
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**ECOTOXICIDADE DE SOLOS CONTAMINADOS COM OS HERBICIDAS
FLUMIOXAZIN E IMAZETAPIR E AS CONSEQUÊNCIAS DESTA
CONTAMINAÇÃO PARA A SAÚDE AMBIENTAL**

MATHEUS DE MORAES CUNHA GONÇALVES

**Rio Claro – SP
2024**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)

ECOTOXICIDADE DE SOLOS CONTAMINADOS COM OS HERBICIDAS
FLUMIOXAZIN E IMAZETAPIR E AS CONSEQUÊNCIAS DESTA
CONTAMINAÇÃO PARA A SAÚDE AMBIENTAL

MATHEUS DE MORAES CUNHA GONÇALVES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
do Campus de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Ciências Biológicas (Biologia Celular,
Molecular e Microbiologia)

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida
Marin Morales

Rio Claro – SP
2024

G635e Gonçalves, Matheus de Moraes Cunha
Ecotoxicidade de solos contaminados com os herbicidas
flumioxazin e imazetapir e as consequências desta contaminação
para a saúde ambiental / Matheus de MoraesCunha Gonçalves. --
Rio Claro, 2024
82 f. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

1. Herbicidas. 2. Índice mitótico. 3. Ensaio de germinação. 4.
Alterações cromossômicas. 5. Teste de reprodução. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ECOTOXICIDADE DE SOLOS CONTAMINADOS COM OS HERBICIDAS FLUMIOXAZIN E IMAZETAPIR E AS CONSEQUÊNCIAS DESTA CONTAMINAÇÃO PARA A SAÚDE AMBIENTAL

AUTOR: MATHEUS DE MORAES CUNHA GONÇALVES

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Diversidade Biológica e Biologia Ambiental pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES (Participação Virtual) Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Unesp - IB Rio Claro



Documento assinado digitalmente
MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Data: 13/11/2024 12:02:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. SILVIA TAMIE MATSUMOTO (Participação Virtual) Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Federal do Espírito Santo



Documento assinado digitalmente
SILVIA TAMIE MATSUMOTO
Data: 13/11/2024 17:31:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. MARTA SIVIERO GUILHERME PIRES (Participação Virtual) Universidade Estadual de Campinas



Documento assinado digitalmente
MARTA SIVIERO GUILHERME PIRES
Data: 13/11/2024 12:09:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. BRUNO DO AMARAL CRISPIM (Participação Virtual) Universidade Estadual do Tocantins

Rio Claro, 13 de novembro de 2024.

Dedico este trabalho à minha família,
Por todo o apoio e motivação.
Em especial, à minha esposa,
Monique Ponce Martins.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), pela oportunidade de realização do curso de Doutorado em Biologia Celular, Molecular e Microbiologia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales, que me recebeu de portas abertas. Além de sempre me apoiar até nos momentos mais difíceis. Mesmo passando por uma pandemia, e em seguida um incêndio, onde perdemos tudo, inclusive minhas amostras, a Profa. Marin sempre fez de tudo para que eu conseguisse terminar o nosso projeto, seja com ideias novas, como também com palavras de incentivo. Isso sempre me deu ânimo para continuar e concluir o trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, onde todos sempre colaboraram uns com os outros facilitando assim nossa rotina de trabalho. Mas em especial à Letícia Rosa, Sérgio Prolo, Ana Paula e Thomaz, passar esse momento com vocês tornou esse período do doutorado bem mais leve.

Aos meus pais, Fábio e Aline, por todo apoio e amor. Aos meus dois irmãos Fábio Augusto e Gabriel por todo companheirismo. A minha cunhada, Pâmela, e minha sogra, Lucia, por todo suporte e motivação.

Principalmente à minha esposa, Monique, por ter aceito mudar de estado (e de vida) comigo para que eu realizasse essa nova etapa da minha vida. Eu só tenho a agradecer por todo apoio nos momentos bons e ruins, sempre quando eu achava que tudo ia dar errado, você sempre me motivou e me botou para cima. Muito obrigado por nunca me deixar desistir dos meus objetivos, sem você eu não iria conseguir concluir essa etapa das nossas vidas.

