956,
    1.708,1.238,1.283,1.879,1.436,
    0.008,0.016,0.052,0.019,0.018)),
  row.names = c(NA,40L), class = c("tbl_df", "tbl", "data.frame"))
```

```

#Armazenando os níveis de herbicida A e herbicida B como fatores
df$herbicideA <- as.factor(df$herbicideA)
df$herbicideB <- as.factor(df$herbicideB)

#Boxplot dos dados
boxplot(biomass ~ treatment, data = df)

#Gerar logarítimos dos dados de biomassa
df <- df %>% mutate(LnBio = log(biomass))

#Gerar tabela com as médias por tratamentos de biomassa e log(biomassa)
df_medias <- df %>% group_by(df %>% select(-c(block,biomass,LnBio))) %>%
  summarise(med_biomass = round(mean(biomass),4), med_LnBio = round(mean(LnBio),4))
%>%
  as.data.frame(); df_medias

#Flint(1988)
m1 <- lm(log(biomass) ~ herbicideA*herbicideB, data = df)
summary(m1)
plot(residuals(m1))
qqnorm(resid(m1));qqline(resid(m1), col = 2,lty=2)

```

Tabela 16. Média de Biomassa em unidade arbitrária e do Logaritmo neperiano (Ln) da biomassa para cada tratamento usado neste exemplo (dados fictícios).

Tratamento	Dose Herbicida A	Dose Herbicida B	Média Biomassa	Média Ln(Biomassa)
1	0	0	4,1966	1,4326
2	4	0	2,6505	0,9725
3	8	0	1,9286	0,6564
4	12	0	1,0920	0,0880
5	0	10	1,4548	0,3719
6	4	10	3,965	1,3772
7	8	10	1,5088	0,3981
8	12	10	0,0226	-3,9801

A seguir, o resultado do R para o modelo linear que possibilita testar a significância da interação entre os herbicidas segundo Flint, Cornelius e Barrett (1988):

```

>Coefficients:
>
> Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
> (Intercept) 1.4326 0.1117 12.820 3.77e-14 ***
>herbicideA4 -0.4600 0.1580 -2.911 0.00651 **
>herbicideA8 -0.7762 0.1580 -4.912 2.57e-05 ***
>herbicideA12 -1.3446 0.1580 -8.508 1.01e-09 ***
>herbicideB10 -1.0606 0.1580 -6.712 1.41e-07 ***
>herbicideA4:herbicideB10 1.4653 0.2235 6.557 2.19e-07 ***
>herbicideA8:herbicideB10 0.8024 0.2235 3.590 0.00109 **
>herbicideA12:herbicideB10 -3.0075 0.2235 -13.457 1.01e-14 ***
>---
>Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

```

O *Estimate* do (*Intercept*) é a média do tratamento com os níveis zero para cada Herbicida, ou seja, é a média dos logaritmos das repetições da testemunha (Tabela 16, Tratamento 1). A média dos logaritmos de cada Herbicida aplicado isoladamente é resultado da soma do *Estimate* da testemunha com o *Estimate* para o Herbicida isolado em sua respectiva dose. Por exemplo, $1,4326 - 0,4600 = 0,9726$ é aproximadamente a média dos logaritmos para o Herbicida A na dose 4 (Tabela 16, Tratamento 2). Para o Herbicida B na dose 10 (única dose do Herbicida B), a média dos logaritmos é aproximadamente $1,4326 - 1,0606 = 0,372$ (Tabela 16, Tratamento 5).

Para as interações (Tratamentos 6, 7, e 8), o valor do *Estimate* da saída do R é o valor I_{ij} (Equação 13).

Na associação entre o Herbicida A na dose 4 e o Herbicida B na dose 10, temos o *Estimate* 1,4653 que é igual aproximadamente ao resultado de $1,3772 - 0,9725 - 0,3719 + 1,4326$ (Tabela 16, Tratamentos 6, 2, 5 e 1, respectivamente). Esse valor é positivo e significativo (p -valor $< 0,001$), indicando antagonismo para essa associação.

Na associação entre o Herbicida A na dose 12 e o Herbicida B na dose 10, temos o *Estimate* -3,0075 que é igual aproximadamente ao resultado de $-3,9801 - 0,0880 - 0,3719 + 1,4326$ (Tabela 16, Tratamentos 8, 4, 5 e 1, respectivamente). Esse valor é negativo e significativo (p -valor $< 0,001$), indicando sinergismo para essa associação.

Na saída do R, o valor t (*t value*) é resultado da divisão do *Estimate* pelo Erro padrão (*Std. Error*) e $Pr(> |t|)$ testa se esse valor é diferente de zero. É possível incorporar efeitos aleatórios ao modelo, como diferentes experimentos com os mesmos tratamentos. Isso deve impactar somente o valor do Erro Padrão, que impacta no valor t , dando maior segurança no resultado de uma análise conjunta de experimentos. Nesse caso, no R, deve ser usada a função `lmer()` e o modelo adequado.

Vale a pena frisar que, se a Equação 10 não é válida para a variável resposta utilizada, a interpretação apresentada aqui também não é válida. Esse é o caso da variável % de Controle em relação à média de biomassa da testemunha, que é exemplificado pelo código que segue:

```

#Média da testemunha
avg_bio_utc <- mean(df$biomass[df$treatment=="1"])
avg_LnBio_utc <- mean(df$LnBio[df$treatment=="1"])

#Gerar % de Controle Calculada com base na média da testemunha
df <- df %>% mutate(Controle_perc = if_else(treatment == "1", 0,100-(biomass/avg_bio_utc)*100)) %>%
  mutate(Controle_LnBio_perc = if_else(treatment == "1", 0,100-(LnBio/avg_LnBio_utc)*100))

```

```
#Boxplot dos dados
boxplot(Controle_perc ~ treatment, data = df)

#Flint(1988)
m2 <- lm(log(Controle_perc+1) ~ herbicideA*herbicideB, data = df)
summary(m2)
```

APÊNDICE H. Demonstração e códigos em R para exemplificar uma isobole desbalanceada.

No exemplo a seguir, a partir de dados fictícios de crescimento relativo, tem-se dois produtos, A e B, aplicados isoladamente e em 3 misturas com o objetivo de se obter uma contribuição virtual dos dois herbicidas de 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100. Porém, a dose efetiva DE50 para o herbicida A foi maior do que a esperada.

```
#Carregando pacotes
if(!require(dplyr)){install.packages("dplyr")}
if(!require(drc)){install.packages("drc")}
#Salvar parâmetros gráficos
opar <- par()
#Dados
df <- data.frame(
  ia = c(
    "A", "A",
    "A", "A", "A", "A", "A", "A", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75",
    "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75",
    "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75", "B25_A75",
    "B25_A75", "B25_A75", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50",
    "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50",
    "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50", "B50_A50",
    "B50_A50", "B50_A50", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25",
    "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25",
    "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25", "B75_A25",
    "B75_A25", "B75_A25", "B", "B",
    "B", "B", "B", "B", "B", "B", "B", "B", "B", "B", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test",
    "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test",
    "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test", "Test"),
  ppm = c(
    0.5, 0.5, 0.5, 0.1, 0.1, 0.1, 0.02, 0.02, 0.02, 0.004, 0.004, 0.004, 8e-04,
    8e-04, 8e-04, 16e-05, 16e-05, 16e-05, 32e-05, 32e-05, 32e-05, 0.5, 0.5, 0.5, 0.1,
    0.1, 0.1, 0.02, 0.02, 0.02, 0.004, 0.004, 0.004, 8e-04, 8e-04, 8e-04, 16e-05, 16e-
    05, 16e-05, 32e-05, 32e-05, 32e-05, 0.5, 0.5, 0.5, 0.1, 0.1, 0.1, 0.02, 0.02, 0.02,
    0.004, 0.004, 0.004, 8e-04, 8e-04, 8e-04, 16e-05, 16e-05, 16e-05, 32e-05, 32e-05,
    32e-05, 0.5, 0.5, 0.5, 0.1, 0.1, 0.1, 0.02, 0.02, 0.02, 0.004, 0.004, 0.004, 8e-04,
    8e-04, 8e-04, 16e-05, 16e-05, 16e-05, 32e-05, 32e-05, 32e-05, 0.5, 0.5, 0.5, 0.1,
    0.1, 0.1, 0.02, 0.02, 0.02, 0.004, 0.004, 0.004, 8e-04, 8e-04, 8e-04, 16e-05, 16e-
    05, 16e-05, 32e-05, 32e-05, 32e-05, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,
    0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0),
  ppm_isolado = c(
    0.5, 0.5, 0.5, 0.1, 0.1, 0.1, 0.02, 0.02, 0.02, 0.004, 0.004, 0.004, 8e-04,
    8e-04, 8e-04, 0.00016, 0.00016, 0.00016, 3.2e-05, 3.2e-05, 3.2e-05, 1.625, 1.625,
    1.625, 0.325, 0.325, 0.325, 0.065, 0.065, 0.065, 0.013, 0.013, 0.013, 0.0026, 0.0026,
    0.0026, 0.00052, 0.00052, 0.00052, 0.000104, 0.000104, 0.000104, 2.75, 2.75, 2.75,
    0.55, 0.55, 0.55, 0.11, 0.11, 0.11, 0.022, 0.022, 0.022, 0.0044, 0.0044, 0.0044,
```



