

ALYSSON DIAS DALMAS

DINÂMICA DO HERBICIDA FOMESAFEN EM PLANTAS DE *Bidens subalternans*

Botucatu

2025

ALYSSON DIAS DALMAS

DINÂMICA DO HERBICIDA FOMESAFEN EM PLANTAS DE *Bidens subalternans*

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Proteção de Plantas).

Orientador: Prof. Dr. Caio Antonio Carbonari

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Alcántara-de la Cruz

Botucatu

2025

D148d	Dalmas, Alysson Dias Dinâmica do herbicida fomesafen em plantas de <i>Bidens subalternans</i> / Alysson Dias Dalmas. – Botucatu, 2025 84 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agronômicas, Botucatu Orientador: Caio Antonio Carbonari Coorientador: Ricardo Alcántara-de la Cruz 1. inibidores da PROTOX. 2. absorção de herbicidas. 3. estresse oxidativo. 4. reprogramação metabólica. 5. metodologia de estudos. I. Título.
-------	--

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título:

DINÂMICA DO HERBICIDA FOMESAFEN EM PLANTAS DE *Bidens subalternans*

AUTOR: ALYSSON DIAS DALMAS

ORIENTADOR: CAIO ANTONIO CARBONARI

COORIENTADOR: RICARDO ALCÁNTARA-DE LA CRUZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Agronomia
(Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. CAIO ANTONIO CARBONARI (Participação Presencial)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas - Unesp Botucatu



Pesquisador Dr. RENATO NUNES COSTA (Participação Presencial)
Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento / BioAtiva



Prof. Titular EDIVALDO DOMINGUES VELINI (Participação Presencial)
Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agronômicas - Unesp Botucatu

Botucatu, 18 de julho de 2025.

*Aos meus amados pais,
Vanessa e Ilton,
dedico*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, por toda oportunidade de crescimento, levando-me a uma vida que vale a pena ser vivida.

Aos meus pais, Ilton José Dalmas e Vanesca Evangelista Dias Dalmas, por todo apoio, carinho e amor, que me permitiram caminhar rumo aos meus sonhos. Sou muito grato por ser seu filho, obrigado mãe e pai.

Aos meus avós, Carmelita Aguiar Dias e Dorival Evangelista Dias, pelo exemplo de vida e de fé, sem vocês minha caminhada não haveria sentido.

À minha família, agradeço especialmente a cada um, meus irmãos Eduardo e Lucas, meus avós Abrelina e João, meus tios Vinícios e Antônio, minhas tias Edvane e Franciele, aos meus primos e todos que constituem o que é mais importante para mim, obrigado pelo apoio e incentivo.

À minha namorada Vanessa Despres, pelos momentos de amor, alegria e compreensão durante esse período de pós-graduação, obrigado por ser meu suporte.

Ao professor, Dr. Caio Antonio Carbonari, pelas considerações valiosas, pela orientação criteriosa, pelo apoio acadêmico durante esta pesquisa e pela confiança depositada.

Ao professor, Dr. Edivaldo Domingues Velini, pelas considerações no meu trabalho, pelos desafios em novos estudos e pelo conhecimento compartilhado.

Ao professor, Dr. Ricardo Alcántara-de la Cruz, pela amizade, pelos conselhos de vida e pelas trocas de informações valiosas para minha formação.

Aos meus amigos, Aleixa, Augusto, Diego, Erick, Fernanda, Gabriel, Gisleide, Inara, Junior, Kleber, Mariana, Marina, Raphael, Renato, Rodrigo, Saulo, Stephanie e demais amigos, obrigado pela convivência, vocês fazem parte desse trabalho como ninguém.

Aos técnicos e amigos do Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), José Roberto, José Guilherme e Marcelo Siono, por todos os momentos de convivência e por toda ajuda durante a condução dos experimentos.

Ao Laboratório de Fisiologia Vegetal II, da UNESP, pela valiosa parceria e pela contribuição nas análises bioquímicas que viabilizaram este trabalho.

À Bayer, pela parceria estabelecida e pela disponibilização dos materiais e recursos que viabilizaram o desenvolvimento desta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

RESUMO

A compreensão dos fatores intrínsecos ao uso de herbicidas inibidores da PROTOX, como o fomesafen, é relevante diante do surgimento de novas tecnologias associadas a esse mecanismo de ação e da necessidade de explorar métodos mais precisos de avaliação da eficácia desses produtos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a dinâmica do herbicida fomesafen em plantas de *Bidens subalternans*. O estudo foi realizado em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado, avaliando curva de dose-resposta, absorção (2023 e 2025), sistema antioxidante, bloqueadores da P450, doses fracionadas e metabolômica em aplicações de fomesafen. Foram realizadas aplicações quando as plantas estavam com quatro a seis folhas verdadeiras. Dose-resposta em concentrações de fomesafen a 0 (0%); 15,625 (6,25%); 31,25 (12,5%); 62,5 (25%); 125 (50%); 250 (100%); 500 (200%); 1000 (400%); 2000 (800%) e 4000 (1600%) (g i.a. ha⁻¹), avaliando controle e taxa de transporte de elétrons aos 1, 3, 7, 14 e 21 DAA e massa seca. Absorção foi avaliada às 2 e 24 horas após a aplicação (HAA), quantificando os teores internos e externos de fomesafen. Atividade enzimática, como SOD, CAT, POD e peroxidação de lipídeos, às 2 HAA e em plantas controle. Bloqueadores da P450 como malathion (1000 g i.a. ha⁻¹) e dietholate (240 g i.a. ha⁻¹) com fomesafen, avaliando controle aos 7, 14 e 21 DAA e massa seca. Doses fracionadas de fomesafen em quatro aplicações (0,625 e 0,625+ g i.a. ha⁻¹) avaliando controle a cada três dias após a aplicação. Análise de metabolômica realizada no controle e após 24 horas da aplicação. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, quando significativos, ao teste de média t student (LSD), a um nível de 5% de significância. Doses acima de 1000 g i.a. ha⁻¹ foram necessárias para atingir 100% de controle de *Bidens subalternans* aos 21 DAA, enquanto a dose comercial recomendada (250 g i.a. ha⁻¹), mostrou eficácia limitada, com percentuais de 43% de controle e 81% de redução de massa seca, aos 21 DAA. A taxa de transporte de elétrons (ETR), avaliada ao primeiro dia após a aplicação, foi reduzida para 56, 77 e 72%, em relação à testemunha nas doses de 1000, 250 e 31,25 g i.a. ha⁻¹, respectivamente. A absorção de fomesafen foi baixa em ambos os anos de estudo, variando de 4 a 6% nas primeiras 24 HAA, mantendo-se constante, o que indica a necessidade de prolongar os períodos de coleta. A atividade da SOD, CAT, POD e peroxidação lipídica não apresenta diferenças significativas nas primeiras 2 HAA, sugerindo que avaliações em tempos maiores seriam mais

adequadas. Doses fracionadas de fomesafen, quando aplicadas cumulativamente, podem gerar efeito de controle significativo em *Bidens subalternans*, entre 33 e 38% aos 3 dias após a quarta aplicação, mesmo que em doses muito baixas. Quando aplicado em associação a inibidores da enzima Citocromo P450, o fomesafen apresentou maior eficácia, de até 99% aos 21 DAA. A análise de metabolômica indicou uma alteração metabólica, em resposta ao estresse químico do fomesafen, amplificando uma variedade de compostos não encontrados na testemunha sem aplicação. Assim, conclui-se que o fomesafen apresenta baixa absorção e eficácia limitada na dose comercial, sendo mais eficaz em altas doses ou associado a inibidores da P450, enquanto doses fracionadas mostraram efeito cumulativo, e a metabolômica revelou reprogramação metabólica em populações de *Bidens subalternans* avaliadas neste estudo, indicando necessidade de metodologias mais precisas para estudos com inibidores da PROTOX.

Palavras-chave: inibidores da PROTOX; absorção de herbicidas; estresse oxidativo; reprogramação metabólica; metodologia de estudos.

ABSTRACT

Understanding the intrinsic factors related to the use of PROTOX-inhibiting herbicides, such as fomesafen, is relevant given the emergence of new technologies associated with this mechanism of action and the need to explore more precise methods for evaluating the efficacy of these products. Thus, the objective of this study was to evaluate the dynamics of the herbicide fomesafen in *Bidens subalternans* plants. The study was conducted in a greenhouse, in a completely randomized design, assessing dose–response curves, absorption (2023 and 2025), antioxidant system activity, P450 inhibitors, split doses, and metabolomics after fomesafen application. Applications were carried out when plants had four to six true leaves. The dose–response experiment included fomesafen rates of 0 (0%), 15.625 (6.25%), 31.25 (12.5%), 62.5 (25%), 125 (50%), 250 (100%), 500 (200%), 1000 (400%), 2000 (800%), and 4000 (1600%) g a.i. ha⁻¹, with evaluations of weed control and electron transport rate (ETR) at 1, 3, 7, 14, and 21 days after application (DAA), as well as dry mass. Absorption was measured at 2 and 24 hours after application (HAA), quantifying internal and external fomesafen content. Enzymatic activity (SOD, CAT, POD) and lipid peroxidation were evaluated at 2 HAA and in control plants. P450 inhibitors such as malathion (1000 g a.i. ha⁻¹) and dietholate (240 g a.i. ha⁻¹) were applied with fomesafen, and control was assessed at 7, 14, and 21 DAA along with dry mass. Split doses of fomesafen were tested in four sequential applications (0.625 and 0.625+ g a.i. ha⁻¹), with control evaluated every three days after application. Metabolomic analysis was conducted in untreated plants (control) and at 24 HAA. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and, when significant, to mean comparison by Student's t-test (LSD) at a 5% significance level. Doses above 1000 g a.i. ha⁻¹ were required to achieve 100% control of *Bidens subalternans* at 21 DAA, while the recommended commercial dose (250 g a.i. ha⁻¹) was insufficient, providing only 43% control and 81% dry mass reduction at 21 DAA. ETR, measured one day after application, was reduced to 56, 77, and 72% compared with the untreated control at doses of 1000, 250, and 31.25 g a.i. ha⁻¹, respectively. Fomesafen absorption was low in both years of study, ranging from 4 to 6% during the first 24 HAA and remaining stable thereafter, indicating the need for longer sampling periods. The activity of SOD, CAT, POD, and lipid peroxidation showed no significant changes at 2 HAA, suggesting

that later sampling times would be more appropriate. Split doses of fomesafen, when applied cumulatively, promoted significant control of *Bidens subalternans*, ranging from 33 to 38% three days after the fourth application, even at very low doses. When applied in association with cytochrome P450 inhibitors, fomesafen achieved up to 99% control at 21 DAA. Metabolomic analysis revealed metabolic alterations in response to fomesafen-induced chemical stress, with the amplification of a variety of compounds not detected in untreated plants. Thus, it is concluded that fomesafen exhibits low absorption and limited efficacy at the commercial dose, being more effective at higher doses or when associated with P450 inhibitors, while split applications showed a cumulative effect, and metabolomic analysis revealed metabolic reprogramming in *Bidens subalternans* populations evaluated in this study, indicating the need for more precise methodologies for studies involving PROTOX inhibitors.

Keywords: PROTOX inhibitors; herbicide absorption; oxidative stress; metabolic reprogramming; methodological approaches.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Comparação morfológica entre *Bidens subalternans* e *Bidens pilosa*: número de aristas por aquênio e detalhe da inflorescência de *B. subalternans*.....27
- Figura 2 - Representação esquemática da via das porfirinas no cloroplasto: setas contínuas indicam etapas enzimáticas únicas, enquanto as setas tracejadas representam múltiplas etapas enzimáticas30
- Figura 3 – Mecanismo de ação de herbicidas inibidores da protoporfirinogênio IX oxidase (PPO), evidenciando o bloqueio enzimático e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs)31
- Figura 4 - Temperatura máxima e mínima registrada no interior da casa de vegetação, obtidas por datalogger RC-5 (Elitech®), durante o período experimental38
- Figura 5 – Procedimentos de aplicação dos tratamentos experimentais: a) simulador de aplicação de produtos fitossanitários; b) preparo das caldas; c) plantas de *Bidens subalternans* em pós-aplicação.....39
- Figura 6 - Procedimento de medição da taxa de transporte de elétrons (ETR) em folhas expostas à luz solar utilizando fluorômetro portátil OS5p (Opti Sciences®).....40
- Figura 7 – Representação das etapas de preparação para análise de absorção de fomesafen por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC): a) Aplicação de fomesafen em *Bidens subalternans*; b) Corte das folhas e condicionamento em sacos plásticos; c) Maceração em nitrogênio líquido; d) Pesagem da alíquota; e) Extração com solução extratora; e, f) Determinação dos teores de fomesafen.....41
- Figura 8 - Cromatograma obtido para uma injeção de 10 µL do padrão analítico de fomesafen.....43
- Figura 9 - Curva padrão de caseína para determinação da concentração de proteínas solúveis, segundo método de Bradford (1976).....44
- Figura 10 - Resumo das metodologias utilizadas para a análise de enzimas antioxidantes em *Bidens subalternans*.....46
- Figura 11 - Metodologia de aplicação de doses fracionadas de fomesafen em *Bidens subalternans*, com repetições a cada três dias: a) Plantas de *B. subalternans* com 8 folhas verdadeiras; b) Preparo de calda com concentrações fracionadas de fomesafen; c) Imersão das plantas na solução; e, d) Avaliação visual do controle (%).47

Figura 12 - Curvas dose–resposta de fomesafen em <i>Bidens subalternans</i> , expressas em controle visual (%) aos: a) 1 DAA; b) 3 DAA; c) 7 DAA; d) 14 DAA; e) 21 DAA	52
Figura 13 - Redução percentual da massa seca de <i>Bidens subalternans</i> em relação à testemunha, para diferentes doses de fomesafen	53
Figura 14 - Variação percentual da taxa de transporte de elétrons (ETR) em relação à testemunha, para diferentes doses de fomesafen, ao longo dos períodos avaliados.....	55
Figura 15 - Teor interno e externo de fomesafen (250 g i.a. ha ⁻¹) em plantas de <i>Bidens subalternans</i> em diferentes tempos após aplicação (2 e 24 HAA) – ciclo experimental de 2023	57
Figura 16 - Teor interno e externo de fomesafen (250 g i.a. ha ⁻¹) em plantas de <i>Bidens subalternans</i> em diferentes tempos após aplicação (2 e 24 HAA) – ciclo experimental de 2025	58
Figura 17 – Atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica em <i>Bidens subalternans</i> tratadas com fomesafen (250 g i.a. ha ⁻¹) e testemunha: a) superóxido dismutase (SOD); b) catalase (CAT); c) peroxidase (POD); d) peroxidação lipídica (LIPO).....	62
Figura 18 - Sintomas visuais em <i>Bidens subalternans</i> submetidas a doses fracionadas de fomesafen: a) 3 dias após 1ª aplicação (3DA1A); b) 3DA2A; c) 3DA3A; d) 3DA4A	64
Figura 19 - Sintomas visuais da aplicação de bloqueadores da P450 associados ao fomesafen em <i>Bidens subalternans</i> : a) 7 DAA; b) 14 DAA; c) 21 DAA .	67
Figura 20 - Redução percentual da massa seca de <i>Bidens subalternans</i> em relação à testemunha, após aplicação de bloqueadores da P450 combinados a fomesafen	69
Figura 21 - Diagrama de Venn representando a distribuição de metabólitos detectados por LC-MS/MS Q-TOF em modo de ionização positiva para <i>Bidens subalternans</i>	70
Figura 22 - Diagrama de Venn representando a distribuição de metabólitos detectados por LC-MS/MS Q-TOF em modo de ionização negativa para <i>Bidens subalternans</i>	71
Figura 23 - Gráfico vulcão representando a reprogramação metabólica de <i>Bidens subalternans</i> após aplicação de fomesafen (250 g i.a. ha ⁻¹)	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo das propriedades físico-químicas e da estrutura química do fomesafen.....	32
Tabela 2 – Resumo das condições cromatográficas aplicadas na quantificação de fomesafen.....	42
Tabela 3 - Massa molecular e íons secundários do composto analisado	42
Tabela 4 – Controle visual (%) de <i>Bidens subalternans</i> submetidas a diferentes doses de fomesafen em curva dose–resposta, com avaliações aos 1, 3, 7, 14 e 21 dias após a aplicação (DAA)	50
Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para massa seca de <i>Bidens subalternans</i> submetidas a diferentes doses de fomesafen em curva dose–resposta	52
Tabela 6 - Análise de variância e coeficiente de variação para taxa de transporte de elétrons (ETR) em <i>Bidens subalternans</i> tratadas com fomesafen em curva dose–resposta, avaliada em diferentes períodos após aplicação	54
Tabela 7 – Análise de variância para teores interno e externo de fomesafen (250 g i.a. ha ⁻¹) em <i>Bidens subalternans</i> , avaliados em diferentes tempos após aplicação (2 e 24 HAA) – ciclo experimental de 2023	56
Tabela 8 - Análise de variância para teores interno e externo de fomesafen (250 g i.a. ha ⁻¹) em <i>Bidens subalternans</i> , avaliados em diferentes tempos após aplicação (2 e 24 HAA) – ciclo experimental de 2025	58
Tabela 9 - Análise de variância para peroxidação de lipídios (LIPO) (MDA x 10 ³ , nmol g massa fresca ⁻¹), atividade da superóxido dismutase (SOD, U x 10 ⁻³ mg ⁻¹ de proteína), atividade da catalase (CAT, µKat µg ⁻¹ de proteína), atividade da peroxidase (POD, µmol de purpurogalina min ⁻¹ mg ⁻¹ de proteína).....	61
Tabela 10 - Controle visual (%) de <i>Bidens subalternans</i> submetidas a doses fracionadas de fomesafen, com avaliações sequenciais a cada 3 dias após cada aplicação.....	64
Tabela 11 - Controle visual (%) de <i>Bidens subalternans</i> submetidas à aplicação de fomesafen (250 g i.a. ha ⁻¹) em associação a bloqueadores da P450, com avaliações aos 7, 14 e 21 DAA	66
Tabela 12 - Análise de variância para massa seca de <i>Bidens subalternans</i> submetidas à aplicação de fomesafen (250 g i.a. ha ⁻¹) em associação a bloqueadores da P450	68

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ETR	Taxa de Transporte de Elétrons
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LIPO	Peroxidação de Lipídios
BIDSU	<i>Bidens subalternans</i>
CV	Coeficiente de Variação
DAA	Dias Após a Aplicação
HAA	Horas Após a Aplicação
GL	Graus de Liberdade
LSD	Teste t student (Teste de Média)
QM	Quadrado Médio
CAT	Catalase
ERO / EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
MDA	Malonaldeído
P450	Citocromo P450
POD	Peroxidase
PROTOX	Protoporfirinogênio IX oxidase
SOD	Superóxido Dismutase
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
NUPAM	Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia
SBCPD	Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas
UNESP	Universidade Estadual Paulista

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
≥	Maior ou igual a
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μmol	Micromol
cm ⁻¹	Centímetro inverso
Ha	Hectare
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar (mol/L)
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min ⁻¹	Por minuto
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
Pa	Pascal

Rpm Rotações por minuto

s^{-1} Por segundo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	BIOLOGIA E MORFOLOGIA DE <i>BIDENS SUBALTERNANS</i>	27
2.2	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE PLANTAS DANINHAS	28
2.3	INIBIDORES DA PROTOPORFIRINOGENO IX OXIDASE (PROTOX): FOMESAFEN	29
2.4	DINÂMICA DE HERBICIDAS EM PLANTAS	33
2.4.1	<i>Absorção de herbicidas</i>	33
2.4.2	<i>Metabolização de herbicidas</i>	34
2.4.3	<i>Enzimas antioxidantes: SOD, CAT e POD</i>	35
2.5	METABOLÔMICA: FERRAMENTA PARA O ESTUDO DE PLANTAS DANINHAS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	CONDIÇÕES GERAIS DO EXPERIMENTO	37
3.2	EXPERIMENTO 1: CURVA DOSE-RESPOSTA	39
3.3	EXPERIMENTO 2: ABSORÇÃO DE FOMESAFEN	40
3.4	EXPERIMENTO 3: ANÁLISES BIOQUÍMICAS (SOD, CAT, POD E MDA)	43
3.5	EXPERIMENTO 4: DOSES FRACIONADAS DE FOMESAFEN	46
3.6	EXPERIMENTO 5: BLOQUEADORES DA P450	47
3.7	METABOLÔMICA	48
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	EXPERIMENTO 1: CURVA DOSE-RESPOSTA	50
4.2	EXPERIMENTO 2: ABSORÇÃO DE FOMESAFEN	56
4.3	EXPERIMENTO 3: ANÁLISES BIOQUÍMICAS (SOD, CAT, POD E MDA)	60
4.4	EXPERIMENTO 4: DOSES FRACIONADAS DE FOMESAFEN	63
4.5	EXPERIMENTO 5: BLOQUEADORES DA P450	65
4.6	METABOLÔMICA	70
5	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Bidens spp. é o gênero de plantas daninhas com grande relevância no cenário agrícola (Karis; Ryding, 1994), dentre as 230 espécies do gênero, *Bidens pilosa* e *Bidens subalternans* são as espécies de maior ocorrência e importância para agricultura. São pertencentes a família Asteraceae, sendo plantas anuais com propagação especialmente por sementes, presentes em culturas anuais e perenes (Rzedowski; Rzedowski, 2008). Tem diversos relatos de resistência a herbicidas, sendo primeiro em 1991 como resistente ao herbicida paraquat, no Quênia e ao glyphosate no México em 2014 (HEAP, 2025). No entanto, mais recentemente, foram encontradas algumas populações de *Bidens pilosa* com resistência aos inibidores da PROTOX, característica que aumenta a severidade no manejo dessa importante planta daninha.