*“Cada dia é uma chance pra ser melhor que ontem”
(Emicida)*

RESUMO

O uso intensivo de herbicida vem aumentando a preocupação com seus riscos de contaminação ambiental. Muitos autores reportam que a utilização desses químicos causa graves danos ao solo, às águas subterrâneas e superficiais, a flora e a fauna. O aumento desses agrotóxicos no meio ambiente afeta negativamente a biota, reduzindo a taxa de sobrevivência, crescimento e de reprodução, aumentando a mortalidade e promovendo mudanças comportamentais, fisiológicas e genéticas. A soja é a leguminosa de maior cultivo no mundo, e que também tem uma grande representatividade na agricultura brasileira. Porém, um dos principais problemas da sua produção é a presença de plantas invasoras nas culturas, cujo controle é, na sua grande maioria, feito pela aplicação de herbicidas na cultura. As moléculas imazetapir e flumioxazin vêm sendo muito utilizadas como alternativa para o controle de plantas invasoras da soja. O flumioxazin é considerado um herbicida de degradação rápida, portanto não persistente em solo, enquanto que o imazetapir apresenta uma longa persistência no solo, o que pode ser um risco para organismos não-alvos, e para contaminação de águas subterrâneas e superficiais. Devido aos riscos ambientais ocasionados pelos herbicidas, esse trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de bioensaios ecotoxicológicos, os potenciais efeitos dos herbicidas flumioxazin e imazetapir, isolados e em mistura, sobre a biota eventualmente exposta às suas ações. Para avaliar os efeitos tóxicos desses herbicidas, foram realizados ensaios de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*, de citogenotoxicidade com *Allium cepa* e de reprodução com o microartropode *Folsomia candida*. Foram coletadas amostras de solos de locais com histórico de dois anos de aplicação destes herbicidas, isolados e em misturas, antes (amostragem 1) e após o terceiro ano de aplicação dos agrotóxicos (amostragem 2). Foram também avaliados solos artificialmente contaminados com diferentes concentrações (2 ml/L; 3 ml/L; 4 ml/L; 5 ml/L; 6 ml/L) de uma formulação comercial composta da mistura destes dois herbicidas citados acima. A avaliação dos solos com histórico de contaminação mostraram que ambos os períodos de amostragem (1 e 2) resultaram em danos fitotóxicos em *L. sativa*, prejudicando o desenvolvimento das raízes. Também foram verificados efeitos citogenotóxicos em células meristemáticas de *A. cepa*. Esses testes mostraram que a mistura dos herbicidas apresenta efeito tóxico mais evidente do que os herbicidas aplicados isoladamente, além de uma possível persistência desses produtos no ambiente edáfico. A análise de diferentes concentrações da mistura dos produtos, mostrou que mesmo em baixas concentrações (menores o que a indicada para aplicação no campo, pelo fabricante) já apresentaram potencial tóxicos, tanto nos testes de fitotoxicidade com alface, como nos testes de citogenotoxicidade com cebola. Por outro lado, nenhuma das concentrações testadas afetou negativamente a reprodução do colembolos. Nossos resultados indicam que os herbicidas imazetapir e flumioxazin, isolados e em mistura, podem causar danos tóxicos a organismos não-alvo, apresentando um potencial de risco ambiental. Provavelmente, existe uma interação sinérgica entre os princípios ativos dos herbicidas produtos, visto houve um acréscimo de toxicidade quando eles foram usados em mistura.

Palavras-chave: Herbicidas; *Lactuca sativa*; ensaio de germinação; *Allium cepa*; alterações cromossômicas; índice mitótico; *Folsomia candida*; teste de reprodução