```

    broken = TRUE)

#Adicionando legenda
usr <- par("usr")
xlegend <- 0.1*exp(usr[2])
ylegend <- 0.95*usr[4]
par(cex = 0.95)
legend(xlegend, ylegend, c("A", "B", "Test"),
      bty = "n", lty = c(1,2,0), pch = c(1,3,2))
par(opar)
#Ajustando modelo com todas as misturas testadas
m <- drm(cr ~ ppm, pct,
      fct=LL.4(),
      data = df_analysis,
      pmodels = list(~factor(pct),~1,~1, ~factor(pct)))
modelFit(m)
summary(m)
plot(m,
      main=paste("Reg. Log. 4 parâmetros - max e min iguais", " ", sep=" "),
      xlim = c(0,10), legend = TRUE, broken = TRUE)
m.isoboles.dist <- m
#Calculando a distribuição das curvas na isobole
#Para descobrir a real relação encontrada entre potências, é necessário
coletar os
#coeficientes da regressão a partir dos dados da mistura
#e estabelecer a relação entre o ED50 dos herbicidas isolados
#ED50 e:0 e ED50 e:100
coef_array <- coef(summary(m.isoboles.dist))

#ED50 para e:100
ED50e100 <- coef_array["e:100", "Estimate"]
#ED50 para e:0
ED50e0 <- coef_array["e:0", "Estimate"]

#Onde a potência esperada do herbicida e:100 é 25%
pct25_real <- round((ED50e100*.25)/((ED50e100*.25)+(ED50e0*.75))*100, digits
= 0)
pct25_real

#Onde a potência esperada do herbicida e:100 é 50%
pct50_real <- round((ED50e100*.5)/((ED50e100*.5)+(ED50e0*.5))*100, digits =
0)
pct50_real

#Onde a potência esperada do herbicida e:100 é 75%

```

```

pct75_real <- round((ED50e100*.75)/((ED50e100*.75)+(ED50e0*.25))*100, digits
= 0)

pct75_real

#Transformar a coluna original "pct" em "pct_alvo"
#Criar uma coluna "pct" com os valores reais calculados a partir dos ED50s
encontrados no experimento

#Renomeando a coluna "pct" para "pct_alvo"
colnames(df_analysis)[which(names(df_analysis) == "pct")] <- "pct_alvo"
#Criando nova coluna "pct" com os dados pctXX_real
df_analysis <- tibble(df_analysis)
df_analysis <- df_analysis %>%
  mutate(pct = case_when(pct_alvo == 75 ~ pct75_real,
    pct_alvo == 50 ~ pct50_real,
    pct_alvo == 25 ~ pct25_real,
    pct_alvo == 0 ~ 0,
    pct_alvo == 100 ~ 100,
    pct_alvo == 999 ~ 999
  ))