Os herbicidas inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) são amplamente utilizados para o controle de plantas daninhas de folha larga (Merotto Jr.; Vidal, 2001; Osipe *et al.*, 2011). Desse modo, pelo alto emprego dos herbicidas desse mecanismo de ação, houve a seleção de diversas populações de plantas daninhas resistentes (HEAP, 2025). Fomesafen é um herbicida representante dos inibidores da PROTOX. No Brasil, o fomesafen possui autorização como herbicida de pós-emergência nas plantações de soja e feijão, destinado ao controle de plantas de folhas largas, tais como *Amaranthus* spp. (caruru), *Bidens* spp. (picão-preto), *Euphorbia heterophylla* (amendoim-bravo), *Ipomoea* spp. (corda-de-viola) (Oliveira Neto *et al.*, 2018). Posteriormente, sua autorização foi ampliada para incluir aplicações em pré-emergência nas plantações de algodão, com o objetivo de controlar *Physalis angulata* (joá-de-capote) e *Amaranthus deflexus* (caruru) (Oliveira Neto *et al.*, 2018).

Estratégias adequadas de manejo são essenciais para desacelerar ou evitar a resistência, com intermédio do conhecimento dos fatores ecológicos, que propulsionam a seleção de organismos resistentes (Neve *et al.*, 2014). Nesse sentido, o uso intensivo de herbicidas vem comprometendo a disseminação da resistência a diversas moléculas, reforçando a necessidade de estudos aprofundados sobre os mecanismos de ação e fatores correlacionados a dinâmica dos herbicidas em plantas (Peterson, 2018; Switzer, 1963). Moléculas mais recentes, como o tiafenacil e outros inibidores da enzima PROTOX, vêm sendo inseridas no mercado com o objetivo de ampliar o controle de plantas daninhas resistentes. No entanto, o uso inadequado

dessas novas tecnologias pode acarretar riscos, com o surgimento de resistência e, consequentemente, perda de tecnologias e impactos econômicos significativos.

Nesse contexto, o emprego de ferramentas analíticas avançadas, como a metabolômica, têm fornecido possibilidades para ampliar o conhecimento de alterações metabólicas induzidas por herbicidas em plantas daninhas. Essa abordagem fornece a compreensão aproximada das repostas bioquímicas das espécies, correlacionando-as com estresses químicos ocasionados pela ação de herbicidas (Aliferis; Chrysai-Tokousbalides, 2011; Olanrewaju *et al.*, 2024). Desse modo, a integração de ferramentas analíticas, como a metabolômica, amplia o conhecimento sobre a interação de mecanismos de ação e resistência, demonstrando-se uma ferramenta promissora para estudos de dinâmica de herbicidas.

Em síntese, para cumprir sua função biológica, o herbicida deverá ficar retido no limbo foliar, por tempo e concentração necessárias, penetrando, absorvendo e transloucando-se, por xilema ou floema, até seu sítio de ação, onde atuará em processos biológicos específicos (Cobb; Reade, 2010). Por outro lado, processos de metabolização podem ocorrer (Dimaano; Iwakami, 2020), resultando em redução ou aumento da atividade do herbicida (Rigon *et al.* 2020). Diante disso, necessita-se compreender fatores intrínsecos a dinâmicas de herbicidas em plantas daninhas com o intuito de suprir lacunas ainda existentes quanto ao comportamento dessas moléculas em diferentes espécies. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar a dinâmica do herbicida fomesafen em plantas de *Bidens subalternans*, visando ampliar a compreensão sobre o comportamento de inibidores da PROTOX em plantas daninhas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biologia e morfologia de *Bidens subalternans*

Bidens subalternans, frequentemente conhecida pelos nomes picão-preto, picão-campo, pico-pico, erva-picão, é uma planta herbácea e ereta nativa da América do Sul (Kissmann; Groth, 1992; 1999), podendo alcançar altura de até 150 cm quando há condições ambientais propícias, no entanto, em média sua altura é de 60 cm. Folhas com coloração verde e suas flores, de tonalidades brancas ou amarelas, com organização em forma de capítulos (Bartolome; Villaseñor; Yang, 2013). O ciclo dessa espécie é anual, com reprodução exclusivamente por meio de sementes, a planta é autógama, com até 10% de fecundação cruzada (Sun; Ganders, 1990). As sementes possuem forma de aquênios de coloração preta, secos e indeiscentes, com presença de aristas rígidas, que proporcionam característica vital de disseminação da espécie por meio da aderência em superfícies (Hattori; Nakajima, 2008) (Figura 1).

Figura 1 – Comparação morfológica entre *Bidens subalternans* e *Bidens pilosa*: número de aristas por aquênio e detalhe da inflorescência de *B. subalternans*



A elevada produção de sementes, em torno de 3.000 sementes por planta, é atributo de agressividade da espécie, com potencial de permanência e sobrevivência em agrossistemas (Kissmann, 1997). É uma espécie fotoblástica neutra, ou seja, a germinação da semente poderá ocorrer em condições de luminosidade ou escuridão (Klein; Fellipe, 1991). O conjunto de diversas características como a alta produção de

sementes e um curto período vegetativo (Salgado *et al.*, 2014), com a eficiência na absorção e conversão de nutrientes em biomassa (Procópio *et al.*, 2004), juntamente com a capacidade de desenvolvimento em pleno sol ou em condições difusas (Kissmann. Groth, 1999), possibilitam a presença dessas plantas ao longo de todo o ano.

Bidens subalternans, teve seu primeiro caso de resistência relatado em 1996, em regiões produtoras de soja no Brasil, especificamente aos inibidores da enzima acetolactato sintase (HEAP, 2025). Posteriormente, em 2006, foi observada resistência não apenas aos inibidores da enzima acetolactato sintase, mas também aos inibidores da enzima acetolactato sintase e do fotossistema II (PSII). Mais recentemente, em 2018, houve relatos de populações apresentando resistência aos inibidores da EPSPs no Paraguai. Além disso, no Brasil, no ano de 2023, foram registrados biótipos resistentes ao glyphosate em lavouras de milho e soja (HEAP, 2025).

2.2 Mecanismos de resistência de plantas daninhas

A duas divisões aceitas para classificar os mecanismos de resistência são relacionados ao local-alvo ou não relacionados ao local-alvo. Os mecanismos relacionados ao local-alvo, são: **a) alteração do local de ação:** onde a molécula do herbicida é comprometida pela ineficácia de ação no local específico no interior da planta (Christofoleti *et al.*, 1994). A observação do efeito da resistência é possível se, porventura, a mutação ocorrer precisamente no local de ação do herbicida (Inoue; Oliveira Jr, 2011); e, **b) superexpressão das enzimas:** mecanismo que amplifica genes participantes da rota do herbicida, que codificam enzimas desintoxicantes ou genes do próprio local de ação. Em estudos de Gaines *et al.*, (2010), descobriu-se a amplificação de genes em *Amaranthus palmeri*, com resistência confirmada ao herbicida glyphosate, duplicando os genes EPSPs de 4 a 100 vezes, quando comparados a populações suscetíveis.

Outros mecanismos não estão relacionados ao local-alvo, como: **a) aumento na capacidade de metabolização do herbicida:** sendo que plantas com esse mecanismo de resistência possuem aptidão superior a plantas suscetíveis em metabolizar moléculas de herbicidas de forma mais rápida, inativando-as previamente ao dano nas plantas (Christofoleti *et al.*, 1994); **b) absorção reduzida e translocação**

diferencial: em termos de eficácia, os herbicidas devem ser absorvidos e transloucados para seu sítio de ação. Desse modo, plantas daninhas com esses mecanismos possuem a presença de cutícula (dificultando a absorção) ou redução/aumento do movimento da molécula pela planta (Markus *et al.*, 2021) e, **c) compartimentalização:** remover as moléculas dos herbicidas de locais metabolicamente ativos e posicioná-las em locais inativos, como os vacúolos celulares ou tecidos distantes dos locais de ação do herbicida (Christofoleti *et al.*, 1994).

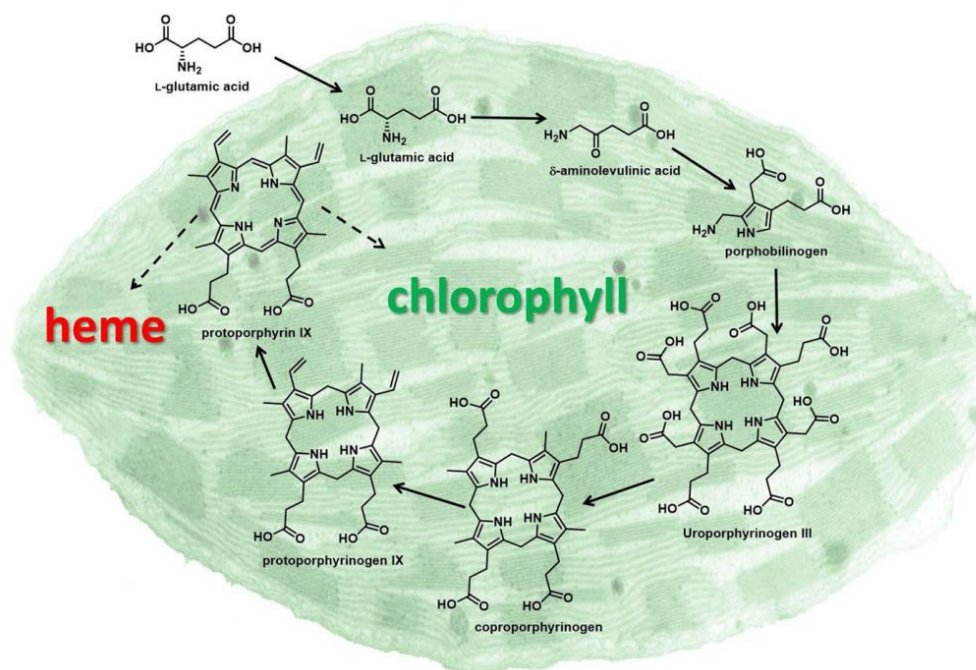
A compreensão dos mecanismos de resistência é fundamental para o posicionamento correto dos herbicidas. Em biótipos de *Amaranthus tuberculatus*, houve a compreensão do que determinaria o primeiro mecanismo de resistência aos inibidores da PROTOX, pela alteração da sequência de aminoácidos da enzima PROTOX houve a determinação da resistência, de modo que a mutação enzimática foi resultado de somente um gene nuclear com dominância incompleta (Lee *et al.*, 2008; Patzoldt *et al.*, 2006). Posteriormente, destaca-se em biótipos de *Ambrosia artemisiifolia* o segundo relato de mecanismos de resistência aos inibidores da PROTOX, que consiste na mutação enzimática da PROTOX, com a substituição de uma arginina por uma leucina na posição 98, sendo determinada por um único gene nuclear com dominância incompleta (Rousonelos *et al.*, 2012).

2.3 Inibidores da protoporfirinogênio IX oxidase (PROTOX): Fomesafen

Os inibidores da PROTOX constituem um grupo de mecanismos de ação que atuam inibindo a enzima protoporfirinogênio IX oxidase (PPO ou PROTOX), fundamental na oxidação do protoporfirinogênio IX para a formação de protoporfirina IX, um precursor essencial da clorofila (Figura 2). Ao inibir a ação da enzima, ocorre o acúmulo de protoporfirinogênio IX, resultando em sua difusão para fora do centro reativo, desencadeando uma oxidação não enzimática. Posteriormente, a interação entre O_2 e luz leva à formação de O_2^- em estado singlete, potencialmente responsável pela peroxidação de lipídios presentes nas membranas celulares. A peroxidação de lipídios e proteínas resulta na perda progressiva de clorofila e carotenoides, além de ruptura das membranas celulares, ocasionando desidratação e desintegração de organelas. Em plantas suscetíveis tratadas com herbicidas pertencentes a esse grupo, observa-se necrose foliar em um curto período (um a três dias). Nos casos de espécies tolerantes, são evidenciadas injúrias moderadas ou severas após a

aplicação pós-emergência de herbicidas inibidores da PROTOX (Oliveira Jr; Bacarin, 2011).

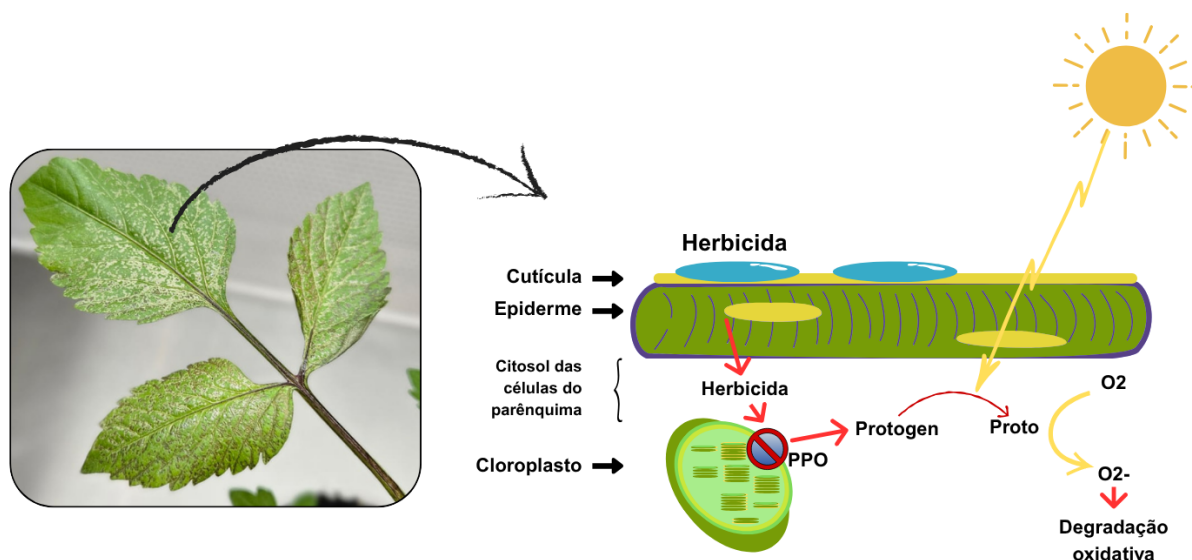
Figura 2 - Representação esquemática da via das porfirinas no cloroplasto: setas contínuas indicam etapas enzimáticas únicas, enquanto as setas tracejadas representam múltiplas etapas enzimáticas



Fonte: Barker (2023, p.174).

Em resultado a geração de oxigênio singlete, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxidos lipídicos, ocasionando a disfuncionalidade e integridade da membrana (Dayan *et al.*, 2019). Em consequência, um rápido vazamento celular é observado em atividade de difeniléteres (DPE), pela perda de integridade de membrana plasmática (Kenyon *et al.*, 1985). Plantas tratadas com herbicidas inibidores da PROTOX, necessitam de luz para desencadear seus efeitos fitotóxicos (Figura 3). Desse modo, em plantas incubadas em ambientes escuros, o acúmulo de protoporfirina é observada, podendo ser destruída quando em contato com estímulo luminoso. Em trabalhos de Becerril e Duke (1989), em plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) aplicadas com difeniléteres (DPE), observou-se o tempo de meia-vida de 2,5 h da protoporfirina em uma exposição de um quarto da luz solar.

Figura 3 – Mecanismo de ação de herbicidas inibidores da protoporfirinogênio IX oxidase (PPO), evidenciando o bloqueio enzimático e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs)



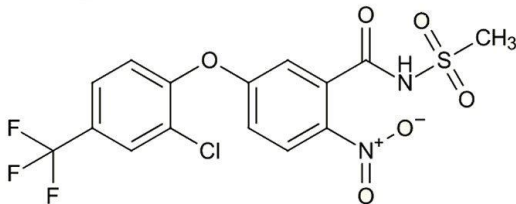
Fonte: adaptado de Barker (2023, p.174).

A maioria dos herbicidas inibidores da PROTOX são empregados em pós-emergência, embora alguns, como o sulfentrazone, possam ser empregados em pré-emergência (Dayan *et al.*, 2018). São herbicidas direcionados para o controle de folhas largas, com ação restrita sobre gramíneas em aplicações em pré-emergência. Herbicidas do grupo químico dos difeniléteres, são de caráter ácido fraco, com alta solubilidade em água (acifluorfen e fomesafen) ou não-iônico, com baixa solubilidade em água e maior adsorção ao solo (lactofen e oxyfluorfen), são usados em pós-emergência, ou em casos específicos em pré-emergência (oxyfluorfen) (Carvalho, 2013). Feniltalimidas, são não ionizáveis, com baixa solubilidade em água e reduzida persistência no solo, sendo exemplos o flumiclorac (pós-emergência) e flumioxazin (pré ou pós-emergência) (Carvalho, 2013). Oxadiazóis são não ionizáveis, com pouca solubilidade e fortemente adsorvidos ao solo (Carvalho, 2013). Triazolinonas são ácidos fracos, com baixa solubilidade em água e persistência como o carfentrazone-ethyl (pós-emergência), e alta solubilidade e alta persistência no solo como o sulfentrazone (pré-emergência) (Carvalho, 2013).

Fomesafen é uma molécula que apresenta alta solubilidade em água, atingindo 50 mg L⁻¹ a 20°C, além de exibir baixa pressão de vapor com valores inferiores a 10⁻⁴ Pa a 50°C. O log K_{ow} pode variar de 2,9 a -1,2 com variação de pH de 1 a 7, sendo

considerado um herbicida ácido fraco (sal de ácido) com pKa de 2,83 (Rodrigues; Almeida, 2005) (Tabela 1). Sua afinidade com a matéria orgânica do solo é significativa, sendo a adsorção fortemente influenciada pelo pH, dado que se trata de um composto ionizável. Além disso, a adsorção está intimamente relacionada com o teor de matéria orgânica no solo (Guo *et al.*, 2003). O fomesafen é um herbicida indicado para o controle de plantas daninhas de folha larga, sendo aconselhável a aplicação quando essas apresentarem de duas a seis folhas, a depender da espécie (EMBRAPA, 1999).

Tabela 1 - Resumo das propriedades físico-químicas e da estrutura química do fomesafen

Nome comum	Fomesafen
Grupo químico	Éter Difenílico
Fórmula estrutural	
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₆ S
IUPAC nomenclatura	5-(2-chloro-α,α,α-trifluoro-p-tolyloxy)-N-mesyl-2-nitrobenzamide
Peso molecular	438,76 g mol ⁻¹
Solubilidade em água a 20°C	50 mg L ⁻¹
Log K_{ow} a 25°C	-1,2
Pressão de vapor a 20°C	4,00X10 ⁻³

Fonte: PPDB (2025)

2.4 Dinâmica de herbicidas em plantas

Para que o herbicida possa cumprir sua atuação biológica, é necessário que a molécula fique retida no limbo foliar por tempo e concentração suficiente, adentrar e transloucar-se para os espaços celulares, tanto por xilema quanto por floema, atingindo seu sítio de ação em que atuará sobre enzimas e outros locais (Cobb; Reade, 2010). Além disso, alguns processos de metabolização podem ocorrer em algumas plantas (Dimaano; Iwakami, 2020), acarretando a redução ou aumento da atividade biológica do herbicida (Rigon *et al.*, 2020). Desse modo, é necessário compreender todos os fatores que envolvem a dinâmica de herbicidas em plantas daninhas.

2.4.1 Absorção de herbicidas

As estruturas foliares são os órgãos com maior importância nas vias de penetração de herbicidas em pós-emergência, por outro lado as raízes e sementes com maior destaque para aplicação de herbicidas em pré-emergência (Alcántara-de la Cruz *et al.*, 2021). O caule é uma importante via de penetração de herbicidas quando há o interesse de manejar indivíduos de algumas populações florestais ou propriamente evitar a rebrota (Mendes *et al.*, 2022).

A sequência de processos na absorção foliar de moléculas tem como início a deposição dos produtos sob superfície. A primeira barreira enfrentada pela molécula é a cutícula, estrutura responsável pela proteção e regulação de processos de perda de água, além de características de proteção contra pragas e fotodegradação (Reis *et al.*, 2021). Camada cerosa que recobre células da epiderme da planta, além de envolver células da câmara subestomática. Por ser cerosa, alguns compostos que possuem afinidade com água (hidrofílicos) têm maior entrave para ultrapassar essa camada, no entanto, quando há afinidade com soluções a base óleo (hidrofóbicos), esses possuem maior facilidade para ultrapassar a cutícula (Roman *et al.*, 2007). Por mais que a composição em sua maioria seja lipofílica, apresenta componentes hidrofílicos como a pectina (Cobb; Reade, 2010), sendo que em folhas mais jovens a permeabilidade da água é maior (Grover; Cessna, 1991).