ABSTRACT

The intensive use of herbicides has increased concern about the risks of environmental contamination. Many authors report that the use of these chemicals causes serious damage to the soil, groundwater and surface water, flora and fauna. The increase of these pesticides in the environment negatively affects the biota, reducing the rate of survival, growth and reproduction, increasing mortality and promoting behavioral, physiological and genetic changes. Soybeans are the most widely grown legume in the world and also play a major role in Brazilian agriculture. However, one of the main problems with its production is the presence of invasive plants in crops, most of which are controlled by applying herbicides to the crop. The molecules imazetapir and flumioxazin have been widely used as alternatives for controlling soybean weeds. Flumioxazin is considered a fast-degrading herbicide and is therefore not persistent in the soil, while imazethapyr has a long persistence in the soil, which can be a risk for non-target organisms and for contamination of groundwater and surface water. Due to the environmental risks posed by herbicides, the aim of this study was to evaluate the potential effects of the herbicides flumioxazin and imazethapyr, alone and in a mixture, on the biota that may be exposed to them, using ecotoxicological bioassays. To assess the toxic effects of these herbicides, phytotoxicity tests were carried out on *Lactuca sativa*, cytogenotoxicity tests on *Allium cepa* and reproduction tests on the microarthropod *Folsomia candida*. Soil samples were collected from sites with a two-year history of application of these herbicides, alone and in mixtures, before (sample 1) and after the third year of pesticide application (sample 2). Soils artificially contaminated with different concentrations (2 ml/L; 3 ml/L; 4 ml/L; 5 ml/L; 6 ml/L) of a commercial formulation made up of a mixture of the two herbicides mentioned above were also evaluated. The evaluation of soils with a history of contamination showed that both sampling periods (1 and 2) resulted in phytotoxic damage to *L. sativa*, impairing root development. Cytogenotoxic effects were also found in meristematic cells of *A. cepa*. These tests showed that the mixture of herbicides has a more obvious toxic effect than herbicides applied alone, as well as the possible persistence of these products in the edaphic environment. The analysis of different concentrations of the mixture of products showed that even at low concentrations (lower than those indicated for field application by the manufacturer) they already had toxic potential, both in the phytotoxicity tests with lettuce and in the cytogenotoxicity tests with onions. On the other hand, none of the concentrations tested negatively affected the reproduction of the collembolan. Our results indicate that the herbicides imazethapyr and flumioxazin, alone and in a mixture, can cause toxic damage to non-target organisms, presenting a potential environmental risk.

Key-words: Herbicides; *Lactuca sativa*; germination test; *Allium cepa*; chromosomal changes; mitotic index; *Folsomia candida*; reproduction test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imazetapir {(RS)-5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)nicotinic acid}. Fonte: Sigma-Aldrich.....32

Figura 2. Flumioxazin {(N-(7-fluoro-3,4-dihydro-3-oxo-4-prop-2-ynyl-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)cyclohex-1-ene-1,2-dicarboxamide)}. Fonte: Sigma-Aldrich....33

Figura 3. Avaliação do Índice Mitótico. A: Amostragem 1: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, antes da terceira aplicação do mesmo herbicida; B: Amostragem 2: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, após a terceira aplicação do mesmo herbicida; CN: Controle Negativo; CA: Controle Ambiental; IM: Imazetapir; FL: Flumioxazin; IM + FL: Mistura dos herbicidas; MMS: Metilmetano sulfonato. * Estatisticamente significativo, em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), por meio do teste de Kruskal-Wallis/Dunn.....49

Figura 4. Avaliação da Genotoxicidade. A: Amostragem 1: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, antes da terceira aplicação do mesmo herbicida; B: Amostragem 2: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, após a terceira aplicação do mesmo herbicida; CN: Controle Negativo; CA: Controle Ambiental; IM: Imazetapir; FL: Flumioxazin; IM + FL: Mistura dos herbicidas; MMS: Metilmetano sulfonato. * Estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), por meio do teste de Kruskal-Wallis/Dunn.....50

Figura 5. Avaliação do Índice Mitótico de células de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do herbicida comercial composto dos princípios imazetapir e flumioxazin; CN: Controle negativo (água de osmose reversa); CA: Controle ambiental *mesmo solo dos tratamentos, porém sem contaminação). *Estatisticamente significativo, em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis/Dunn.....64

Figura 6. Avaliação das alterações cromossômicas de células de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do herbicida testado (mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazin); CN: Controle negativo; CA: Controle ambiental. *Estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis/Dunn.....65

Figura 7. Alterações Cromossômicas encontradas em células de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações da mistura dos herbicidas. A1: Interfase normal; A2: Prófase normal; A3: Metáfase normal; A4: Anáfase normal; A5: Telófase normal. B1, B2: Interfase com broto nuclear; B3 e B4: Interfase lobulada. B5: Prófase com micronúcleo. C1 e C2: C-Metáfase; C3 e C4: Metáfase