#Recalculando o modelo com as pct reais
m <- drm(cr ~ ppm, pct,
  fct=LL.4(),
  data = df_analysis,
  pmodels = list(~factor(pct),~1,~1, ~factor(pct)))

#Especificar qual modelo será usado como padrão para isobole
modelFreeI50 <- m

#Calculando taxa de troca
ExchangeValue.denominator <- coef(summary(modelFreeI50))["e:0","Estimate"]
ExchangeValue <- ExchangeValue.numerator/ExchangeValue.denominator

#Plotar a isobole ADM teórico
isobole(modelFreeI50, cifactor = 1,xaxis = "100", exchange = ExchangeValue,
  xlim = c(0,0.028), ylim = c(0,0.28),
  ylab = "B (ppm)",
  xlab = "A (ppm)",
  main=paste("Isobole para ED50 - modelo ADM teórico", "", sep=" "),
  sub = "Isobole desbalanceada ")

#Plotar a linha teórica de aditividade
usr <- par("usr")
exchangef <- ExchangeValue
rowIC0 <- which(rownames(summary(modelFreeI50)$coefficients) == "e:0")
rowIC100 <- which(rownames(summary(modelFreeI50)$coefficients) == "e:100")
colEstimate <- which(colnames(summary(modelFreeI50)$coefficients) ==
"Estimate")

IC50_0 <- summary(modelFreeI50)$coefficients[rowIC0,colEstimate]
IC50_100 <- summary(modelFreeI50)$coefficients[rowIC100,colEstimate]
#slope = DE50 eixo X/DE50 eixo Y

```

```

#Exchange (Taxa de troca) é feita no eixo Y
slope <- (IC50_100/(IC50_0*exchangef))
clip(usr[1],IC50_100,0,IC50_0*exchangef)
abline(a = (IC50_0*exchangef) , b = -slope^(-1), lwd = 2, lty = 2, col =
"black")
do.call("clip", as.list(usr)) # reset

```

Como observado na Figura 27, as misturas reais não foram uniformemente distribuídas ao longo da isobole.

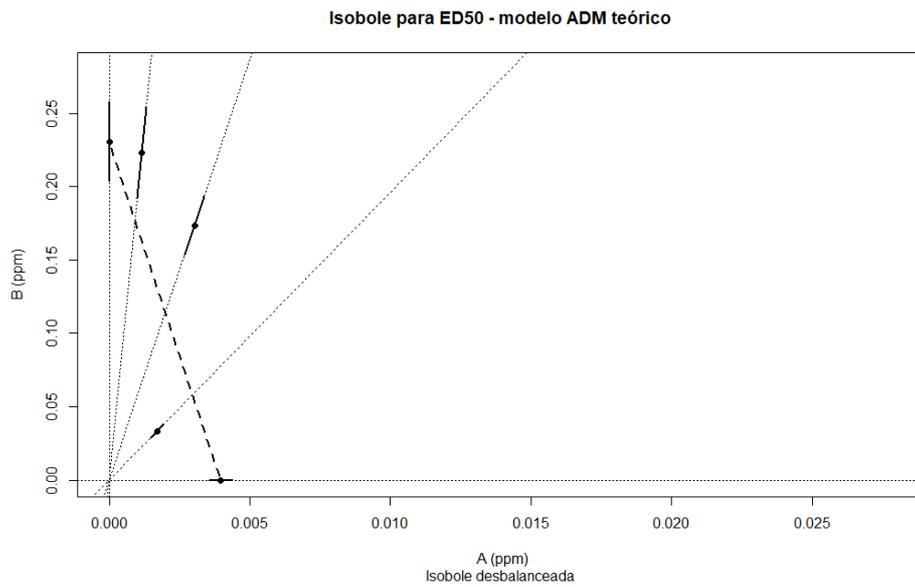


Figura 27. Isobole para Dose Efetiva de 50% (ED50) de uma mistura fictícia de dois herbicidas, A e B, representando um desbalançamento das doses utilizadas na mistura.