A segunda barreira é o apoplasto celular, onde ocorre relação contrária ao enfrentada pela cutícula. Os compostos hidrofílicos têm facilidade para atravessar

essa barreira, enquanto os hidrofóbicos podem ter movimentação lenta nesses espaços intracelulares (Mendes *et al.*, 2022). A terceira barreira é contemplada pela parede celular, com composição primordialmente de celulose. Do mesmo modo que a pectina, a celulose também é hidrofílica. Em última instância, a quarta barreira é a membrana plasmática, altamente seletiva aos compostos que nela atravessam, onde herbicidas hidrofóbicos tendem a ter facilidade a penetrar pela membrana, enquanto compostos hidrofílicos possuem certa dificuldade (Roman *et al.*, 2007).

Outro fator importante, a absorção pode ser influenciada por diversos fatores, sendo eles: disponibilidade na molécula no local de absorção; características físico-químicas do herbicida; condições ambientais; condições edafoclimáticas; e, pela tecnologia de aplicação (Yao *et al.*, 2014). Ademais, os fatores intrínsecos a absorção influencia diretamente na translocação do herbicida, reduzindo sua eficácia e seletividade na planta, de modo a agravar a compreensão dos mecanismos de resistência com a sua sintomatologia, regredindo seu controle (Hess, 2018; Nandula *et al.*, 2019).

2.4.2 Metabolização de herbicidas

Três etapas são responsáveis pela metabolização do herbicida em plantas, sendo dividida em: conversão (Fase I); conjugação (Fase II); e, compartimentalização (Fase III). Fase I é considerada primordial para o ciclo de metabolização de herbicidas em plantas (Shimabukuro; Lamoureux; Frear, 1982), pelos processos de oxidação, redução e/ou hidrólise que modificam a polaridade, aumentando ou diminuindo a fitotoxicidade da molécula (Hatzios, 1997). Os produtos das reações da primeira fase podem ser mais hidrofílicos, com interesse de disponibilizar locais reativos a partir da adição ou exposição de grupos funcionais (hidroxila ou carboxila), antecedendo a reações da segunda fase (Coleman; Blake-kalff; Davies, 1997).

Fase II é a conjugação do herbicida ou metabólito, que tem como objetivo gerar compostos solúveis em água, com menor reatividade a planta, além da mobilidade reduzida. Compreende como fase III a conjugação secundária dos metabólitos, bem como seu transporte para compartimentos, como o vacúolo ou/e parede celular, dos conjugados para participarem de metabolismo adicional (Hatzios, 1997; Shimabukuro; Lamoureux; Frear, 1982). Enzimas do Citocromo P450 são responsáveis por catalisar reações de hidroxilação e desalquilação ocorridas na fase I; enquanto na fase II

enzimas glutathione S-transferase (GSTs), participam das catalizações dos processos conjugativos realizados na segunda fase. Enzimas do complexo P450 e GST são responsáveis pelos processos de detoxificação da grande maioria das moléculas de herbicidas em plantas de diferentes espécies (Zablotowicz; Hoagland; Hall, 2005).

Enzima do citocromo P450 formam uma das maiores superfamílias de proteínas em plantas, atuando em reações de hidroxilação e monooxigenação, aumentando a reatividade e solubilidade de moléculas lipofílicas (Mizutani; Sato, 2011). Em culturas, estudos clássicos desenvolvidos por Tanaka *et al.* (1990), demonstraram a atividade de P450 (hidroxilação e conjugação), sobre diclofop-metil e clorotoluron, conferindo tolerância a esses herbicidas. Enzimas do citocromo P450 desempenham papel importante na resistência de plantas daninhas, embora ainda pouco explorado, devido à complexidade em se estudar múltiplas isoenzimas e à escassez de informações genômicas (Dimaano; Iwakami, 2020).

2.4.3 Enzimas antioxidantes: SOD, CAT e POD

A aplicação de herbicidas, como o fomesafen, atua como agente de estresse químico em plantas, que induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Hasanuzzaman *et al.*, 2020; Jaspers; Kangasjärvi, 2010). A homeostase das plantas pode ser alterada pela síntese de ERO, ocasionando processos que podem danificar os órgãos das plantas (Miller *et al.*, 2010). A produção de ERO está concentrada nos cloroplastos e mitocôndria, devido ao fato da atividade de oxidação metabólica e fluxo intenso de elétrons elevado nesses lugares (Gill; Tuteja, 2010). Em resposta aos danos causados pela presença de ERO, inicia-se o sistema defensivo ao estresse oxidativo, liderada por rotas enzimáticas e não enzimáticas, com um complexo sistema de defesa antioxidante com intuito de dissipar concentrações altas de ERO nas células (Kumar *et al.*, 2018).

Enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) (Barbosa *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016), fazem parte do sistema antioxidante das células. Em um primeiro momento, a ativação da SOD, classificada pela presença de metais diferentes como cobre/zinco (Cu/Zn-SOD) e manganês (Mn-SOD) (Gill *et al.*, 2015), irá atuar na conversão de ânion superóxido em H₂O₂, considerada com reatividade menor e facilmente degradada por outras enzimas (Alscher *et al.*, 2002). Em segunda instância, a CAT lidera o processo de

desintoxicação da dismutação de H_2O_2 em H_2O e O_2 , removendo o peróxido nos peroxissomos e glioxissomos (Resende; Salgado; Chaves, 2003; Gill; Tuteja, 2010). Outra forma de atuação é permeada pela POD (Peroxidase), que tem atuação no peróxido de hidrogênio resultante da atividade da SOD na dismutação do radical superóxido, encontrada no vacúolo e parede celular das plantas (Barcelo *et al.*, 1989).

2.5 Metabolômica: ferramenta para o estudo de plantas daninhas

A abordagem das tecnologias ômicas pode favorecer as metodologias analíticas, aprofundadas sobre desafios comumente enfrentados pela produtividade agrícola, exemplificando os efeitos e causas das interações das plantas com seus diversos estresses (Olanrewaju *et al.*, 2024). Transcriptômica, genômica, proteômica e metabolômica, são exemplos de técnicas que podem ajudar na compreensão dos aspectos bioquímicos, fisiológicos e moleculares das interações dos organismos (Tiwari *et al.*, 2024). Desse modo, é importante a integração dos dados em bancos específicos de análises multiômicas, oferecendo a interação entre processos de complexos biológicos (Chao *et al.*, 2024). Avanços na utilização dessas tecnologias resultam em acúmulo de informações que, ao um nível de interseções, permitem um conjunto de análises sobre mecanismos sob condições estressantes (Ahmed *et al.*, 2024). A integração das abordagens multiômicas corrobora com a correlação de análises, bem como sua visualização e interpretação de dados, resultando em compreensão eficiente dos processos biológicos.

A metabolômica visa estudar os conjuntos de metabólitos sintetizados que são resultantes das vias metabólicas no sistema vegetal (Baharum; Azizan, 2018; Fiehn, 2002). Os metabólitos são produtos resultantes da expressão gênica que se pronunciam como fenótipo bioquímico da célula (Weckwerth; Fiehn, 2002). A integração dessas técnicas possibilita maior compreensão dos aspectos biológicos e fisiológicos de plantas, além de contribuir com a exploração de estudos em áreas como a ciência das plantas daninhas. No entanto, os estudos com plantas daninhas ainda são limitados, e utilizam metabolômica com objetivo de compreensão de aspectos fisiológicos em resposta a aplicação de herbicidas (Aliferis; Chrysayi-Tokousbalides 2011; Miyagi *et al.* 2010). Desse modo, é necessário amplificar os estudos com intuito aperfeiçoar o emprego dessa ferramenta nas ciências das plantas daninhas.

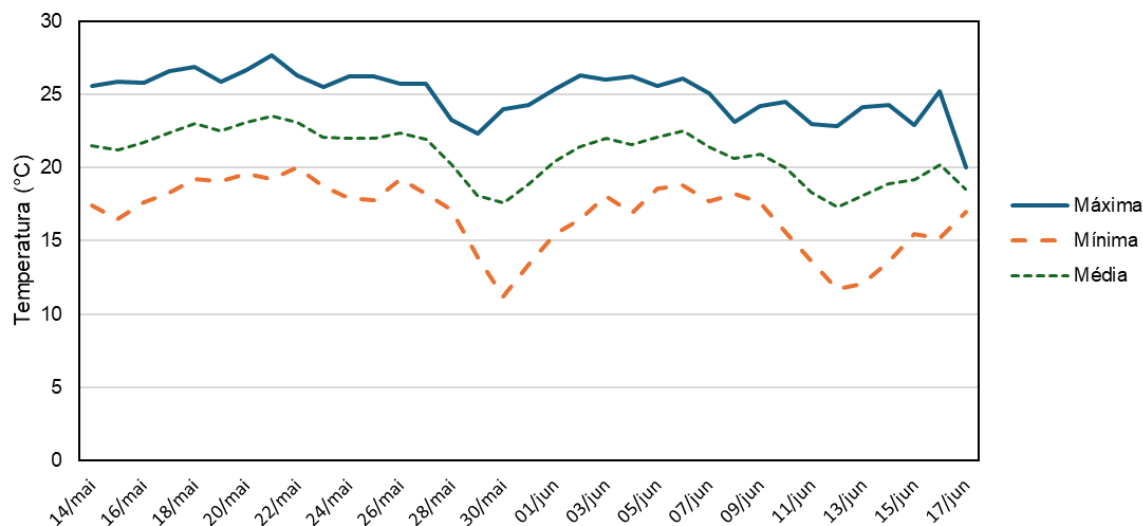
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições gerais do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), no qual pertence ao Departamento de Produção e Melhoramento Vegetal da Faculdade de Ciências Agronômicas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, localizado no campus de Botucatu, SP. Os experimentos seguiram em delineamento inteiramente casualizado, avaliando curva dose-resposta, absorção, sistema antioxidante, doses fracionadas, bloqueadores da P450 e metabolismo de fomesafen em *Bidens subalternans*.

As unidades experimentais foram representadas pelas plantas de *Bidens subalternans* condicionadas em copos de poliestireno com capacidade de 770 mililitros, preenchidos com substrato Tropstrato V6® sendo sua composição de casca de pinus, nitrato de amônia, superfosfato simples, carvão vegetal, nitrato de cálcio e nitrato de potássio. A semeadura de *Bidens subalternans* foi realizada em sementeiras preenchidas com o mesmo substrato. Operações de desbaste e transplântio seguiram conforme o desenvolvimento das plântulas na sementeira. As aplicações foram realizadas quando, em média, as plantas possuíam entre 4 e 6 folhas verdadeiras. Os experimentos permaneceram por 35 dias em casa de vegetação, com temperaturas máximas e mínimas, em média, de 25,0 e 16,8°C, respectivamente (Figura 4). As medidas de temperaturas foram realizadas com auxílio de um datalogger de temperatura, modelo RC-5, da empresa Elitech Brasil®.

Figura 4 - Temperatura máxima e mínima registrada no interior da casa de vegetação, obtidas por datalogger RC-5 (Elitech®), durante o período experimental



As aplicações dos tratamentos foram realizadas por meio de um simulador de aplicação, que oferece controle de velocidade, pressão e vazão (Figura 5). Para tal, foi empregada uma barra de aplicação equipada com quatro pontas de pulverização XR 110015, espaçadas a cada 50 cm e pressurizadas a 2 bar. A velocidade de aplicação foi mantida a 1 m s^{-1} , garantindo um volume de aplicação de 150 L ha^{-1} . A verificação e ajuste do volume de aplicação foi realizado de maneira sistemática durante todas as aplicações, assegurando a precisão das doses administradas. Foi adicionado adjuvante não iônico (Assist®), na concentração de 0,5% v/v.

Figura 5 – Procedimentos de aplicação dos tratamentos experimentais: a) simulador de aplicação de produtos fitossanitários; b) preparo das caldas; c) plantas de *Bidens subalternans* em pós-aplicação

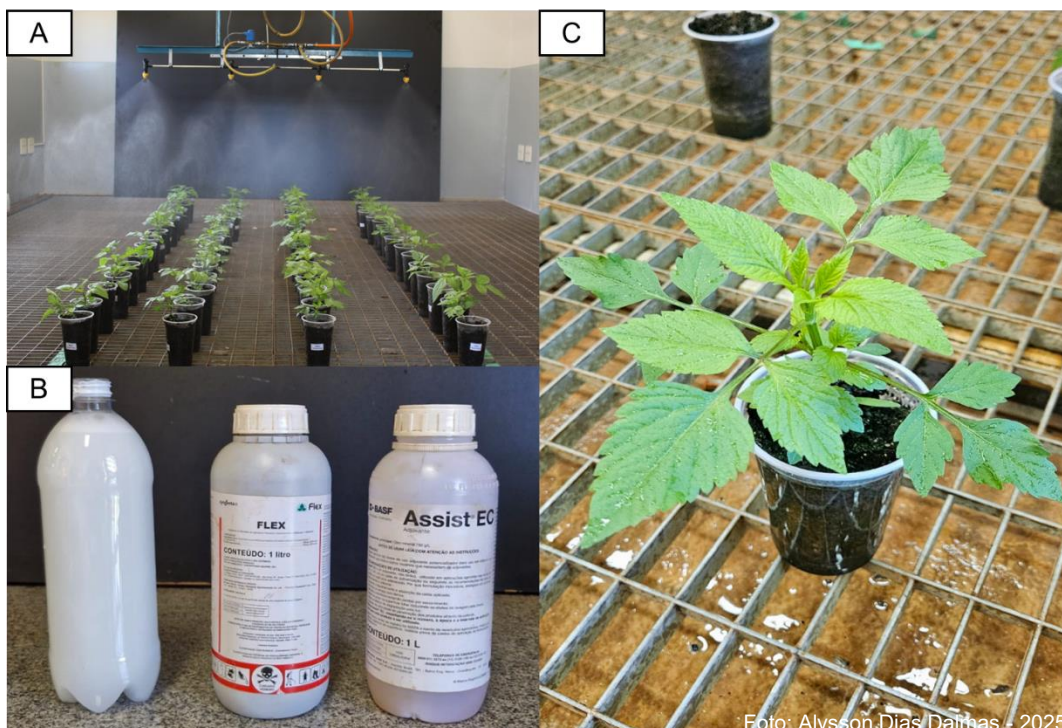


Foto: Alysson Dias Dalmás - 2025

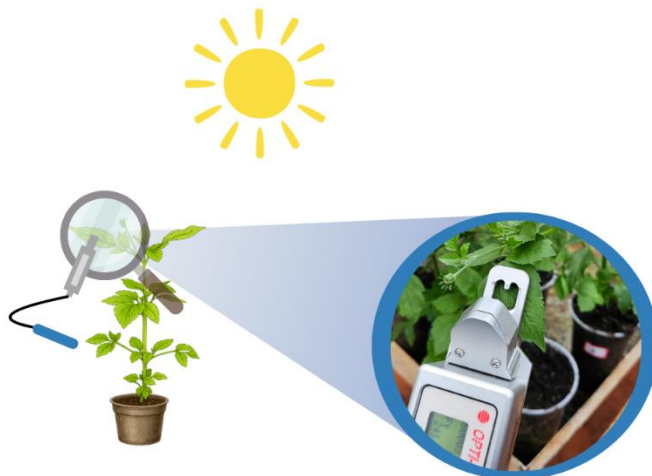
3.2 Experimento 1: Curva dose-resposta

No experimento 1, as plantas de *B. subalternans*, foram submetidas a dez doses do herbicida fomesafen: 0 (0%); 15,625 (6,25%); 31,25 (12,5%); 62,5 (25%); 125 (50%); 250 (100%); 500 (200%); 1000 (400%); 2000 (800%) e 4000 (1600%) (g i.a. ha⁻¹). As porcentagens vão de acordo com a dose recomendada de 250 g i.a. ha⁻¹. O controle das plantas foi avaliado aos 1, 3, 7, 14 e 21 dias após aplicação (DAA) seguindo a escala percentual de notas, em que “0” corresponde a nenhum controle e “100” significa a morte das plantas, conforme Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (Velini *et al.*, 1995). Aos 21 DAA foi coletada a parte aérea das plantas e levadas para estufa de circulação forçada de ar a 60°C por 96 horas para determinação da massa seca em balança de precisão (0,0001g).

A avaliação da taxa de transporte de elétrons (ETR) foi realizada nas doses 0; 31,25; 250 e 1000 g i.a. ha⁻¹ aos 1, 3, 7, 14 e 21 DAA. As medições foram realizadas na folha mais nova completamente desenvolvida entre 9 e 11 horas com auxílio de

um fluorômetro portátil (Multi-Mode Chlorophyll Fluorometer OS5p – Opti Sciences, EUA) (Figura 6).

Figura 6 - Procedimento de medição da taxa de transporte de elétrons (ETR) em folhas expostas à luz solar utilizando fluorômetro portátil OS5p (Opti Sciences®)



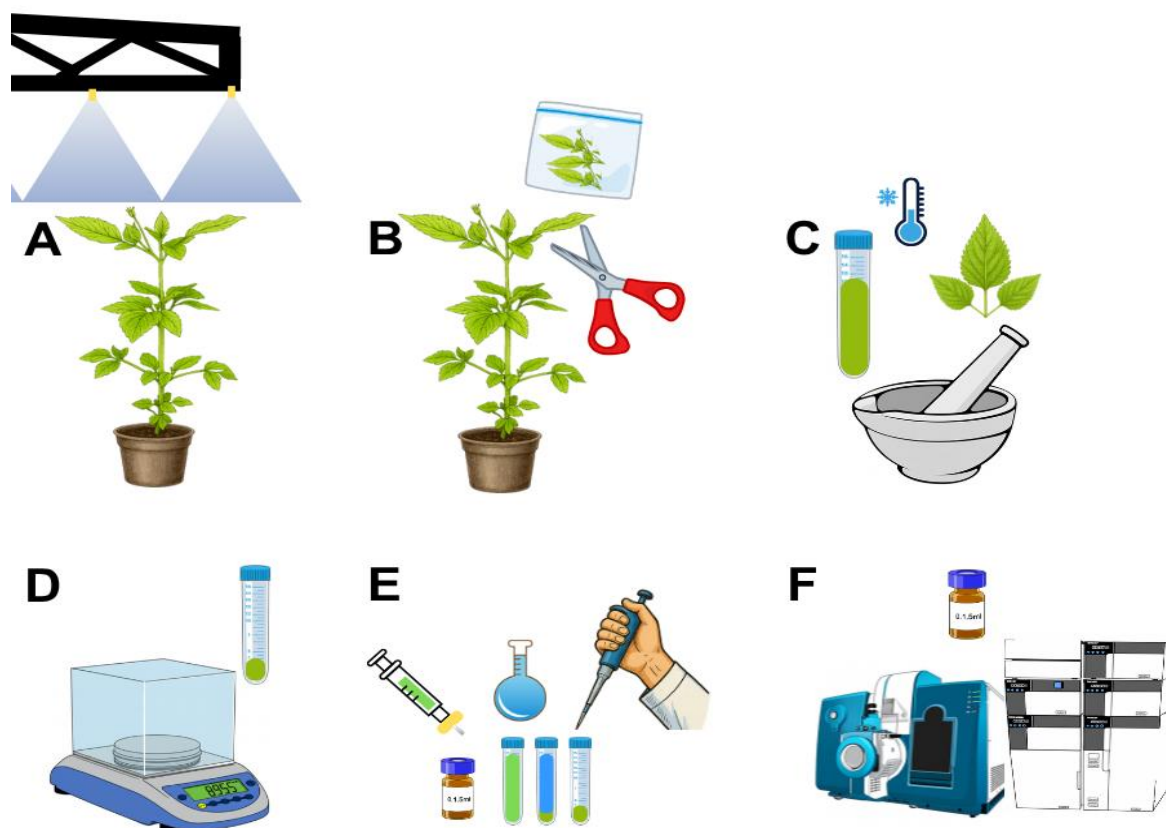
3.3 Experimento 2: Absorção de fomesafen

Os experimentos de absorção foram realizados em dois momentos distintos, sendo uma repetição no ano de 2023 e outra em 2025, em populações de *B. subalternans* diferentes. Seguindo os mesmos padrões para coleta, armazenagem e processamento. Foi aplicado fomesafen a uma dose de 250 g i.a. ha⁻¹. Em acréscimo, seguiu-se a coleta das amostras de forma composta, onde para formar uma repetição incluiu-se três plantas distintas, dando preferência em coletar somente as folhas, retirando pecíolo e caule.