Poliplóide; C5 e D1: Metáfase com aderência cromossômica. D2 e D5: Anáfase com cromossomos perdidos. D3 e D4: Anáfase Poliploide.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de plantas recomendadas pelas OECD (Guidelines for the Testing of Chemicals), USEPA (United States Environmental Protection Agency).....	28
Tabela 2. Resultados dos testes de Germinação (%), Crescimento Radicular (%) e Índice de Germinação (%), realizados com o bioindicador <i>Lactuca sativa</i> , expostos às amostras de solos contaminadas com os herbicidas Flumioxazin e Imazetapir Isolados e em mistura.....	45
Tabela 3. Alterações observadas em células de <i>A. cepa</i> expostas a amostras de solos contaminados com os herbicidas Flumioxazin e Imazetapir.....	51
Tabela 4. Resultados dos testes de Germinação, Crescimento Radicular e Índice de Germinação, realizados com o bioindicador <i>Lactuca sativa</i> , cujas sementes foram expostas a solo contaminado com diferentes concentrações do herbicida comercial composto dos princípios imazetapir e flumioxazin.....	62
Tabela 5. Alterações registradas em células de <i>A. cepa</i> expostas ao herbicida comercial avaliado (mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazin).....	65
Tabela 6. Sobrevivência de adultos e reprodução de <i>F. candida</i> exposta a solo contaminado com diferentes concentrações do herbicida comercial, composto da mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazin.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	Microlítros
AC	Alterações cromossômicas
AD:	Aderência cromossômica
ANOVA	Análise de variância
BN	Broto
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CA	Controle ambiental
CM	C-Metáfase
cm	centímetros
CN	Controle Negativo
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CP	Controle Positivo
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
EPA	Environmental Protection Agency
I.A.	Ingrediente ativo
IG	Índice de Germinação
IM	Índice Mitótico
ISO	International Organization for Standardization
Kg	Kilogramas
m	Metros
M	Molar
m ⁻³	Metros cúbicos
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIPs	Plant Incorporated Protectants
T.C.	Total de células analisadas.
Unesp	Universidade Estadual Paulista
USDA	United States Department of Agriculture
WHC	Water Holding Capacit

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO GERAL	18
2.1	Objetivos Específicos	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	Utilização de agrotóxicos	19
3.2	Modo de ação do princípio ativo do agrotóxico	20
3.2.1	Agrotóxicos sistêmicos	20
3.2.2	Agrotóxicos não sistêmicos	20
3.3	Origem do princípio ativo do agrotóxico	21
3.3.1	Agrotóxico orgânico	21
3.3.2	Agrotóxico sintético.....	21
3.4	Natureza do agrotóxico, quanto à sua estrutura química	22
3.4.1	Organoclorados	22
3.4.2	Organofosforados	22
3.4.3	Carbamatos	23
3.4.4	Piretróides	23
3.5	Natureza do agrotóxico, quanto ao organismo alvo	23
3.5.1	Herbicidas.....	23
3.5.2	Inseticidas.....	25
3.5.3	Fungicida	26
3.6	Importância da avaliação toxicológica de agrotóxicos	26
3.7	Utilização de bioindicadores em avaliações da toxicidade ambiental .	27
3.7.1	Ensaio de fitotoxicidade com <i>Lactuca sativa</i>	28
3.7.2	Teste de alterações cromossômicas com <i>Allium cepa</i>	30
3.7.3	Teste de toxicidade do solo com <i>Folsomia candida</i>	31
3.8	A utilização dos herbicidas Imazetapir e Flumioxazin	32
3.8.1	Imazetapir.....	32
3.8.2	Flumioxazin	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Solo utilizado no estudo	34
4.1.1	Teste de solo com histórico de contaminação	34
4.1.2	Teste de solo com contaminação artificial	34

4.2	Montagem dos experimentos	35
4.3	Capacidade de retenção de água (WHC)	35
4.4	Ensaio de fitotoxicidade com <i>Lactuca sativa</i>	35
4.5	Ensaio de citogenotoxicidade com <i>Allium cepa</i>	36
4.6	Bioensaio com <i>Folsomia candida</i>	37
4.6.1	Teste de reprodução com <i>F. candida</i>	37
4.7	Análise estatística	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
7	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é uma atividade fundamental para a produção de alimentos indispensáveis para a subsistência humana, caracterizando-se também como um importante setor econômico global (Rajak *et al.*, 2023). Estima-se que, pelo crescimento populacional contínuo e crescente, até 2050 haverá uma demanda de aumento da produção de alimentos na ordem de 110%, necessidade esta que vem incentivando o desenvolvimento e implementação de novas tecnologias voltadas à produtividade agrícola (Pardey *et al.*, 2014; Samantara *et al.*, 2022).