Para absorção, foi realizado a coleta das plantas às 2 e 24 horas após a aplicação, após a coleta foram lavadas e pesadas. Seguiu-se duas lavagens com 150 mL de água deionizada, a solução resultante foi de 300 mL. A solução foi homogeneizada para uma coleta de uma alíquota de 10 mL, separada e condicionada em tubos *falcons* para em sequência a determinação do teor externo de herbicida depositado sobre as plantas. Em continuidade ao teor externo, foi separado 1,5 mL da solução filtradas com filtros Millipore 0,2 µm obtida nas lavagens, transferidas para *vials* e encaminhadas para análise cromatográfica.

O teor interno de fomesafen foi determinado a partir do material vegetal previamente armazenado, macerado com nitrogênio líquido com auxílio de graal e pistilo. Em sequência, o material vegetal fresco foi liofilizado, e após separado em tubos *falcons* uma alíquota de 100 mg de amostra cada tratamento, adicionando 10 mL de solução metanol e água (80:20 v/v). Os tubos passaram por banho de ultrassom durante 30 minutos e, após centrifugados a 4.000 g por 5 minutos. Imediatamente, foi realizado a filtragem do sobrenadante das alíquotas com filtros Millipore 0,2 µm, separados em *vials* (Figura 7).

Figura 7 – Representação das etapas de preparação para análise de absorção de fomesafen por cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC): a) Aplicação de fomesafen em *Bidens subalternans*; b) Corte das folhas e condicionamento em sacos plásticos; c) Maceração em nitrogênio líquido; d) Pesagem da alíquota; e) Extração com solução extratora; e, f) Determinação dos teores de fomesafen



A quantificação do ingrediente ativo foi realizada por cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC), que é um sistema LC-MS/MS, pertencente a empresa

Shimadzu, modelo Prominence UFLC, localizado no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), na FCA/UNESP. O sistema é equipado com duas bombas (LC-20AD), auto-injetor (SIL-20AC), degazeificador (DGU-20A5), sistema controlador (CBM-20) e forno (CTO-20AC), em conjunto acoplado ao HPLC, sendo um espectrômetro de massas 4500 triplo quadrupolo (Applied Biosystems / Sciex). As condições cromatográficas do fomesafen foram descritas em resumo na tabela 2.

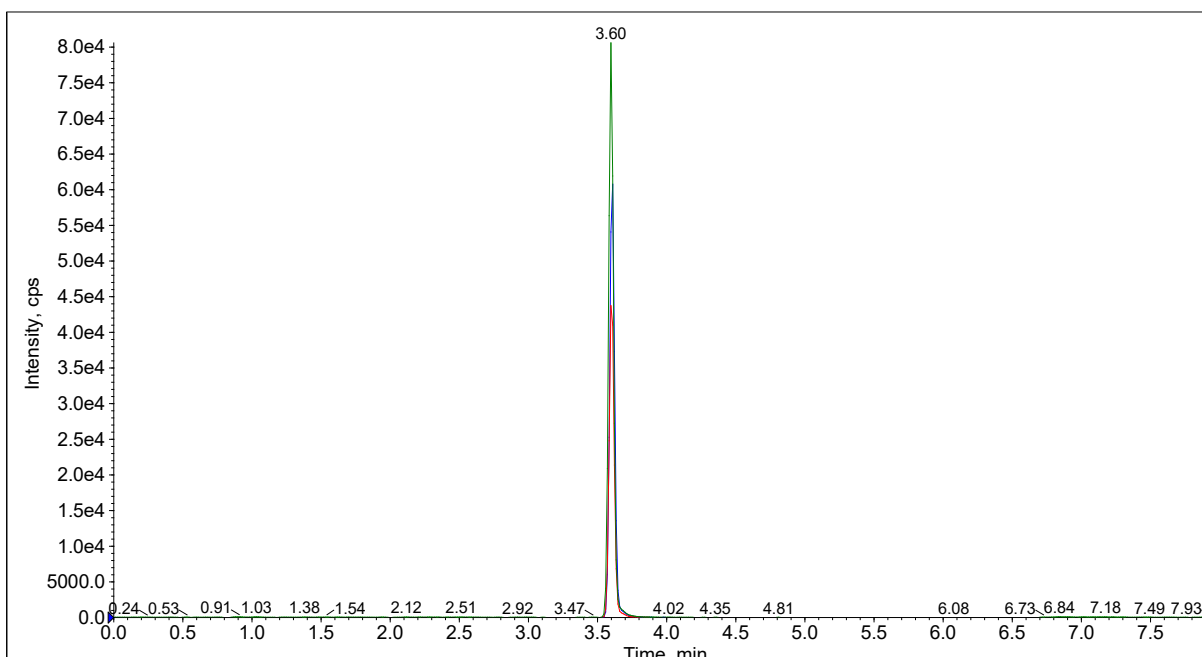
Tabela 2 – Resumo das condições cromatográficas aplicadas na quantificação de fomesafen

Coluna analítica	Synergi 2.5 μ Hydro-RP 100Å, dimensões 50 x 4,6 mm
Volume de injeção	10 μ L
Fase móvel (pH 7,0)	Fase (A) = Água com 0,1% Ácido Fórmico Fase (B) = Metanol com 0,1% Ácido Fórmico
Gradiente	0 - 1 min = 60% Fase (A) e 40% Fase (B) 2 - 5 min = 5% Fase (A) e 95% Fase (B) 5,50 min = 60% Fase (A) e 40% Fase (B) 8 min = Stop
Fluxo	0,6 mL min ⁻¹
Temperatura do forno	40°C
Tempo de corrida	10 minutos
Tempo de retenção	3,60 minutos

Tabela 3 - Massa molecular e íons secundários do composto analisado

Composto	Massa molecular	Íons secundários (Fragmentos)
Fomesafen	436,861	285,900
	436,861	316,100
	436,861	194,800

Figura 8 - Cromatograma obtido para uma injeção de 10 µL do padrão analítico de fomesafen



3.4 Experimento 3: Análises bioquímicas (SOD, CAT, POD e MDA)

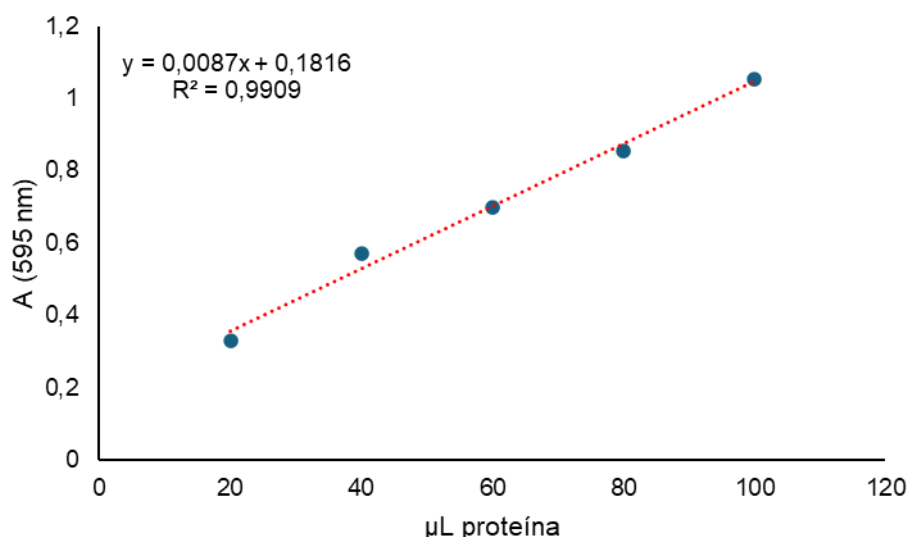
Para as análises enzimáticas, foram coletadas plantas às 2 horas após aplicação ($250 \text{ g i.a. ha}^{-1}$) e testemunha, seguindo como preferência a coleta de todas as folhas. As folhas foram condicionadas em tubos falcons (15 mL), devidamente identificados e imergidos em nitrogênio líquido para cessar a atividade enzimática das plantas. Os tubos foram armazenados em ultra freezers com temperatura contínua de -80°C .

Após condicionadas, as amostras congeladas foram maceradas em nitrogênio líquido, retornando-as para o armazenamento. A extração enzimática seguiu a metodologia descrita por Kar e Mishra (1976), separando uma alíquota de 300 mg de folhas frescas congeladas e trituradas. Em sequência, junto a alíquota adicionou-se 4 mL de solução tampão de fosfato de potássio refrigerado ($0,1 \text{ M} - \text{pH } 6,8$). A solução resultante foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante obtido foi coletado e separado em eppendorfs de 1,5 mL, retornando-os para o armazenamento a -80°C .

Para a quantificação da atividade enzimática é necessário determinar a proteína solúvel da amostra. Diante disso, a quantificação da proteína solúvel seguiu

a metodologia descrita por Bradford (1976), onde leva em consideração um sistema de reação seguindo uma curva padrão de proteína. A curva é determinada com uma solução de 50 µL de extrato enzimático e de caseína (0, 20, 40, 60 e 100 µL) por 2,5 µL de reativo de Bradford. A solução permaneceu em reação por 15 minutos e posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm (Figura 9). O resultado está expresso em miligrama de proteína por grama de matéria fresca. Em sequência a curva padrão, a leitura das amostras foi realizada seguindo o mesmo padrão de 50 µL de extrato em 2,5 µL de Bradford.

Figura 9 - Curva padrão de caseína para determinação da concentração de proteínas solúveis, segundo método de Bradford (1976)



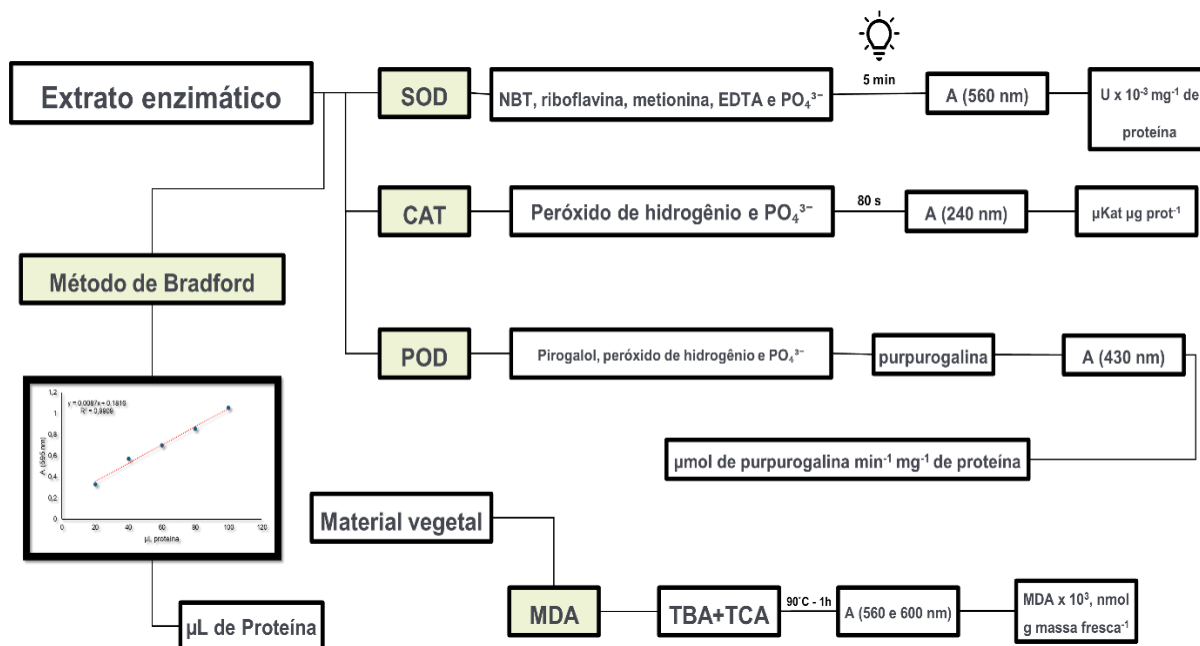
A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pelo método de Giannopolitis e Reis (1997), que propõe considerar a aptidão da enzima em suprimir a fotoredução de NBT (azul de cloreto de nitrotetrazólio). Foram adicionados 50 µL de extrato enzimático em uma solução de 75 µL de NBT, 2 µL de riboflavina, 13 mM de metionina, 100 nM de EDTA em 3 mL de tampão fosfato de potássio a 50 mM pH 7,8. Preparado, a solução resultante passou por reação luminosa em ambiente controlado por lâmpadas fluorescente, por um período de 5 minutos. Após reagidas, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560 nm. O cálculo da atividade da enzima leva em consideração a porcentagem de inibição, o volume amostral e a concentração de proteína solúvel da amostra ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$).

A quantificação da catalase (CAT) seguiu a metodologia proposta por Peixoto *et al.* (1999), onde adicionou-se 50 μL de extrato enzimático em 950 μL de tampão de fosfato de potássio a 50 mM, pH 7, reagindo-a com peróxido de hidrogênio em concentração de 12,5 mM. A leitura foi realizada em espectrofotometria em comprimento de onda de 240 nm. O intervalo de leitura foi de 80 segundos, adotando o coeficiente molar de 39,4 mM cm^{-1} . A atividade da CAT foi apresentada em $\mu\text{Kat } \mu\text{g prot}^{-1}$, utilizando valores de proteína solúvel da amostra.

Conforme Teisseire e Guy (2000), a atividade da enzima peroxidase (POD) foi definida pelo sistema de reação resultante da solução com 30 μL do extrato enzimático, tampão de fosfato de potássio a 50 mM, pH 6,5, pirogalol (1,2,3-benzotriol) a 20 mM e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 5 mM. A solução total apresentou um volume de 1 mL. O tempo de reação foi de 5 minutos em temperatura ambiente. Em sequência, a formação de purpurogalina foi observada em espectrofotometria UV-visível a um comprimento de 430 nm, com coeficiente de extinção molar de 2,5 $\text{mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$, ambos utilizados para calcular a atividade enzimática da CAT, expressa em μmol de purpurogalina $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

Por último, segundo a metodologia descrita por Heath e Packer, e mencionada por Rama Devi e Prasad (1998), utilizou-se 300 mg de alíquota de material vegetal armazenado em -80°C para determinação da peroxidação de lipídios. Adicionou-se a alíquota uma solução homogênea de 5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,25% e ácido tricloacético (TCA) a 10%. As amostras foram incubadas em banho-maria a 90°C por período de 1 hora. Em sequência, postas em ambiente resfriado para interromper o processo de banho-maria. Após o resfriamento, foram centrifugadas a $10000 \times g$ por 15 em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de ondas de 560 e 600 nm, do material resultante da centrifugação. Utilizou-se no cálculo o coeficiente de extinção molar do malonaldeído ($155 \text{ mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

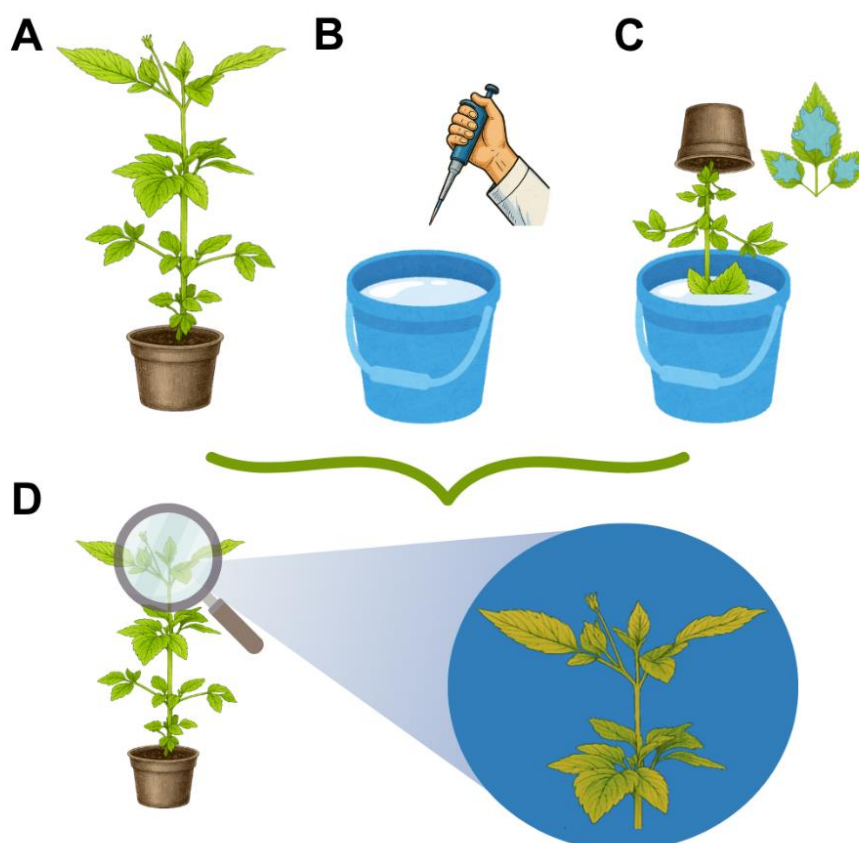
Figura 10 - Resumo das metodologias utilizadas para a análise de enzimas antioxidantes em *Bidens subalternans*



3.5 Experimento 4: Doses fracionadas de fomesafen

As doses fracionadas visam identificar concentrações letais para planta, submetendo-a em aplicações contínuas de concentrações muito baixas da dose comercial, priorizando total cobertura da área foliar. Os experimentos com aplicação de doses fracionadas foram conduzidos com cinco repetições, submetendo-se plantas de *Bidens subalternans* à imersão, a cada três dias, em calda contendo fomesafen nas concentrações de $0,625 g i.a. ha^{-1}$ e em regime crescente ($0,625 + g i.a. ha^{-1}$, dobrando-se a dose a cada nova aplicação), repetindo por 4 vezes (Figura 11). As imersões tiveram início quando as plantas estavam com 8 folhas verdadeiras. Avaliou-se os sintomas a cada três dias após a aplicação, seguindo a escala visual de 0 a 100, conforme a Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas (Velini *et al.*, 1995).

Figura 11 - Metodologia de aplicação de doses fracionadas de fomesafen em *Bidens subalternans*, com repetições a cada três dias: a) Plantas de *B. subalternans* com 8 folhas verdadeiras; b) Preparo de calda com concentrações fracionadas de fomesafen; c) Imersão das plantas na solução; e, d) Avaliação visual do controle (%)



3.6 Experimento 5: Bloqueadores da P450

O experimento tem como objetivo investigar se a redução da atividade da enzima citocromo P450, por meio da aplicação de malathion ou dietholate, influencia a resposta de *Bidens subalternans* ao herbicida fomesafen. Seguiu-se com cinco repetições, utilizou-se vasos com uma planta de *Bidens subalternans*, quando atingiram 4 folhas verdadeiras. Os tratamentos aplicados foram malathion a 1000 g i.a. ha⁻¹ (antecedendo 1 hora antes da aplicação de fomesafen a 250 g i.a. ha⁻¹), dietholate (240 g i.a. ha⁻¹) aplicado no sulco no dia do transplântio, fomesafen (250 g i.a. ha⁻¹) e testemunha. As plantas foram transplantadas 14 dias antes da aplicação do herbicida. Avaliou-se controle das plantas aos 7, 14 e 21 dias após a aplicação

(DAA), seguindo a escala proposta pela SBCPD (Velini *et al.*, 1995). Aos 21 DAA foi coletada a parte aérea das plantas e levadas para estufa de circulação forçada de ar a 60°C por 96 horas para determinação da massa seca em balança de precisão (0,0001g).

3.7 Metabolômica

As amostras que seguiram para análise de metabolômica tiveram origem das coletas de 24 HAA (250 g i.a. ha⁻¹) e da testemunha. O material vegetal foi previamente armazenado, macerado com nitrogênio líquido com auxílio de graal e pistilo. Separado em tubos falcons uma alíquota de 100 mg de amostra macerada de cada tratamento, adicionando 10 mL de solução água (20%) e metanol (80%). Os tubos passaram por banho de ultrassom durante 30 minutos e, após centrifugados a 4.000 g por 5 minutos. Imediatamente, foi realizado a filtragem do sobrenadante das alíquotas com filtros Millipore 0,2 µm, separados em vials e encaminhados para análise em LC-MS/MS acoplado com QTOF (Shimadzu LC/MS-9030, Kyoto, Japão).

A filtragem inicial dos dados foi realizada no software MS-DIAL[®], considerando como critérios: o tempo de retenção (RT), a massa carga (m/z) e a presença das moléculas em pelo menos três das cinco repetições. Em seguida, a organização e tratamento dos dados foram conduzidos por meio de scripts em linguagem R, executados no software RStudio[®], para estruturar as matrizes e identificar os grupos de metabólitos. A partir desses resultados, foi gerado um diagrama de Venn com o objetivo de visualizar a distribuição e sobreposição dos metabólitos entre as amostras. Análise estatística, bem como a plotagem do gráfico vulcão, foi realizada utilizando a plataforma MetaboAnalyst[®] permitindo identificar metabólitos diferencialmente abundantes entre os tratamentos, com referência aos valores de m/z e RT.