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2024), a soja é a leguminosa de maior produção mundial, com uma safra estimada, para 2023/2024, de 395 milhões de toneladas. O Brasil é o maior produtor mundial desse grão, representando cerca de 27% da produção mundial (CONAB, 2024; USDA, 2024). Essa alta produção mostra a importância desta cultura para a economia brasileira.

As ervas daninhas se caracterizam como o principal fator limitante da produção agrícola. Elas competem pelos recursos essenciais (espaço, água, luz e nutrientes) com as plantas cultivadas, além de servirem como hospedeiras de pragas e doenças (Lamego *et al.*, 2004; Vasconcelos *et al.*, 2012). Anualmente são utilizados cerca de 3 bilhões de toneladas/ano de agrotóxicos no controle de pragas da lavoura, sendo que os herbicidas representam de 47% das aplicações (Sharma *et al.*, 2019; Syafrudin *et al.*, 2021).

O grande problema da utilização de agrotóxicos é que apenas 1% consegue atingir os organismos-alvo, sendo o restante disperso no meio ambiente, contaminando os solos, a água, o ar e outros organismos não-alvo (Maritano *et al.*, 2022; Alehashem *et al.*, 2024). No solo, os pesticidas podem ser degradados por vias químicas, ou por microrganismos, contudo existem muitas moléculas com baixa degradabilidade e alta persistência no ambiente edáfico, caracterizando também de alto risco para a contaminação de recursos hídricos, por lixiviação (Sanches *et al.*, 2003; Britto *et al.*, 2012). De acordo com a USEPA (2012), a presença de pesticidas no ambiente pode afetar tanto a fauna como a flora, promovendo, por exemplo, redução nas taxas de reprodução e crescimento, aumento da mortalidade e mudanças comportamentais.

O glifosato é o herbicida mais usado no controle de ervas daninhas na cultura de soja (Petter *et al.*, 2007). Porém, o seu uso em larga escala tem

ocasionado a perda de sua eficiência, devido à tolerância de muitas plantas invasoras, devido a seleção natural (Owen, 2008). Essa ineficiência do glifosato tem levado à sua substituição por outros herbicidas, como o 2,4-D, chlorimuron-ethyl, imazetapir, flumioxazin, diclosulam, carfentrazone-ethyl e sulfentrazone, bem como da mistura pré-formulada de paraquat e diuron (Petter *et al.*, 2007).

O imazetapir {(RS)-5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)nicotinic acid} é um herbicida sistêmico da família das imidazolininas, usado em culturas como arroz, feijão e soja, classificado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como moderadamente tóxico (Classe 3). Seu mecanismo de ação é por inibição da enzima acetohidroxiácido sintetase, que é crucial para a síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada (valina, isoleucina e leucina). Esse herbicida também afeta a síntese de DNA e o desenvolvimento da planta (Duggleby, McCourt e Guddat, 2008). Por ser um agrotóxico de longa persistência no solo, confere risco para organismos não-alvo e para águas subterrâneas e superficiais (Villa *et al.*, 2007; Souto *et al.*, 2013).

A flumioxazin {(N-(7-fluoro-3,4-dihydro-3-oxo-4-prop-2-ynyl-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)cyclohex-1-ene-1,2-dicarboxamide)} é um herbicida de contato da família N-feniltalimida, cujo modo de ação é por inibição da protoporfirinogênio oxidase (Protox), enzima necessária para a síntese de clorofila (Iwashita *et al.*, 2022). De acordo com a ANVISA, este químico é classificado um pouco tóxico (Classe IV), sendo usado em culturas de amendoim, algodão, soja e feijão. De acordo com Sondhia e Dixit (2008), essa molécula não é persistente no ambiente, podendo se degradar rapidamente no solo. Estudos de Oliveira *et al.* (1999) mostraram que a mobilidade da flumioxazin é pequena, não ultrapassando os 5 cm superficiais no solo.

O uso indiscriminado de agrotóxicos tem alertado sobre os danos que estes compostos podem promover no ambiente, mostrando a necessidade de avaliações ecotoxicológicas que possam estimar os reais riscos dessas substâncias para organismos não alvo. A utilização de metodologias que usam bioindicadores tem se mostrado eficiente para a avaliação da toxicidade ambiental (Souza; Guedes; Fontanetti, 2016).

As espécies vegetais *Lactuca sativa* e *Allium cepa* são excelentes bioindicadores de contaminação ambiental. O uso destes bioindicadores em

avaliações de toxicidade ambiental apresentam várias vantagens, como a simplicidade dos testes, rapidez, confiabilidade, baixo custo e alta repetibilidade, sendo recomendados pelas agências ambientais internacionais reconhecidas, como a OECD (1984) e USEPA (1996). A taxa de germinação e de crescimento do eixo hipocótilo/raízes de alface são parâmetros importantes usados na avaliação da toxicidade de uma substância ou de uma amostra ambiental (Gonçalves *et al.*, 2020). De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), o teste de alterações cromossômicas com *A. cepa* ($2n=16$), representa uma das melhores metodologias para a avaliação da citogenotoxicidade de contaminantes ambientais. A cebola apresenta cromossomos grandes e em pequena quantidade, o que facilita na visualização das alterações, além da espécie possuir uma alta sensibilidade a agentes químicos.

Os invertebrados terrestres também são excelentes bioindicadores da toxicidade de ambientes edáficos (Alves e Cardoso, 2016). Os colêmbolos (*Folsomia candida*) são considerados excelentes indicadores da qualidade do solo. Esses animais respondem a uma ampla variedade de fatores ambientais, tornando-os eficientes para serem utilizados em avaliação de riscos. Os testes de reprodução realizados com esses organismos (ISO 11267, 2014) são padronizados e validados pela International Organization for Standardization-ISO (Alves *et al.*, 2014).

2 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito tóxico de solos contaminados com os herbicidas flumioxazin e imazetapir, isolados e em mistura, por meio de diferentes ensaios ecotoxicológicos.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos toxicogénéticos residuais de solos com histórico de contaminação, por dois anos consecutivos, com os herbicidas flumioxazin e imazetapir, isolados e em mistura, e após a terceira aplicação dos mesmos;
- Avaliar os efeitos toxicogénéticos de solos contaminados (artificialmente) com diferentes concentrações da mistura dos herbicidas flumioxazin e imazetapir;
- Avaliar o potencial fitotóxico dos solos contaminados com os herbicidas flumioxazin e imazetapir, isolados e em mistura, a partir de bioensaio de germinação de sementes e crescimento radicular de *Lactuca sativa*;
- Avaliar o efeito citogenotóxico de solos contaminados com os herbicidas flumioxazin e imazetapir, isolados e em mistura, por meio de análises de alterações no ciclo celular e cromossômicas, em células meristemáticas de *Allium cepa*;
- Avaliar os efeitos tóxicos dos herbicidas flumioxazin e imazetapir, isolados e em mistura, e após a terceira aplicação dos mesmos, por meio do teste de reprodução com o microartrópode *F. candida*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Utilização de agrotóxicos

O setor agrícola é fundamental tanto para a produção de alimentos, fibras e outros produtos indispensáveis à vida, como economicamente, por permitir a subsistência das comunidades rurais, geração de empregos (Liu *et al.*, 2022) e divisas aos países produtores. Atualmente, a agricultura já sustenta mais de 7 bilhões de pessoas, mas essa produção de alimentos terá que aumentar de 60-110% até 2050, devido ao aumento populacional (Samantara *et al.*, 2022; Pardey *et al.*, 2014).

A presença de pragas nas lavouras é uma das maiores limitações agrícolas, resultando em grandes quebras na produção e perdas econômicas, consideráveis (Kubiak *et al.*, 2022). De acordo com os mesmos autores, essas pragas provocam uma redução de até 31,5% da produção agrícola, o que resulta em uma perda econômica de cerca de 32 bilhões de dólares/ano.

Os problemas decorrentes das infestações de pragas agrícolas têm sido combatidas com uso de agrotóxicos. Os agrotóxicos são substâncias usadas, de forma isolada ou em mistura, para prevenir, matar ou controlar qualquer tipo de praga que afete tanto a produção como o armazenamento dos produtos agrícolas (Abukabar *et al.*, 2020).