3.8 Análise estatística

Os dados obtidos no estudo foram submetidos à análise de variância, se forem significativos seguiu-se para o teste de médias pelo teste t (LSD) ($p \leq 0,05$). Além disso, calculou-se os intervalos de confiança (média $\pm$ intervalo de confiança), a partir da fórmula:

$$IC = \frac{t * \text{desvpad}}{\sqrt{n}}$$

onde, t é o valor de t tabelado com nível de significância de 5%, desvpad é o desvio padrão da amostra, e n é o número de repetições dentro de cada tratamento. Os dados de absorção foram convertidos para micrograma por grama de massa seca ($\mu\text{g g}^{-1}$ MS).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1: Curva dose-resposta

Com base na ANOVA, para a variável controle (%), notou-se uma diferença significativa ($<0,05$) entre os tratamentos de *Bidens subalternans* em todas os períodos avaliados no experimento (Tabela 4).

Tabela 4 – Controle visual (%) de *Bidens subalternans* submetidas a diferentes doses de fomesafen em curva dose–resposta, com avaliações aos 1, 3, 7, 14 e 21 dias após a aplicação (DAA)

Doses (g i.a. ha ⁻¹)	Controle (%)									
	1 DAA		3 DAA		7 DAA		14 DAA		21 DAA	
0	0	j	0	j	0	i	0	h	0	f
15,625	2,33	i	11,50	i	11,33	h	13,66	g	10,00	e
31,25	5,33	h	21,50	h	19,83	g	23,50	f	9,50	e
62,50	8,50	g	31,83	g	31,83	f	35,00	e	9,83	e
125	12,50	f	46,83	f	46,66	e	47,83	d	20,33	d
250	16,50	e	56,83	e	60,83	d	68,66	c	43,83	c
500	20,66	d	66,83	d	76,00	c	82,16	b	91,16	b
1000	25,33	c	76,83	c	96,66	b	100	a	100	a
2000	30,33	b	86,50	b	96,16	ab	100	a	100	a
4000	35,33	a	91,50	a	98,33	a	100	a	100	a
<i>p-valor</i>	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
CV (%)	3,43		2,51		2,84		1,48		4,30	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo o teste LSD, a 5% de probabilidade.

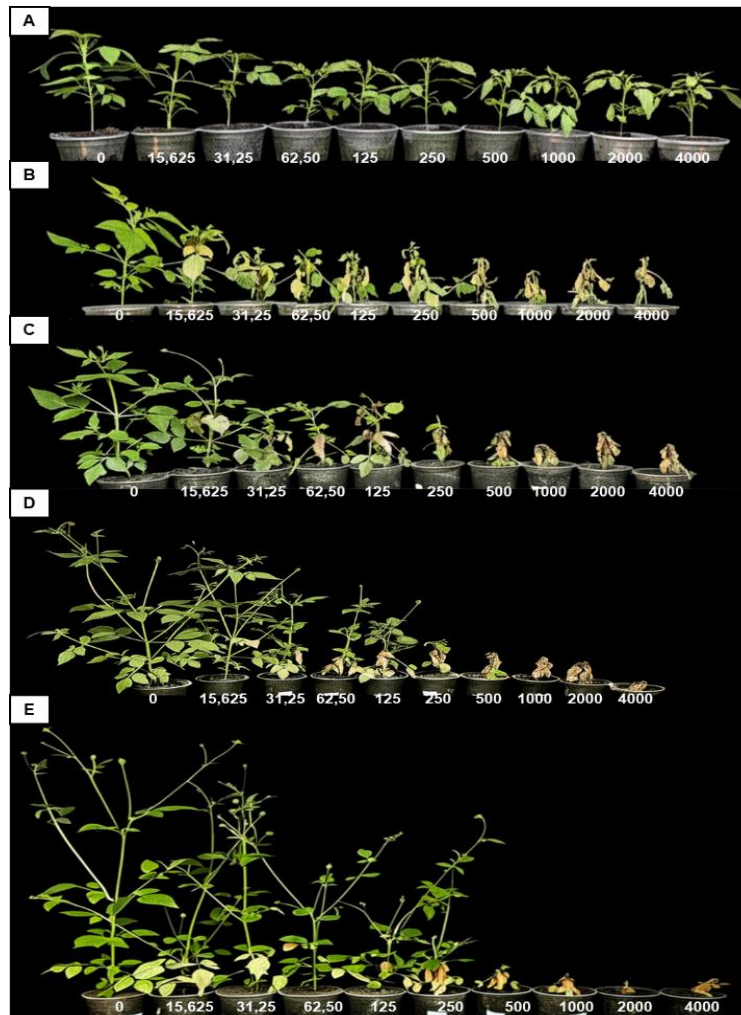
Com base no teste de média t student (LSD), a um nível de probabilidade de 5%, foi possível observar que para controle, as maiores doses de fomesafen, de 500 a 4000 g i.a. ha⁻¹, promoveram controle acima de $\geq 20\%$ no primeiro dia após a aplicação (DAA), enquanto doses menores do 500 g i.a. ha⁻¹, obtiveram médias inferiores a $\leq 17\%$ de controle. Os percentuais de controle cresceram aos 7 DAA, em com valores de $\geq 76\%$ para doses maiores a 500 a 4000 g i.a. ha⁻¹, e porcentagens de $\leq 60\%$ para menores doses de 250 a 15,625 g i.a. ha⁻¹. Aos 21 dias após a aplicação, nota-se que não há diferenças significativas para doses de 1000 a 4000 g i.a. ha⁻¹, com valores de controle de 100%. Doses inferiores, de 500 g i.a. ha⁻¹ apresentaram

controle de 91%, enquanto para doses de 250 e 125 g i.a. ha⁻¹, os percentuais de controle foram de 43 e 20%, respectivamente.

Nesse estudo, observou-se que para dose comercial recomendada (250 g i.a. ha⁻¹), não apresentou controle adequado de *B. subalternans*. Resultados que divergem dos encontrados por Gelmini (2002) e Nicolai *et al.* (2006), que demonstram controle acima de 90% para populações de *Bidens subalternans* tratadas com fomesafen a 250 g i.a. ha⁻¹. Resultados reduzidos de controle nesse experimento podem estar correlacionados com condições climáticas nos momentos de condução do estudo, além do surgimento de brotações subsequentes a aplicação (Figura 12).

Fato que amplifica a capacidade de ação dos herbicidas inibidores da PROTOX é a presença ou ausência de luz, segundo Barker *et al.* (2023), a base fisiológica para o rápido efeito dos inibidores da PROTOX é a presença de luz. Em resultado ao fato da PPO, quando inibida, faz com que o protoporfirinogênio veta para cloroplasto onde é convertido em protoporfirina no citosol (Lehnen *et al.*, 1990). Em constatações de Becerril e Duke (1989), quando tratadas com herbicidas no escuro, nos tecidos vegetais há o acúmulo de protoporfirina, que geram danos do herbicida quando expostos novamente à luz, em qualquer espécie vegetal.

Figura 12 - Curvas dose–resposta de fomesafen em *Bidens subalternans*, expressas em controle visual (%) aos: a) 1 DAA; b) 3 DAA; c) 7 DAA; d) 14 DAA; e) 21 DAA



Com base na ANOVA, para a variável massa seca (%), notou-se uma diferença significativa ($<0,05$) entre os tratamentos de *Bidens subalternans* ao vigésimo primeiro dia após a aplicação (Tabela 5).

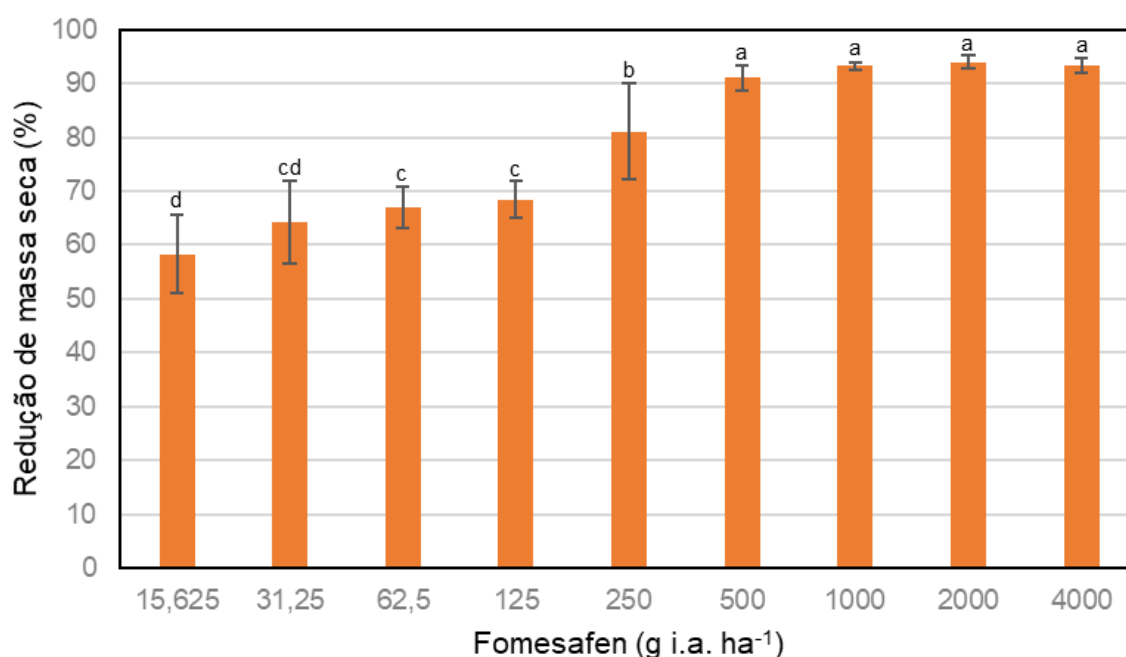
Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para massa seca de *Bidens subalternans* submetidas a diferentes doses de fomesafen em curva dose–resposta

Fonte de variação	Dose-resposta			
	GL	QM	F	P
Massa seca	9	4867,89	135,51**	$<0,0001$
CV (%)			8,43	

**significativo a 1% de probabilidade.

As médias das reduções de massa seca (%) foram testadas pelo teste t student (LSD), a um nível de 5% de probabilidade (Figura 13). Constatou-se que as maiores reduções de massa seca aos 21 DAA, ocorreram nas doses de 500 a 4000 g i.a. ha⁻¹ com redução de ≥91% em relação a testemunha. Enquanto, na dose de 250 g i.a. ha⁻¹ (dose comercial), foram observadas reduções de 81% em relação a testemunha. Nas doses de 125, 62,5, 31,25 e 15,625 g i.a. ha⁻¹ foi observada a redução de massa seca de 68, 66, 64 e 58%, respectivamente, em comparação a massa seca da testemunha. Em resultado a um estudo de Gelmini *et al.* (2002), a aplicação de fomesafen (250 g i.a. ha⁻¹) provocou redução considerável na produção de fitomassa verde em relação à testemunha (39,5%), constatando os resultados obtidos de massa seca nesse experimento.

Figura 13 - Redução percentual da massa seca de *Bidens subalternans* em relação à testemunha, para diferentes doses de fomesafen



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si segundo o teste LSD, a 5% de probabilidade.

Com base na ANOVA, para a taxa de transporte de elétrons (%), notou-se uma diferença significativa (<0,05) entre os tratamentos de *Bidens subalternans* em todas os períodos avaliados no experimento (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise de variância e coeficiente de variação para taxa de transporte de elétrons (ETR) em *Bidens subalternans* tratadas com fomesafen em curva dose-resposta, avaliada em diferentes períodos após aplicação

Fonte de variação	ETR			
	GL	QM	F	P
1 DAA	3	3942,07	9,19**	<0,0001
3 DAA	3	5931,91	21,94**	<0,0001
7 DAA	3	21321,27	254,69**	<0,0001
14 DAA	3	22391,76	130,82**	<0,0001
21 DAA	3	20800,64	65,83**	<0,0001

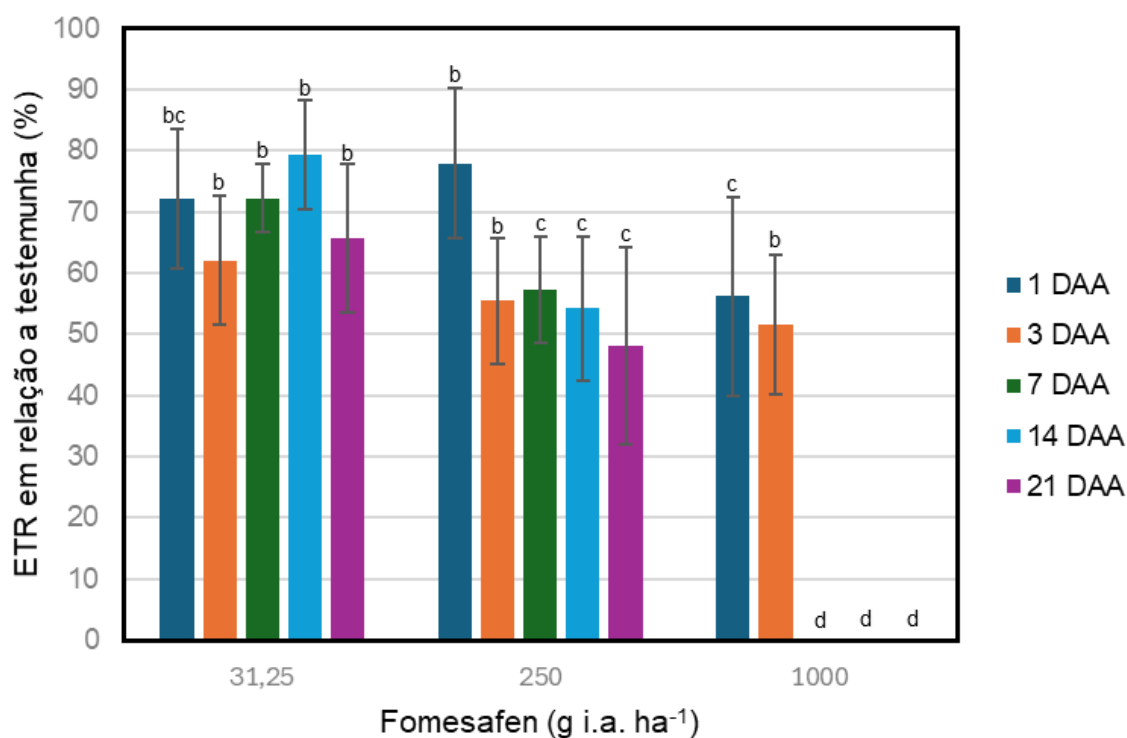
Fonte de variação	ETR	
	CV (%)	
1 DAA	27,04	
3 DAA	24,43	
7 DAA	15,94	
14 DAA	22,41	
21 DAA	33,27	

**significativo a 1% de probabilidade.

Para taxa de transporte de elétrons, representada em % em relação à testemunha, usou-se o teste t student (LSD), a um nível de 5% de significância, para verificar diferenças entre os tratamentos (Figura 14). Os tratamentos foram avaliados de forma individual em contraste ao dia de avaliação, nas doses de 0, 31,25, 250 e 1000 g i.a. ha⁻¹. Ao primeiro dia após a aplicação, observou-se a taxa de transporte de elétrons de 56, 77 e 72% para doses de 1000, 250 e 31,25 g i.a. ha⁻¹, respectivamente. Aos 7 DAA, em concentração de 31,25 e 250 g i.a. ha⁻¹, a taxa de transporte de elétrons quando em comparação a testemunha foi de 72,3 e 57,2%, respectivamente. Para as maiores doses não houve possibilidade de realizar análises, devido à falta de folhas sem sintomas ou necrosadas. Aos 21 DAA, constatou-se valores de ETR de 65,6 e 48,1% para doses de 31,25 e 250 g i.a. ha⁻¹, respectivamente. Evidências que contrastam com as observadas por Dayan *et al.* (2009), em aplicações de amicarbazone e atrazina em plantas de *Digitaria sanguinalis* e *Abutilon theophrasti*, onde a taxa de transporte foi totalmente inibida com oito horas após a aplicação dos herbicidas.

As análises de fluorescência são um método que apresenta uma vasta oportunidade para o estudo qualitativo do transporte de elétrons durante o período de fotossíntese, em resposta a obtenção fácil e rápida a medidas de fluorescência da clorofila, um método não destrutivo de amostras (Mohanty, 1974). As oscilações em pequena escala de ETR durante o período de avaliação relaciona-se com oscilações do ambiente (Mazza *et al.*, 2000). Em resultado, a planta responde com alteração na taxa fotossintética, alterando-a por estresses bióticos e abióticos, sendo a temperatura, radiação, salinidade, déficit hídrico, presença de insetos pragas e fitopatógenos os principais atuantes na variação da taxa de transporte de elétrons (Bown *et al.*, 2002), mesmo que o principal fator redutor é o efeito do herbicida nesse estudo.

Figura 14 - Variação percentual da taxa de transporte de elétrons (ETR) em relação à testemunha, para diferentes doses de fomesafen, ao longo dos períodos avaliados



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si segundo o teste LSD, a 5% de probabilidade.

4.2 Experimento 2: Absorção de fomesafen

De acordo com a análise de variância (ANOVA), a um nível de 5% de significância (Tabela 7), é possível relatar diferença entre os tratamentos de absorção, tanto para o teor interno como também para o teor externo do experimento conduzido no ano de 2023. De modo a constatar a diferença encontrada na ANOVA, realizou-se o teste média t student (LSD), a um nível de 5% de probabilidade, reafirmando que os momentos de coleta se diferenciaram do controle, internamente e externamente.

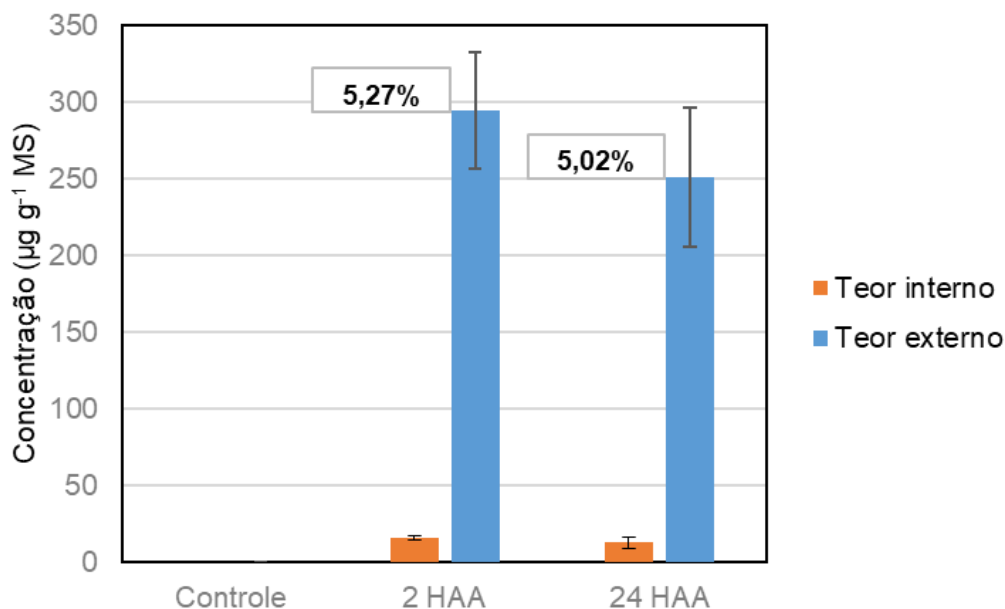
Tabela 7 – Análise de variância para teores interno e externo de fomesafen (250 g i.a. ha⁻¹) em *Bidens subalternans*, avaliados em diferentes tempos após aplicação (2 e 24 HAA) – ciclo experimental de 2023

Fonte de variação	Absorção (2023)			
	GL	QM	F	P
Teor interno	2	724,71	51,89**	<0,0001
CV (%)			38,69	
Teor interno			Teste de médias	
Controle			0,0000	b
2 HAA			16,0757	a
24 HAA			12,8950	a

Fonte de variação	Absorção (2023)			
	GL	QM	F	P
Teor externo	2	252961,87	82,79**	<0,0001
CV (%)			30,38	
Teor externo			Teste de médias	
Controle			0,0000	b
2 HAA			294,5628	a
24 HAA			251,2676	a

**significativo a 1% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo o teste LSD, a 5% de probabilidade.

Figura 15 - Teor interno e externo de fomesafen (250 g i.a. ha⁻¹) em plantas de *Bidens subalternans* em diferentes tempos após aplicação (2 e 24 HAA) – ciclo experimental de 2023



Os teores internos de fomesafen foram, em média, de 16,07 µg g⁻¹ MS às 2 horas após aplicação (HAA), enquanto para 24 HAA observou-se um decréscimo na concentração interna do herbicida (12,89 µg g⁻¹ MS) (Figura 15). Por outro lado, a concentração externa da molécula mostra-se em maiores níveis, sendo que para 2 HAA observa-se concentração média de 294,56 µg g⁻¹ MS e para 24 HAA a concentração decai para 251,26 µg g⁻¹ MS nas plantas de *Bidens subalternans*. A porcentagem absorvida de fomesafen às 2 horas após aplicação, em média, foi de 5,27% quando comparado o teor externo com o teor interno. Por outro lado, relata-se uma absorção média de 5,02% de fomesafen às 24 HAA.