Em 1939, o químico Paul Muller descobriu as propriedades inseticidas da molécula Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT). Esse inseticida sintético foi amplamente utilizado para erradicar insetos transmissores de doenças e pragas agrícolas (Abukabar *et al.*, 2020). Seu uso teve início na Segunda Guerra Mundial, para eliminar insetos transmissores da malária, tifo e febre amarela sendo, posteriormente, usado pelos fazendeiros, para controlar as pragas agrícolas (D'Amato *et al.*, 2002).

Com a descoberta, na década de 70, da sua persistência ambiental, o DDT começou a ser banido em muitos países (D'Amato *et al.*, 2002). Após ser instituída a sua proibição em diversos países, ele começou a ser substituído por outros pesticidas, como os organofosfarados e carbanatos, por estes serem considerados de menor toxicidade.

São aplicados, anualmente, cerca de 4 bilhões de toneladas de agrotóxicos em todo mundo, o que representa um custo de cerca de 40 milhões de dólares (Sharma *et al.*, 2020). Os agrotóxicos podem ser classificados quanto: ao seu modo de ação, em sistêmicos e não sistêmicos; à origem do princípio ativo, em orgânicos e sintéticos; e à natureza da praga a ser combatida, em inseticidas, fungicidas, bactericidas, acaricidas, herbicidas, dentre outros.

3.2 Modo de ação do princípio ativo do agrotóxico

3.2.1 Agrotóxicos sistêmicos

Os agrotóxicos sistêmicos são compostos que, quando aplicados nas plantas, são absorvidos pelos tecidos externos, se distribuindo para os tecidos interno, que não tiveram contato com o produto (Abukabar *et al.*, 2020). Nas plantas vasculares, a translocação sistêmica dos agrotóxicos pode se dar também por transporte por meio dos vasos condutores floema ou xilema. Essa contaminação sistêmica, além de prejudicar o desenvolvimento das plantas invasoras, pode fazer com que a planta apresente toxicidade para insetos pragas (Simon-Delso *et al.*, 2015; Fioreze *et al.*, 2021). Dentre os herbicidas sistêmicos, estão o 2,4-D, o glifosato, o imazethapir, o flazasulfuron, o nicosulfuron, o picloram, (Fioreze *et al.*, 2021; Fakhari *et al.*, 2020). Já os neonicotinóides, o fenilpirazol e a Azadiractina são exemplos de inseticidas sistêmicos (Lexmond *et al.*, 2015; Simon-Delso *et al.*, 2015; McKenzie *et al.*, 2010).

3.2.2 Agrotóxicos não sistêmicos

Os agrotóxicos de contato não sistêmicos não penetram nas células dos tecidos externos da planta, consequentemente, não são transportados pelo sistema vascular. Esses químicos produzem efeito tóxico logo ao entrar em contato com a epiderme da praga a ser combatida (Abukabar *et al.*, 2020). São exemplos de herbicidas de contato diquat, paraquat, flumioxazin, lactofen (Almeida *et al.*, 2016; Franco *et al.*, 2022; Jing *et al.*, 2018). Fenitrothion, Carbaril, Fenpropatrina são exemplos de inseticidas não sistêmicos (Yu *et al.*, 2022; Faria *et al.*, 2021).

3.3 Origem do princípio ativo do agrotóxico

3.3.1 Agrotóxico orgânico

Os agrotóxicos orgânicos ou defensivos agrícolas naturais, são produtos naturais, derivados de plantas, microrganismos, animais ou minerais (Halfeld-Vieira, *et al.*, 2016; Pansare *et al.*, 2022), usados e indicados para erradicar pragas da agricultura, por serem menos tóxicos e menos persistentes no ambiente (EPA, 2023). Uma outra estratégia, também incluída na classe de agrotóxico orgânicos é a dos protetores químicos incorporados às plantas (Pips). Assim, os agrotóxicos orgânicos podem ser subdivididos em três classes distintas: os bioquímicos, os microbianos e os PIPs.