Com base na análise de variância (ANOVA), a um nível de 5% de significância, para o ano de 2025, houve diferença significativa entre os tratamentos de absorção (Tabela 8). Para os teores internos e externos, foi necessário realizar o teste de médias t student (LSD), a um nível de 5% de probabilidade, reafirmando que os momentos de coleta se diferenciaram do controle.

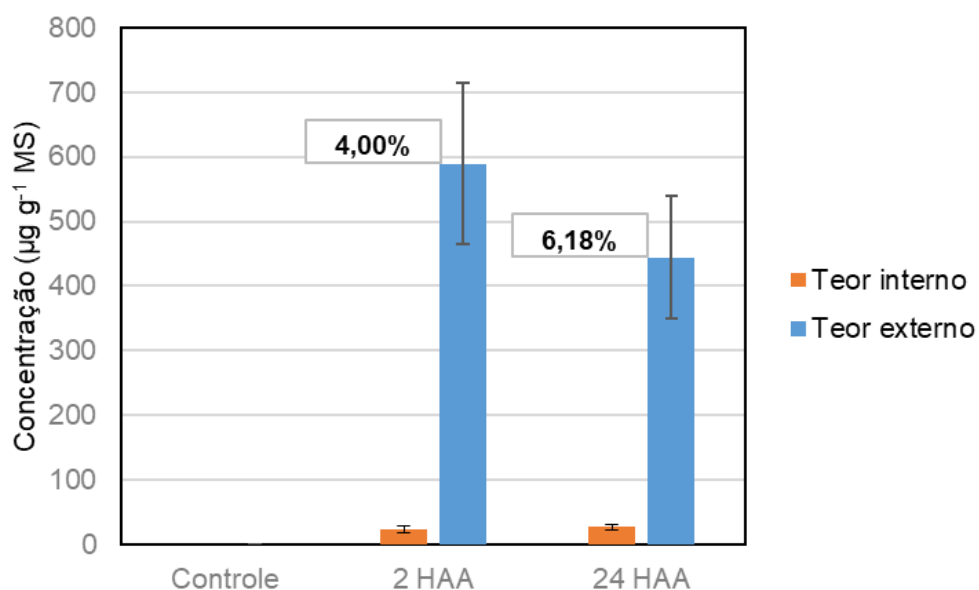
Tabela 8 - Análise de variância para teores interno e externo de fomesafen (250 g i.a. ha⁻¹) em *Bidens subalternans*, avaliados em diferentes tempos após aplicação (2 e 24 HAA) – ciclo experimental de 2025

Fonte de variação	Absorção (2025)			
	GL	QM	F	P
Teor interno	2	2153,17	61,91**	<0,0001
CV (%)			35,03	
Teor interno			Teste de médias	
Controle			0,0000	b
2 HAA			23,5997	a
24 HAA			26,9075	a

Fonte de variação	Absorção (2025)			
	GL	QM	F	P
Teor externo	2	1021594,16	57,71**	<0,0001
CV (%)			36,34	
Teor externo			Teste de médias	
Controle			0,0000	b
2 HAA			589,6714	a
24 HAA			444,4447	a

**significativo a 1% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo o teste LSD, a 5% de probabilidade.

Figura 16 - Teor interno e externo de fomesafen (250 g i.a. ha⁻¹) em plantas de *Bidens subalternans* em diferentes tempos após aplicação (2 e 24 HAA) – ciclo experimental de 2025



Os resultados para o teor interno de fomesafen às 2 HAA, em média, foram de $23,59 \mu\text{g g}^{-1}$ MS, no entanto, em diferença ao ano de 2023, observa-se um acréscimo na concentração interna da molécula às 24 HAA ($26,90 \mu\text{g g}^{-1}$ MS) (Figura 16). De forma externa, os teores foram encontrados em concentrações de $589,67 \mu\text{g g}^{-1}$ MS para 2 HAA, enquanto para 24 HAA foi de $444,44 \mu\text{g g}^{-1}$ MS. Os valores de absorção variam entre os momentos de coleta sendo que para 2 HAA a absorção da molécula foi de 4,00%, apresentando diferença para 24 HAA (6,18%).

Alguns fatores são intrínsecos a absorção de herbicidas pelas plantas, podem reduzir consideravelmente a retenção, absorção e translocação dessas moléculas. Fatores associados: à planta (estádio de desenvolvimento, morfologia e conformação anatômica das folhas, caule e raízes e espécie); à fatores ambientais (velocidade do vento, umidade relativa do ar e do solo, temperatura, luz e condições edafoclimáticas); a tecnologia de aplicação (ponta de pulverização, velocidade de aplicação e pressão); e, características do produto (concentração, adjuvantes, características físico-químicas e formulação) (Velini *et al.*, 2009). Os fatores correlacionados a condições ambientais podem influenciar, antes ou após aplicação. O desempenho da molécula pode ser influenciado pela temperatura, fator de contraste quando relacionado a influência na absorção e translocação de herbicidas, podendo reduzir ou aumentar sua capacidade (Kudsk; Kristensen, 1992).

Fomesafen, um herbicida de contato, tem capacidade de induzir rapidamente a geração de radicais livres nas células, consequentemente, destruindo membranas, levando-as a morte celular e necrose (Dayan *et al.*, 2018). No entanto, é necessário que haja a retenção e absorção da molécula em concentrações suficiente para desencadear a ação herbicida. Fomesafen, um herbicida ácido fraco (pK_a 2,83), possui um log Kow de -1,2, que significa que apresenta uma baixa hidrofobicidade, ou seja, bastante solúvel em água. Desse modo, há uma certa dificuldade para reter e absorver nas primeiras barreiras das folhas das plantas, como a cutícula.

Como dito anteriormente, a temperatura é fator que influencia diretamente a absorção de fomesafen em plantas daninhas. Em trabalhos com moléculas radiomarcadas de fomesafen realizados por Trezzi *et al.* (2021), em populações de *Euphorbia heterophylla*, a absorção de ^{14}C -fomesafen aumentou conforme elevação de temperatura, com variações, em média, de 11% em 6 horas após o tratamento (HAT), com temperaturas de 10/5°C, com aumento para 42% de absorção em 48 HAT, com temperaturas de 20/15 e 30/25°C.

Nesse sentido, a baixa absorção encontrada nos estudos de 2023 (5,27 e 5,02%) e 2025 (4,00 e 6,18%), as 2 HAA e 24 HAA, respectivamente, podem estar correlacionadas com condições climáticas no momento de implantação e condução dos experimentos, com regimes de temperatura de 25/15°C, além das estruturas da planta ou características físico-químicas do produto, que dificultam a absorção, ou por último, pela coleta das amostras em períodos reduzidos. Desse modo, recomenda-se realizar estudos em momentos com regime de temperaturas superiores a 20/15°C, com períodos de coletas superiores a 24 HAA, para determinar a absorção de fomesafen em plantas de *Bidens subalternans* por períodos mais longos.

Em síntese, porcentagens diminutas de absorção de fomesafen em plantas de *Bidens subalternans*, registradas em 2023 e 2025, demonstram que grande parte do herbicida, em média de 95%, não é absorvido pela planta, sendo potencialmente perdido para o ambiente. Nesse contexto, há necessidade de intensificar os estudos com propósito de verificar fatores que implicam na absorção limitada da molécula, levando em consideração tanto características morfológicas e fisiológicas da planta, quanto as características físico-químicas e formulação do produto comercial.

4.3 Experimento 3: Análises bioquímicas (SOD, CAT, POD e MDA)

Conforme a análise de variância (ANOVA), para os tratamentos de *Bidens subalternans*, não houve diferença significativa entre a testemunha e 2 horas após a aplicação, para as análises de SOD, CAT, POD e MDA (Tabela 9).

Tabela 9 - Análise de variância para peroxidação de lipídios (LIPO) (MDA x 10³, nmol g massa fresca⁻¹), atividade da superóxido dismutase (SOD, U x 10⁻³ mg⁻¹ de proteína), atividade da catalase (CAT, µKat µg⁻¹ de proteína), atividade da peroxidase (POD, µmol de purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ de proteína)

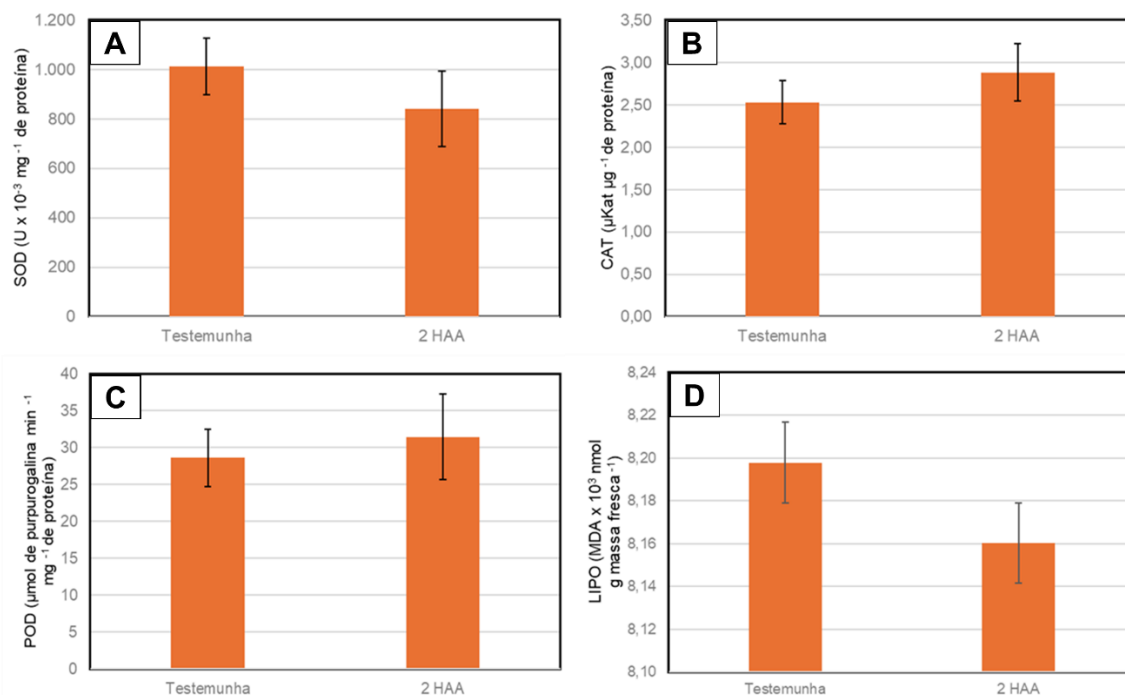
Fonte de variação	Bioquímica			
	GL	QM	F	P
SOD	1	146155,20	3,10 ^{ns}	0,0955
CAT	1	0,6179	2,65 ^{ns}	0,1209
POD	1	29,10	0,46 ^{ns}	0,5073
MDA	1	0,0070	0,00 ^{ns}	0,9581

Bioquímica	Coeficiente de variação (%)
SOD	23,44
CAT	17,84
POD	26,38
MDA	19,32

^{ns}não significativo.

Para superóxido dismutase (SOD), os valores foram de 1012,04 Ux10³ mg⁻¹ de proteína para o controle, enquanto para o aplicado foi encontrado valores de 841,07 Ux10³ mg⁻¹ de proteína (Figura 17A). Para catalase (CAT), foram observados a presença de 2,53 µKat µg⁻¹ de proteína para o controle, por outro lado para o tratamento aplicado foi de 2,88 µKat µg⁻¹ de proteína (Figura 17B). Para peroxidase (POD), foram observados a atividade enzimática de 29,01 µmol de purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ de proteína para o controle, por outro lado para o tratamento aplicado foi de 31,42 µmol de purpurogalina min⁻¹ mg⁻¹ de proteína (Figura 17C). Para peroxidação de lipídios (LIPO), relata-se com base na presença de malonaldeído (MDA), sendo que para o controle é de 8,19 MDAx10³ nmol g mF⁻¹, enquanto para o tratamento aplicado a concentração é de 8,16 MDAx10³ nmol g mF⁻¹ (Figura 17D).

Figura 17 – Atividade de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica em *Bidens subalternans* tratadas com fomesafen (250 g i.a. ha⁻¹) e testemunha: a) superóxido dismutase (SOD); b) catalase (CAT); c) peroxidase (POD); d) peroxidação lipídica (LIPO)



Grandes concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROS) promovem a degradação das membranas em resultado a peroxidação de lipídeos (Rossatto *et al.*, 2017). As atividades de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e POD, é em resposta direta aos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas plantas (Jiang *et al.*, 2020). Em estudos de Langaro *et al.* (2017), observou-se a utilização de pré-emergentes na cultura do arroz, como oxyflurofen e oxadiazon, atuando como causadores de estresse oxidativo em resposta ao acúmulo de ERO, em consequência, aumentando a atividade de SOD, CAT e APX. Oxyfluorfen e oxadiazon são herbicidas inibidores da PROTOX, como o fomesafen.

A hipótese da não significância dos dados desse estudo se dá pelo curto período de coleta das amostras, impossibilitando o tempo de reação do herbicida sobre o acúmulo de ERO e resposta de enzimas antioxidantes. Contraste observado por Shivani *et al.* (2025), em genótipos de lentilha, onde a SOD é a primeira enzima a atuar contra o estresse oxidativo, dismutando o peróxido de hidrogênio, no entanto, não houve detoxificação de H₂O₂, resultando em atividades de CAT e APX menores em diferentes dias após a aplicação.

Em estudos de Li *et al.* (2022), relatou-se o aumento da SOD em resposta ao aumento da concentração de fomesafen, no entanto, para enzimas CAT, essa relação tendeu ao inverso, diminuindo sua atividade. Sher *et al.* (2021), observou o acréscimo da atividade de POD e PPO em concentrações baixas de fomesafen, enquanto há decréscimo da atividade em altas concentrações, indicando a capacidade de suprimir enzima pelo fomesafen. Em beterraba sacarina, a atividade reduzida de CAT, deu-se pela supressão do estresse residual e ao aumento de H_2O_2 (Sher *et al.*, 2021). Lukatkin *et al.* (2013) constatou aumento no teor de malonaldeído (MDA), em aplicações de clodinafope em *Triticum aestivum* e *Secale cereale*.

Estudos de Guo *et al.* (2023), observou-se repostas diferentes, com coletas aos 1, 3, 5, 7 e 14 dias após a aplicação de fomesafen em plantas de *Amaranthus retroflexus*. Em um futuro estudo com *Bidens subalternans*, com aplicações de fomesafen em pós-emergência, sugere-se coletar em períodos maiores, variando concentrações do ingrediente ativo, com propósito de identificar diferentes respostas encontradas nesse estudo de enzimas antioxidantes.

4.4 Experimento 4: Doses fracionadas de fomesafen

Conforme a análise de variância (ANOVA), para os tratamentos de *Bidens subalternans*, houve diferença significativa entre a testemunha e os tratamentos com dose fracionada para variável controle (%) (Tabela 10).

Desse modo, com base no teste de média t student LSD ($<0,05$), observou-se para terceiro dia após a primeira aplicação percentuais de 4,80 e 4,60%, para doses de 0,625 e 0,625+ g i.a. ha^{-1} , respectivamente. Ressalta-se um acréscimo no controle ao terceiro dia após a 4 aplicação, onde há diferença entre doses fracionadas com aplicação da mesma quantidade de ingrediente ativo (0,625 g i.a. ha^{-1}), com controle de 33,80%, e com aplicação fracionada, no entanto, cada aplicação dobrando a dose de ingrediente ativo (0,625+ g i.a. ha^{-1}), com percentual de controle de 37,60%.

Ao final da quarta aplicação, plantas tratadas com a mesma quantidade de ingrediente ativo acumularam 2,5 g i.a. ha^{-1} , enquanto plantas tratadas com dobro acumularam 9,375 g i.a. ha^{-1} , ou seja, a ampliação dos resultados de controle pode ser explicada pelo maior acúmulo de molécula nas células. Diferenças percentuais entre os tratamentos, ainda que significativa, demonstra que doses pequenas de um herbicida, como no caso 0,625 g i.a. ha^{-1} de fomesafen (400X menor a dose de

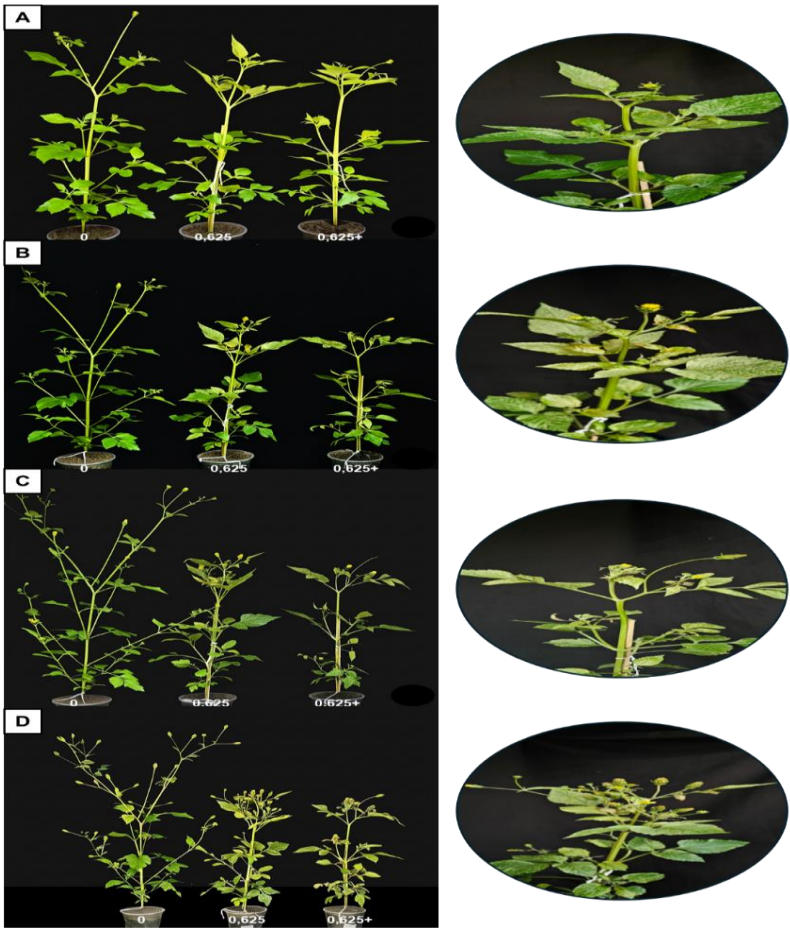
comercial), podem atribuir controle em espécies de plantas daninhas com contato direto e contínuo de uma molécula (Figura 18).

Tabela 10 - Controle visual (%) de *Bidens subalternans* submetidas a doses fracionadas de fomesafen, com avaliações sequenciais a cada 3 dias após cada aplicação

Doses (g i.a. ha ⁻¹)	Controle (%)							
	3DA1A		3DA2A		3DA3A		3DA4A	
0	0	b	0	c	0	c	0	c
0,625	4,80	a	8,20	b	27,80	b	33,80	b
0,625+ ¹	4,60	a	9,40	a	30,20	a	37,60	a
<i>p</i> -valor	<0,0001		<0,0001		<0,0001		<0,0001	
CV (%)	13,02		13,91		3,53		3,43	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo o teste LSD, a 5% de probabilidade.

Figura 18 - Sintomas visuais em *Bidens subalternans* submetidas a doses fracionadas de fomesafen: a) 3 dias após 1ª aplicação (3DA1A); b) 3DA2A; c) 3DA3A; d) 3DA4A



A aplicação de herbicidas em área foliar, por mais que a folha pulverizada pareça umedecida, na realidade, apresenta uma camada irregular de distribuição de solução (Hess, 1987). Dessa maneira, da camada de solução origina-se cristais sobre o limbo foliar, devido a evaporação do solvente (Xu *et al.*, 2010). A movimentação das moléculas de herbicidas na cutícula ocorre em sua maioria por difusão, quando essas encontram-se em solução. Em razão da formação de cristais, a uma redução da eficácia dos herbicidas, fato que ocorre com maior velocidade em aplicações por pulverização (Xu *et al.*, 2010).

Os sintomas das aplicações de fomesafen em doses fracionadas são facilmente observados em folhas mais jovens. Em síntese, tecidos mais jovens apresentam maior sensibilidade aos inibidores da PROTOX pelo fato da alta atividade metabólica durante o desenvolvimento foliar, intensificando o fluxo na via da clorofila e acúmulo de intermediários fotodinâmicos. Halling e Peters (1987) mostram que folhas em *greening* (desenvolvimento ativo) são mais afetadas por dinefiléteres, como o acifluorfen. Em contraste, estudos desenvolvidos por Kim *et al.* (2010), relatam maior necrose e acúmulo de tetrapirróis em folhas jovens quando comparadas com folhas maduras. Grossmann *et al.* (2010), demonstra que saflufenacil ocasiona acúmulo de protoporfirina e H₂O₂ em brotos e discos foliares jovens de espécies suscetíveis, reafirmando com base fisiológica a maior suscetibilidade dos tecidos jovens.

Portanto, a imersão de *Bidens subalternans* em calda de fomesafen, mesmo que em concentrações baixas, possibilita uma melhor distribuição da solução sobre a superfície foliar, além de favorecer o contato do herbicida com suas rotas de absorção na planta. Além disso, favorece a compreensão da dinâmica dos herbicidas em plantas, uma vez que é necessário doses menores para observar efeitos no controle de *Bidens subalternans*. Desse modo, sugere-se a utilização desse método para descobrir concentrações letais para planta, utilizando proporções inferiores a dose comercial, além de possibilitar realizar ensaios específicos em um conjunto menor de unidades experimentais.

4.5 Experimento 5: Bloqueadores da P450

O controle de *B. subalternans* foi significativo na ANOVA, a um nível de 1% de probabilidade para os tratamentos estudados (Tabela 11). Quando aplicado de forma isolada, fomesafen apresentou controle moderado das plantas de *Bidens*

subalternans, a uma dose de 250 g i.a. ha⁻¹, com variação de 60%, 68% e 73% aos 7, 14 e 21 DAA, respectivamente. Por outro lado, a associação de moléculas com capacidade de bloquear a ação da enzima P450 promoveram maior controle nas plantas, como no caso de fomesafen mais malathion, com percentuais de 86,4%, 90,0% e 99,0% aos 7, 14 e 21 DAA, respectivamente. A combinação de fomesafen mais dietholate (aplicado no momento do transplante), aumentou de forma considerável o controle de BIDSU, quando comparado aos valores obtidos com fomesafen isolado, ficando na faixa de 82, 84 e 72% de controle, aos respectivos dias de avaliação. Os resultados sugerem que o uso de inibidores da P450, em especial o malathion, pode potencializar a ação do fomesafen, resultando em maior controle de *Bidens subalternans*.

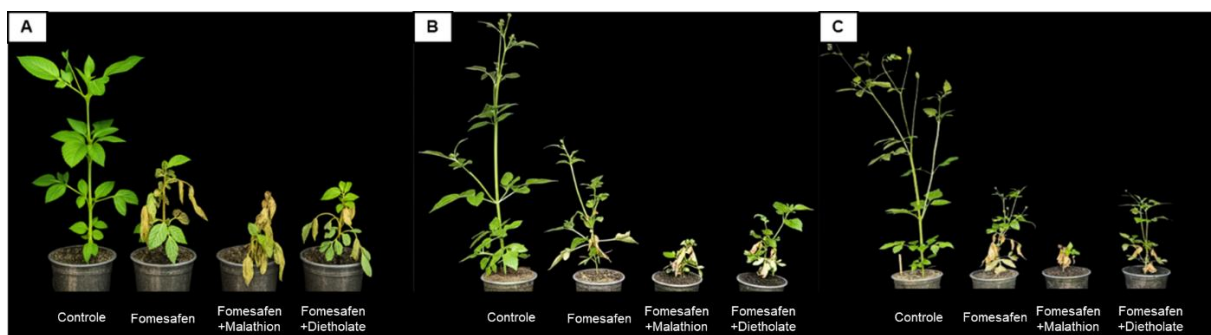
A Figura 19 representa os efeitos visuais dos tratamentos ao longo dos períodos avaliados, sendo a imagem A correspondente à avaliação aos 7 dias após aplicação (DAA), a imagem B aos 14 DAA e a imagem C aos 21 DAA. Observa-se nitidamente a eficácia dos tratamentos contendo malathion aplicado previamente ao fomesafen. Os sintomas são aparentes quando comparados aos tratamentos somente com fomesafen isolado, logo nos primeiros dias após a aplicação.

Tabela 11 - Controle visual (%) de *Bidens subalternans* submetidas à aplicação de fomesafen (250 g i.a. ha⁻¹) em associação a bloqueadores da P450, com avaliações aos 7, 14 e 21 DAA

Tratamentos	Controle (%)					
	7 DAA		14 DAA		21 DAA	
Testemunha	0	d	0	d	0	c
Fomesafen	60,40	c	68,60	c	73,70	b
Fomesafen+Malathion	86,40	a	90,00	a	99,00	a
Fomesafen+Dietholate	82,00	b	84,00	b	72,20	b
<i>p-valor</i>	<0,0001		<0,0001		<0,0001	
CV (%)	1,65		1,60		2,63	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si segundo o teste LSD, a 5% de probabilidade.

Figura 19 - Sintomas visuais da aplicação de bloqueadores da P450 associados ao fomesafen em *Bidens subalternans*: a) 7 DAA; b) 14 DAA; c) 21 DAA



Inseticidas organofosforados, como o malathion, podem aumentar significativamente a eficácia de alguns herbicidas pela inibição da metabolização das moléculas, possibilitando o alcance ao sítio de ligação enzimática (Carvalho *et al.*, 2021). Dados obtidos nesse experimento corroboram com estudos de Chitband *et al.* (2024), onde encontrou-se efeito sinérgico sobre herbicidas inibidores da biossíntese de aminoácidos e fotossistema I (PSI), por intermédio da indução da atividade inibidora da monoxigenase do citocromo P450. Desse modo, é necessário expandir a combinação de inseticidas organofosforados com outros herbicidas de mecanismos de ação diferentes, com interesse de avaliar o potencial de interações sinérgicas (Chitband *et al.*, 2024), como encontradas no estudo com fomesafen em *Bidens subalternans*.

Por outro lado, dietholate, um éster do ácido fosfórico, também atuando como bloqueador da atividade inibidora da monoxigenase do citocromo P450, quando em combinações com o clomazone e outros herbicidas em pós-emergência, pode reduzir a seletividade em culturas (Sanchotene *et al.*, 2010). Em estudos de Schmitz *et al.* (2015), dietholate apresentou efeitos negativos na proteção de culturas, como o trigo, aos efeitos fitotóxicos do herbicida clomazone, não sendo recomendado o uso de dietholate em combinação com clomazone em pós-emergência da cultura. O tratamento com dietholate não reduziu o controle de azevém e de nabo quando aplicados em pré-emergência com o herbicida clomazone (Schmitz *et al.*, 2018).

Em suma, é necessário realizar novos estudos com herbicidas de diferentes mecanismos de ação associados ao dietholate, com foco em compreender a atividade inibitória da enzima do citocromo P450. Os efeitos positivos da associação de

dietholate (no momento do transplante) com fomesafen no controle de *B. subalternans* aplicado em pós-emergência demonstra alternativas para aumentar o controle de algumas espécies, no entanto, com observação aos efeitos fitotóxicos em culturas.

Com base na ANOVA, para a variável massa seca (%), houve diferença significativa a um nível 1% de significância entre os tratamentos (Tabela 12).

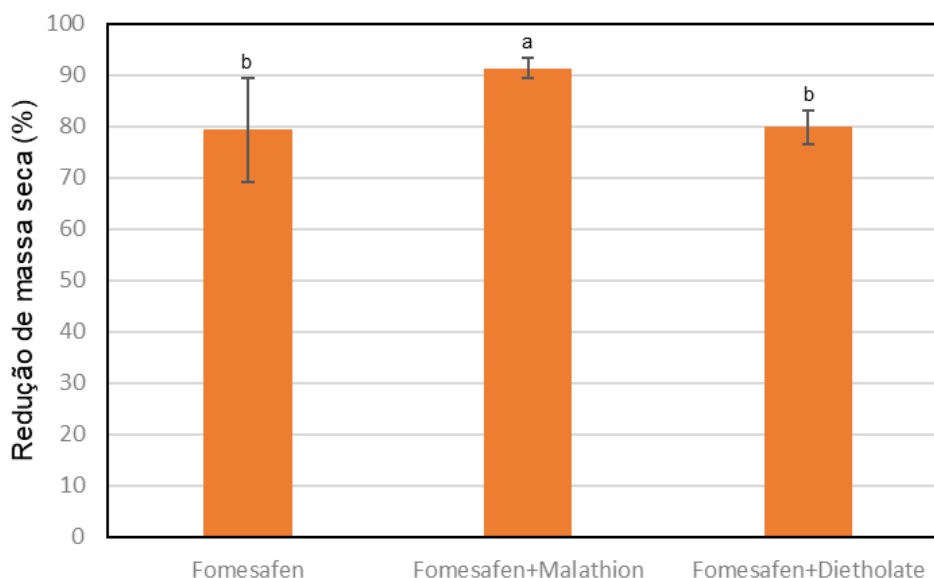
Tabela 12 - Análise de variância para massa seca de *Bidens subalternans* submetidas à aplicação de fomesafen (250 g i.a. ha⁻¹) em associação a bloqueadores da P450

Fonte de variação	Bloqueadores da P450			
	GL	QM	F	P
Massa seca	3	8879,59	229,14**	<0,0001
CV (%)			9,93	

**significativo a 1% de probabilidade.

De modo a dar sequência, destaca-se os tratamentos com fomesafen mais malathion, como o maior redutor de massa seca de *Bidens subalternans*. Os maiores percentuais de redução de massa seca foram observados nos tratamentos com associação de fomesafen mais malathion (91,38%) aos 21 DAA, em segundo momento, os tratamentos com fomesafen isolado e em associação ao dietholate, reduziram 79,35 e 79,92%, respectivamente, aos 21 DAA (Figura 20).

Figura 20 - Redução percentual da massa seca de *Bidens subalternans* em relação à testemunha, após aplicação de bloqueadores da P450 combinados a fomesafen



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si segundo o teste LSD, a 5% de probabilidade.

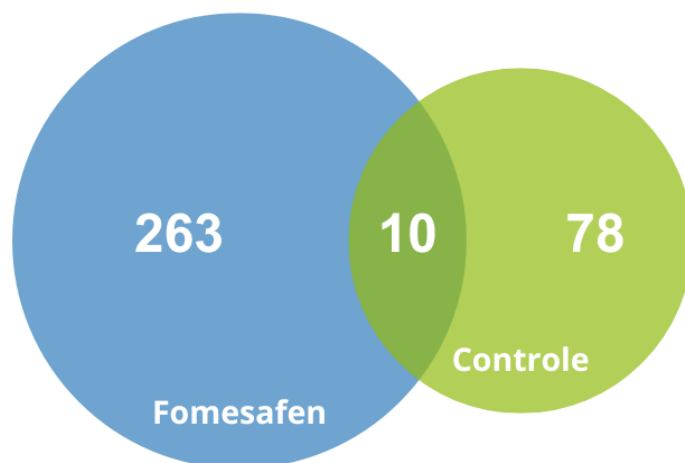
Em tratamentos de semente de arroz com dietholate, em associação a aplicação em pré-emergência de clomazone, surtiu efeitos negativos na seletividade em formulações compostas por imazapyr+imazapic, aplicada em pós-emergência na cultura (Piveta *et al.*, 2018). Alguns efeitos negativos na cultura do arroz foram observados no estudo de Piveta *et al.* (2018), como a redução da taxa fotossintética, taxa de transpiração e condutância estomática. Em estudos de Dalazen *et al.* (2018), em capim-arroz, observou-se a redução no acúmulo de massa seca de populações de plantas daninhas, após a aplicação prévia de inibidores da P450, como malathion, em combinação a doses baixas de imazetapir (26,5; 53 e 106 g ha⁻¹).

Desse modo, a associação de herbicidas com inseticidas bloqueadores do Citocromo P450, como malathion e dietholate, deve ser explorada para identificar novas ferramentas para o controle de plantas daninhas, de modo a reduzir capacidade fisiológica, acúmulo de massa seca e, conseqüentemente, o controle eficaz das plantas. No entanto, é necessário ampliar o conhecimento dessa ferramenta, a fim de aumentar o controle e reduzir os possíveis efeitos negativos para cultura de interesse. O uso dessa estratégia representa uma ferramenta promissora para ampliar a eficácia de herbicidas inibidores da PROTOX, como o fomesafen.

4.6 Metabolômica

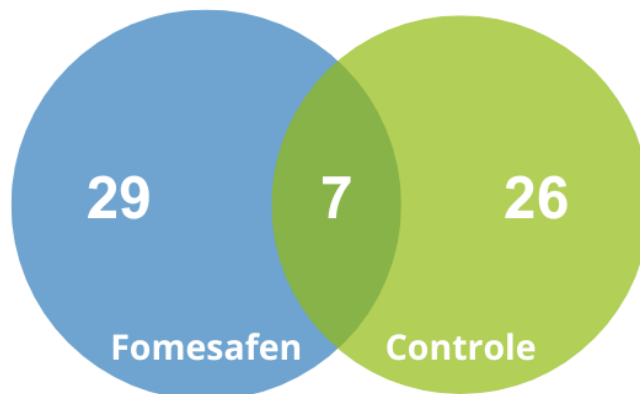
Em respostas ao fomesafen, encontrou-se uma variação nas quantidades de metabólitos presentes nas plantas de *Bidens subalternans* aplicadas em comparação aos encontrados na testemunha sem aplicação. Levou-se em consideração as moléculas presentes em, pelo menos, três das cinco repetições. Desse modo, análises realizadas em modo positivo demonstram a presença de 263 metabólitos em plantas tratadas, enquanto para testemunha com apenas 78 metabólitos, sendo que em comum aos tratamentos encontrou-se apenas 10 compostos (Figura 21). A presença de maiores quantidades de compostos nas plantas aplicadas com fomesafen reforçam a ideia de que há um sistema sinalizador de estresse e defesa em massa, demonstrando a tentativa do organismo em metabolizar a molécula do herbicida.

Figura 21 - Diagrama de Venn representando a distribuição de metabólitos detectados por LC-MS/MS Q-TOF em modo de ionização positiva para *Bidens subalternans*



Por outro lado, em modo negativo, com foco em compostos ácidos (como ácidos orgânicos, fenólicos e graxos), a resposta do perfil metabólico de *Bidens subalternans* aplicadas com fomesafen foi mais simétrica, quando comparada ao controle. Com a presença de 29 compostos para o tratamento aplicado, enquanto 26 metabólitos presentes no controle, sendo em comum aos dois tratamentos o total de 7 compostos (Figura 22).

Figura 22 - Diagrama de Venn representando a distribuição de metabólitos detectados por LC-MS/MS Q-TOF em modo de ionização negativa para *Bidens subalternans*



Em síntese, pelo diagrama de Venn, nas duas polarizações (positiva e negativa), sugere-se uma hipótese unificada e robusta. A aplicação de fomesafen em plantas de *Bidens subalternans* pode gerar duas respostas, a primeira, visível em modo positivo, amplifica a produção de compostos de defesa e detoxificação como o estímulo a defesa e metabolização do herbicida de forma imediata, e em segunda instância, uma resposta adaptativa e específica, visível em modo negativo, com o reajuste de compostos ácidos, suprimindo funções importantes para fortalecer um sistema antioxidante a fim de adaptar-se ao estresse químico do herbicida.

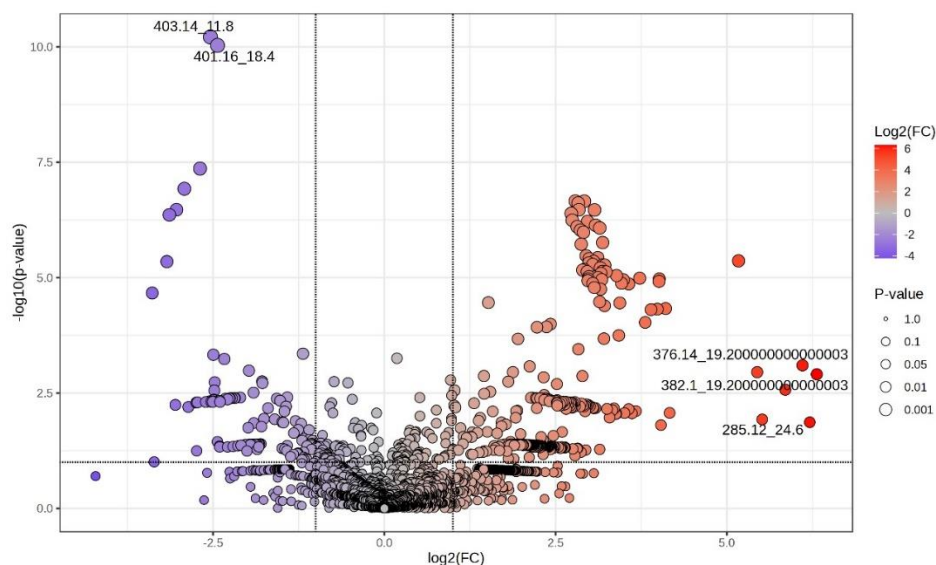
Resultados de acréscimo na produção de compostos foram encontrados em trabalhos de Maroli *et al.* (2015), relatando a elevação na produção de vários metabólitos com capacidade antioxidante em biótipos resistentes de *Amaranthus palmeri* após a aplicação do herbicida glifosato. Por outro lado, em biótipos suscetíveis de *A. palmeri*, após a aplicação, notou-se um maior acúmulo de aminoácidos induzidos pelo glifosato (Maroli *et al.*, 2016), fato explicado em consequência da proteólise (catabolismo) em associação à síntese de aminoácidos novos, além da desintoxicação e metabolismo do herbicida (Wang *et al.*, 2017).

Por último, na figura 23, está representado o gráfico vulcão, que tem como fundamentação a investigação de uma contagem de presença ou ausência de forma quantitativa das alterações metabólicas induzidas pelo fomesafen. Onde, no $\log_2(FC)$, no eixo horizontal, representa a intensidade de mudança, e $-\log_{10}(p\text{-value})$, no eixo vertical, demonstra a significância dos dados, onde valores mais altos indicam maior confiabilidade. Metabólitos que apresentam elevada concentração quando tratados

com fomesafen estão no lado direito do gráfico, representados pelos tons vermelho e laranja, enquanto para os que diminuíram sua abundância estão pelo tom roxo. Pontos localizados nos extremos superiores do gráfico representam alterações com maior grau de confiabilidade.

A concentração elevada de pontos para o lado direito do gráfico demonstra que o tratamento com fomesafen estimulou o aumento de uma abundância de metabólitos do que sua supressão. Desse modo, em contraste aos números encontrados pelo diagrama de Venn, sugere-se uma indução de grande contraste nas vias metabólicas. Em resultado a isso, alguns compostos encontrados em zonas extremas do gráfico, tais como no canto superior direito, os pontos como 285.12_24.6, 376.14_19.20 e 382.1_19.20, representam metabólitos fortemente induzidos, em hipótese a serem candidatos como biomarcadores da exposição ao fomesafen. Pontos no canto superior esquerdo, como 403.14_11.8 e 401.16_18.4, levam em consideração metabólitos que tiveram vias fortemente suprimidas pela ação do fomesafen. Em suma, o gráfico de vulcão demonstra de forma detalhada a reprogramação metabólica, dando indícios de possíveis biomarcadores, ou correlação com os diagramas de Venn. Desse modo, os próximos estudos tendem a identificar os níveis de confiabilidade desses compostos, para atuarem como indicadores de supressão e indução do herbicida fomesafen em plantas.

Figura 23 - Gráfico vulcão representando a reprogramação metabólica de *Bidens subalternans* após aplicação de fomesafen (250 g i.a. ha⁻¹)



5 CONCLUSÕES

Doses acima de 1000 g i.a. ha⁻¹ foram necessárias para atingir controle de 100% de *Bidens subalternans* aos 21 DAA, enquanto a dose comercial recomendada (250 g i.a. ha⁻¹), mostrou-se inadequada nas condições do estudo, com percentuais de 43% de controle, 81% de redução de massa seca, 48,1% da taxa de transporte de elétrons quando comparada à testemunha, aos 21 DAA.

Absorção de fomesafen ocorreu de forma reduzida, nos dois anos de estudo, variando de 4 a 6% nas primeiras 24 HAA, permanecendo-se constante, indicando a necessidade de coletar em maiores períodos.

Atividade da SOD, CAT, POD e MDA não foi significativa, tornando-se necessário coletar plantas em períodos superiores a 2 horas após a aplicação para observar possíveis alterações.

Doses fracionadas de fomesafen, ainda que inferiores, podem gerar efeito de controle cumulativo e significativo em *Bidens subalternans*, com o controle aos 3DA4A de 33 a 38%.

Fomesafen quando aplicado em associação ao malathion pode apresentar maior eficácia, com controle de até 99% aos 21 DAA.

Metabolômica mostrou-se uma ferramenta promissora ao revelar que o fomesafen aplicado em plantas de *Bidens subalternans* pode induzir uma alteração metabólica, em resposta ao estresse químico do herbicida, amplificando uma variedade de compostos não encontrados na testemunha sem aplicação.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S. *et al.* A comprehensive overview of omics-based approaches to enhance biotic and abiotic stress tolerance in sweet potato. **Horticulture Research**, v. 11, uhae014, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/hr/uhae014>.
- ALCÁNTARA DE LA CRUZ, R.; AMARAL, G.; MENDES, K. F.; *et al.* Absorption, translocation, and metabolism studies of herbicides in weeds and crops. In: MENDES, K. F. (ed.). **Radioisotopes Weed Research**. Boca Raton: CRC Press, 2021. p. 127–154.
- ALIFERIS, K. A.; CHRYSAYI-TOKOUSBALIDES, M. Metabolomics in pesticide research and development: review and future perspectives. **Metabolomics**, v. 7, p. 35–53, 2011.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- BAHARUM, S. N.; AZIZAN, K. A. Metabolomics in Systems Biology. In: _____. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Cham: Springer, 2018. v. 1102, p. 51-68.
- BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, p. 453-460, 2014.
- BARCELO, A. R.; PEDRENO, A.; MUNOZ, R.; SABATER, F. Physiological significance of the binding of acidic isoperoxidases to cell walls of lupin. **Physiologia Plantarum**, v. 75, p. 267-274, 1989.
- BARKER, A. L. *et al.* Discovery, mode of action, resistance mechanisms, and plan of action for sustainable use of Group 14 herbicides. **Weed Science**, v. 71, p. 173-188, 2023. DOI: 10.1017/wsc.2023.15.
- BARTOLOME, A. P.; VILLASEÑOR, I. M.; YANG, W. E. *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical Properties, Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 51 p., 2013.
- BECERRIL, J. M.; DUKE, S. O. Protoporphyrin IX content correlates with activity of photobleaching herbicides. **Plant Physiology**, v. 90, p. 1175–1181, 1989.
- BOWN, A. W.; HALL, D. E.; MACGREGOR, K. B. Insect footsteps on leaves stimulate the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. **Plant Physiology**, v. 129, n. 4, p. 1430–1434, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CARVALHO, G. S. *et al.* Inibidor das enzimas do citocromo P450 no controle de *Digitaria insularis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 45, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-7054202145024520>.

CARVALHO, L. B. de. **Herbicidas**. Lages, SC: Edição do Autor, 2013.

CHAO, H. *et al.* Integrating omics databases for crop improvement. **Journal of Integrative Bioinformatics**, v. 20, p. 12, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1515/jib-2023-0012>.

CHEN, D.; WANG, S.; CAO B.; CAO, D.; LENG, G.; LI, H.; YIN, L.; SHAN, L.; DENG, X. Genotypic variation in growth and physiological response to drought stress and re watering reveals the critical role of recovery in drought adaptation in maize seedlings. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1-15, 2016.

CHITBAND, A. A.; RASTGOO, M.; ASADI, G. A. Joint action of malathion with herbicides against *Alhagi pseudalhagi* (Bieb.) Desv. **Advances in Weed Science**, v. 42, e020240048, out. 2024.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; VICTÓRIA FILHO, R.; SILVA, C. B. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. **Planta Daninha**, v. 12, p. 13–20, 1994.

COBB, A. H.; READE, J. P. H. Herbicide uptake and movement. In: COBB, A. H.; READE, J. P. H. (ed.). **Herbicides and plant physiology**. New York: Wiley, 2010. p. 50–69.

COLEMAN, J. O. D.; BLAKE-KALFF, M. M. A.; DAVIES, T. G. E. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 144–151, 1997.

DALAZEN, G. *et al.* Degradation enhancement as the mechanism of resistance to imazethapyr in barnyard-grass. **Planta Daninha**, v. 36, p. e018179504, 2018.

DAYAN, F. E.; BARKER, A.; DAYAN, L. C.; RAVET, K. The role of antioxidants in the protection of plants against inhibitors of protoporphyrinogen oxidase. **Reactive Oxygen Species**, v. 7, p. 55–63, 2019.

DAYAN, F. E.; BARKER, A.; TRANEL, P. J. Origins and structure of plant chloroplastic and mitochondrial protoporphyrinogen oxidases: implications for the evolution of herbicide resistance. **Pest Management Science**, v. 74, p. 2226–2234, 2018.

DAYAN, F. E.; TRINDADE, M. L. B.; VELINI, E. D. Amicarbazone, a new photosystem II inhibitor. **Weed Science**, v. 57, n. 6, p. 579–583, 2009.

DIMAANO, N. G.; IWAKAMI, S. Cytochrome P450-mediated herbicide metabolism in plants: current understanding and prospects. **Pest Management Science**, v. 77, p. 22–32, 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA; COBUCCI, T.; DI STEFANO, J. G.; KLUTHCOUSKI, J. **Manejo de plantas daninhas na cultura do feijoeiro em plantio direto**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 56 p. (Circular Técnica, 35).

FIEHN, O. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, p. 155–171, 2002.

GAINES, T. A. *et al.* Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 3, p. 1029–1034, 2010.

GELMINI, G. A. *et al.* Resistência de *Bidens subalternans* aos herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase utilizados na cultura da soja. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 20, n. 2, p. 319–325, 2002.

GIANNOPOLITIS, C. N.; REIS, S. K. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309–314, 1997.

GILL, S. S.; NASER, A. A.; GILL, R.; YADAV, S.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; PANCHANAND, S. C.; TUTEJA, N. Superoxide dismutase — mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 10375–10394, 2015.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010.

GROSSMANN, K. *et al.* Saflufenacil in bioassays with maize coleoptiles and young shoots of velvetleaf and black nightshade. **Weed Science**, v. 58, p. 1–9, 2010.

GROVER, R.; CESSNA, A. J. **Environmental chemistry of herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 302 p.

GUO, Y.; WANG, Y.; ZANG, X.; LUO, C.; HUANG, C.; CONG, K. *et al.* Transcriptomic analysis of *Amaranthus retroflexus* resistant to PPO-inhibitory herbicides. **PLoS ONE**, v. 18, e0288775, 2023.

GUO, J.; ZHU, G.; SHI, J.; SUN, J. Adsorption, desorption, and mobility of fomesafen in Chinese soils. **Air, Water, and Soil Pollution**, v. 14, n. 1, p. 77–85, 2003.

HALLING, F. R.; PETERS, W. Influence of chloroplast development on acifluorfen-methyl activity. **Plant Physiology**, v. 84, p. 763–767, 1987.
HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M. H. M. B.; ZULFIQAR, F.; RAZA, A.; MOHSIN, S. M.; MAHMUD, J. A.; FUJITA, M.; FOTOPOULOS, V. Reactive Oxygen Species

and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. **Antioxidants** (Basel), v. 9, n. 8, p. 681, 2020.

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. A família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, p. 687–749, 2008.

HATZIOS, K. K. Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants: a brief overview and directions for future research. In: HATZIOS, K. K. (ed.). Regulation of enzymatic systems detoxifying xenobiotics in plants. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, 1997. p. 1–5.

HEAP, I. **The International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. [S.l.: s.n.], 2025. Disponível em: <https://www.weedscience.org>. Acesso em: 27 mai. 2025.

HESS, F. D. Herbicide absorption and translocation and their relationship to plant tolerances and susceptibility. In: DUKE, S. O. (ed.). **Weed Physiology**, Vol. II: Herbicide Physiology. Boca Raton: CRC Press, 2018. p. 191.

HESS, F. D. Relationship of plant morphology to herbicide application and absorption. In: McWHORTER, C. G.; GEBHARDT, M. R. (ed.). **Methods of applying herbicides**. Champaign: WSSA, 1987. p. 19–35.

INOUE, M. H.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas. In: **Biologia e manejo das plantas daninhas**. [S.l.: s.n.], 2011, p. 243–262.

JASPERS, P.; KANGASJÄRVI, J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. **Physiologia Plantarum**, v. 138, n. 4, p. 405–13, 2010.

JIANG, H. *et al.* The effect of benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH) treatment on regulation of reactive oxygen species metabolism involved in wound healing of potato tubers during postharvest. **Food Chem**, v. 309, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125608.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315–319, 1976.

KARIS, P. O.; RYDING, O. **Asteraceae cladistics and classification**. In: BREMER, K. (ed.). Timber Press. Portland, OR, USA, 1994. p. 559–569.

KENYON, W. H.; DUKE, S. O.; VAUGHN, K. C. Sequence of effects of acifluorfen on physiological and ultrastructural parameters in cucumber cotyledon discs. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 24, p. 240–250, 1985.

KIM, J. *et al.* Differential leaf tolerance of squash to oxyfluorfen at various leaf ages. **Pest Management Science**, v. 66, p. 123–130, 2010.

KISSMANN, K. G. **Bidens pilosa L. e Bidens subalternans DC**. São Paulo: BASF Brasileira, 1997. 6 p.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira S.A., 1992. v. 2, 798 p.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF, 1999. v. 2, 978 p.

KLEIN, A.; FELLIPE, G. M. Efeitos da luz na germinação de sementes de ervas invasoras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 7, p. 955–966, 1991.

KUDSK, J.; KRISTENSEN, J. **Efeito de fatores ambientais no desempenho do herbicida**. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE CONTROLE DE ERVAS DANINHAS, 1., 1992, Melbourne. Anais [...]. Victoria: Weed Science Society of Victoria, 1992. p. 173–186. Disponível em: <http://caws.org.nz/old-site/awc/1992/awc199211731.pdf>.

KUMAR, A.; PRASAD, A.; SEDLÁROVÁ, M.; POSPÍSIL, P. **Data on detection of singlet oxygen, hydroxyl radical and organic radical in Arabidopsis thaliana**. Data in Brief, v. 21, p. 2246–2252, 2018.

LANGARO, A. C. *et al.* Estresse oxidativo causado pelo uso de herbicidas pré-emergentes em arroz. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 2, p. 358–364, 2017. DOI: 10.5935/1806-6690.20170041.

LEE, R. M.; HAGER, A. G.; TRANEL, P. J. Prevalence of a novel resistance mechanism to PPO-inhibiting herbicides in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). **Weed Science**, v. 56, p. 371–375, 2008.

LEHNEN, L. P. J. *et al.* Tissue and cellular localization of acifluorfen-induced porphyrins in cucumber cotyledons. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 239–248, 1990.

LI, X. *et al.* Phytotoxicity response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings to herbicide fomesafen in soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 239, p. 113628, 2022. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2022.113628.

LUKATKIN, A. S.; GAR'KOVA, A. N.; BOCHKARJOVA, A. S.; NUSHTAEVA, O. V.; SILVA, J. A. T. Treatment with the herbicide TOPIK induces oxidative stress in cereal leaves. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 105, p. 44–49, 2013.

MARKUS, C. *et al.* Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. In: BARROSO, A. A. M.; MURATA, A. T. (Org.). **Matologia: estudos sobre plantas daninhas**. Jaboticabal: Editora Fábrica da Palavra, 2021. p. 324–364.

MAROLI, A. S.; NANDULA, V. K.; DAYAN, F. E.; DUKE, S. O.; GERARD, P.; THARAYIL, N. Metabolic profiling and enzyme analyses indicate a potential role of antioxidant systems in complementing glyphosate resistance in an *Amaranthus palmeri* biotype. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 9199–9209, 2015.

- MAROLI, A. S.; NANDULA, V. K.; DUKE, S. O.; THARAYIL, N. Stable isotope resolved metabolomics reveals the role of anabolic and catabolic processes in glyphosate-induced amino acid accumulation in *Amaranthus palmeri* biotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 7040–7048, 2016.
- MAZZA, C. A. *et al.* Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. **Plant Physiology**, v. 122, n. 1, p. 117–126, 2000.
- MENDES, K. F.; MIELKE, K. C.; D'ANTONINO, L.; SILVA, A. A. Absorption, translocation, and metabolism of herbicides in plants. In: FERREIRA, K. F.; SILVA, A. A. (ed.). **Applied Weed and Herbicide Science**. Champ: Springer Nature Switzerland AG, 2022. p. 157–186.
- MEROTTO JR, A.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da PROTOX. In: VIDAL, R.; MEROTTO JR, A. (ed.). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. 152 p.
- MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, p. 453–467, 2010.
- MIYAGI, A.; TAKAHARA, K.; TAKAHASHI, H.; KAWAI-YAMADA, M.; UCHIMIYA, H. Targeted metabolomics in an intrusive weed, *Rumex obtusifolius* L., grown under different environmental conditions reveals alterations of organ related metabolite pathway. **Metabolomics**, v. 6, p. 497–510, 2010.
- MIZUTANI, M.; SATO, F. Unusual P450 reactions in plant secondary metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 507, p. 194–203, 2011.
- MOHANTY, P.; PAPAGEORGIOU, G.; GOVINDJEE. Effect of S-triazines on the structure and function of the photosynthetic apparatus in isolated pea chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 15, n. 2, p. 331–340, abr. 1974. DOI: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a074997.
- NANDULA, V. K.; RIECHERS, D. E.; FERHATOGLU, Y.; *et al.* Herbicide metabolism: crop selectivity, bioactivation, weed resistance, and regulation. **Weed Science**, v. 67, p. 149–175, 2019.
- NEVE, P.; *et al.* Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistance research. **Pest Management Science**, v. 70, p. 1385–1396, 2014.
- NICOLAI, M. *et al.* Alternatives of management to the populations of *Bidens pilosa* and *Bidens subalternans* resistant to the ALS inhibitors herbicides. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 5, n. 3, p. 72–79, 2006. Disponível em: <http://www.rbherbicidas.com.br/index.php/rbh/article/view/3>. Acesso em: 19 jun. 2016. DOI: 10.7824/rbh.v5i3.3.
- OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Metabolomics-guided utilization of beneficial microbes for climate-resilient crops. **Current Opinion in**

Chemical Biology, v. 79, 102427, 2024. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2024.102427>.

OLIVEIRA JR., R. S.; BACARIN, M. A. Absorção e translocação de herbicidas. In: OLIVEIRA JR., R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. 1. ed. Curitiba: Omnipax, p. 215-242, 2011.

OLIVEIRA NETO, A. M. de; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S. de; GUERRA, N.; DAN, H. de A. Seletividade do herbicida fomesafen isolado ou em associação com diuron, trifluralin e prometryn para cultivares de algodoeiro. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 17, n. 2, p. 158–165, 2018. DOI: 10.5965/223811711722018158.

OSIPE, J. B.; *et al.* Sistemas de manejo de plantas daninhas na pré-semeadura da soja. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, p. 64–73, 2011.

PATZOLDT, W. L.; *et al.* A codon deletion confers resistance to herbicides inhibiting protoporphyrinogen oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 12329–12334, 2006.

PEIXOTO, H. P. P.; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, M. A. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, p. 137–143, 1999.

PETERSON, M. A. *et al.* The challenge of herbicide resistance around the world: A current summary. **Pest Management Science**, v. 74, p. 2246–2259, 2018.

PIVETA, L. B. *et al.* Selectivity of imazapic + imazapyr herbicides on irrigated rice as affected by seed treatment with dietholate and clomazone applied in preemergence. **Planta Daninha**, v. 36, p. e018149361, 2018. DOI: 10.1590/S0100-83582018360100062.

PPDB - **Pesticide Properties DataBase**. List of Pesticide Active Ingredients. University of Hertfordshire. Disponível em: sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/ Acesso em: 20 ago. 2025.

PROCÓPIO, S. O.; *et al.* Absorção e utilização do nitrogênio pelas culturas da soja e do feijão e por plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 365–374, 2004.

RAMA DEVI, S.; PRASAD, M. N. V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Science**, v. 138, p. 157–165, 1998.

REIS, F. C. *et al.* Seletividade, hormesis e fisiologia dos herbicidas nas plantas. In: BARROSO, A. A. M.; MURATA, A. T. **Matologia, estudos sobre plantas daninhas**. Jaboticabal: Editora Fábrica da Palavra, 2021. p. 295-323.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

RIGON, C. A.; GAINES, T. A.; KÜPPER, A.; DAYAN, F. E. Metabolism-based herbicide resistance, the major threat among the non-target site resistance mechanisms. **Outlooks on Pest Management**, v. 31, p. 162–168, 2020.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. R. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: Edição dos Autores, 2005. 591 p.

ROMAN, E. S. *et al.* **Como funcionam os herbicidas**: da biologia à aplicação. Passo Fundo: Berthier, 2007. 159 p.

ROSSATTO, T.; AMARAL, M. N.; BENITEZ, L. C.; VIGHI, I. L.; BRAGA, E. J. B.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M.; MAIA, M. A. C.; PINTO, L. S. Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants, cv. BRS AG, under saline stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 4, p. 865–875, 2017.

ROUSONELOS, S. L.; *et al.* Characterization of a Common Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) population resistant to ALS- and PPO-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v. 60, p. 335–344, 2012.

RZEDOWSKI, G. C.; RZEDOWSKI, J. Composição: Tribu Heliantheae I. **Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes**. Pátzcuaro: Instituto de Ecología AC, Centro Regional del Bajío, 2008.

SALGADO, G. C.; *et al.* Interação do manejo cultural e mecânico no desenvolvimento do Picão Preto (*Bidens pilosa* L.). **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 4, 2014.

SANCHOTENE, D. M. *et al.* Efeito do protetor dietholate na seletividade de clomazone em cultivares de arroz irrigado. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 339-346, 2010. DOI: 10.1590/S0100-83582010000200013.

SCHMITZ, M. F. *et al.* Fitotoxicidade de clomazone associado com dietholate à cultura do trigo. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 14, n. 4, p. 288-295, 2015. DOI: 10.7824/rbh.v14i4.457.

SCHMITZ, M. F.; GALON, L. Uso de clomazone associado ao safener dietholate para o manejo de plantas daninhas na cultura do trigo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 17, n. 1, p. 86-93, 2018.

SHER, A.; MAQBOOL, M. M.; IQBAL, J.; NADEEM, M.; FAIZ, S.; NOOR, H.; HAMID, Y.; YUAN, X. Y.; GUO, P. Y. The growth, physiological and biochemical response of foxtail millet to atrazine herbicide. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 6471-6479, 2021.

SHIMABUKURO, R. H.; LAMOUREUX, G. L.; FREAR, D. S. Pesticide metabolism in plants: reactions and mechanisms. In: MATSUMURA, F.; MURTI, C. R. K. (ed.). **Biodegradation of pesticides**. New York: Plenum Press, 1982. p. 21–66.

SHIVANI *et al.* Imazethapyr and weed interference-induced oxidative stress change the dynamics of the antioxidant defence system in lentil (*Lens culinaris* Medik.). **Crop Protection**, v. 190, 107068, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.107068>.

SUN, M.; GANDERS, F. R. Outcrossing rates and allozyme variation in rayed and rayless morphs of *Bidens pilosa*. **Heredity**, v. 64, n. 1, p. 139–143, 1990.

SWITZER, C. M.; WHITEHEAD, C. W. The differential response of strains of wild carrot to 2,4-D and related herbicides. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 43, p. 255–262, 1963.

TANAKA, F. S.; HOFFER, B. L.; SHIMABUKURO, R. H.; WIEN, R. G.; WALSH, W. C. Identification of the isomeric hydroxylated metabolites of methyl 2-[4-(2,4-dichlorophenoxy)phenoxy]propanoate (diclofop-methyl) in wheat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 559–565, 1990.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, v. 153, p. 65–72, 2000.

TIWARI, P. *et al.* Plant–microbe interactions under extreme habitats and their potential applications. **Microorganisms**, v. 12, p. 448, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030448>.

TREZZI, M. M.; ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R.; ROJANO-DELGADO, A. M.; ALCÁNTARA, E.; PAGNONCELLI JR., F. D. B.; VIECELLI, M.; DIESEL, F.; PACHECO, V.; DE PRADO, R. Influence of temperature on the retention, absorption and translocation of fomesafen and imazamox in *Euphorbia heterophylla*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 173, p. 104794, 2021. DOI: 10.1016/j.pestbp.2021.104794.

VELINI, E. D. **Estudos e desenvolvimento de métodos experimentais e amostrais adaptados à matologia**. 1995. 250 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

VELINI, E. D. *et al.* **Glyphosate**. 1. ed. Botucatu: FEPAF, 2009. 496 p.

WANG, C. S.; LIN, W. T.; CHIANG, Y. J.; WANG, C. Y. Metabolism of fluazifop-P-butyl in resistant goosegrass (*Eleusine indica*) in Taiwan. **Weed Science**, v. 65, p. 228–238, 2017.

WECKWERTH, W.; FIEHN, O. Can we discover novel pathways using metabolomic analysis? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 156–160, 2002. DOI: [doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00299-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00299-9).

XU, L.; ZHU, H.; OZKAN, H. E.; THISTLE, H. W. Evaporation rate and development of wetted area of water droplets with and without surfactant at different locations on waxy leaf surfaces. **Biosystems Engineering**, v. 106, n. 1, p. 58-67, 2010.

YAO, C. *et al.* Spray retention of crop protection agro-chemicals on the plant surface. In: MYUNG, K.; SATCHIVI, N. M.; COLEEN, K. K. (ed.). **Retention, uptake, and translocation of agrochemicals in plants**. Washington: American Chemical Society, 2014. p. 1-22.

ZABLOTOWICZ, R. M.; HOAGLAND, R. E.; HALL, J. C. Metabolism of pesticides by plants and prokaryotes. In: CLARK, J. M.; OHKAWA, H. (ed.). **Environmental Fate and Safety Management of Agrochemical Herbicides**. Washington, DC: American Chemical Society Symposium Series, 2005. p. 168–184.