Os pesticidas bioquímicos são substâncias naturais que controlam as pragas por mecanismos não tóxicos, como hormônios, enzimas e agentes naturais (Rafiq *et al.*, 2022). Os biopesticidas microbianos são aqueles que possuem um microrganismo (bactéria, fungo, vírus ou protozoário) como princípio ativo. De acordo com a EPA (2023), esses pesticidas podem controlar uma ampla variedade de pragas, mas cada ingrediente ativo do produto age de forma específica para um organismo-alvo. Já os PIPs são produtos tecnológicos, derivados de inserção de material genético exógeno na planta, onde a planta produz as substâncias de defesa necessárias para controle da praga (Moshi & Matoju, 2017). Por exemplo, se um gene da bactéria *Bacillus thuringiensis* for inserido no material genético de uma planta, essa planta irá produzir a substância de defesa relacionada à sequência gênica introduzida (Kalpana & Anil, 2021). Também já foram incorporados no material genético de milho, soja, tabaco, cana-de-açúcar, batata, alfafa, tomate e algodão sequências gênicas que produzem enzimas com propriedades pesticidas (Moshi & Matoju, 2017). Contudo, embora essa técnica, aparentemente, apresente respostas satisfatórias para a eliminação de organismos indesejáveis da agricultura, não se pode negligenciar o seu potencial reativo com o meio biológico, pois ele pode colocar em risco tanto a qualidade ambiental, como a saúde humana (Halfeld-Vieira, *et al.*, 2016).

3.3.2 Agrotóxico Sintético

Os agrotóxicos sintéticos são substâncias formadas a partir de produtos químicos de moléculas transportadoras, como os polímeros (Ayilara *et al.*, 2023).

Esses pesticidas já são utilizados a bastante tempo para o controle de pragas das lavouras, na busca de maior produtividade agrícola (Farooq *et al.*, 2024). O grande problema é que esses produtos sintéticos podem causar graves danos ao meio ambiente e para saúde humana. Apenas 1% de todos os agrotóxicos aplicados atingem os organismos-alvo. Todo o restante é disperso na natureza, contaminando o ar, solo e água, causando danos agudos e crônicos em toda a biota (Maritano *et al.*, 2022; Vopham *et al.*, 2017; Kapeleka *et al.*, 2019). De acordo com Abukabar *et al.* (2020), os agrotóxicos sintéticos mais empregados na agricultura são os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides.

3.4 Natureza do agrotóxico, quanto à sua estrutura química

3.4.1 Organoclorados

Os agrotóxicos organoclorados são hidrocarbonetos clorados que apresentam uma alta estabilidade (Silva *et al.*, 2021). São insolúveis em água, têm alta persistência no meio biológico, por serem transferido pela cadeia alimentar. Sua meia-vida pode alcançar 15 anos, ocasionando grande impacto no meio ambiente (Silva *et al.*, 2021; Jayaraj *et al.*, 2016). De acordo com Abukabar *et al.* (2020), os organoclorados agem sobre o sistema nervoso dos insetos, causando convulsões, paralisia, seguido de morte. Assim, a maior parte deles, é usada como inseticida.

3.4.2 Organofosforados

Os organofosforados são agrotóxicos de amplo espectro derivados do ácido fosfórico, que podem conter tióis, amidas ou ésteres de ácidos fosfônicos, fosfínicos ou tiofosfóricos em sua composição (Abukabar *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021). De acordo com Abukabar *et al.*, (2020), esses compostos são bastante utilizados na agricultura, por serem de amplo espectro e ter uma rápida degradação no ambiente. Porém, muito desses agrotóxicos apresentam efeitos tóxicos para organismos não-alvo, (Coutinho, 2005). Seus efeitos inibitórios sobre as enzimas podem desencadear, nos seres vivos, reações de sudoreses, até distúrbios cardiorrespiratórios (Ecobichon & Joy, 1991).

3.4.3 Carbamatos

Os carbamatos são uma classe de agrotóxicos muito utilizados no meio agrícola, podendo se caracterizar como de risco tanto ao meio ambiente, como para a saúde humana (Sánchez *et al.*, 2023). Eles apresentam uma estrutura química semelhante aos organofosforados, porém são derivados do ácido carbônico e não do fósforo (Abukabar *et al.*, 2020). De acordo com Gubta (2014), a síntese em larga escala dessa molécula começou na década de 50, após a descoberta da eficiência do inseticida carbaril sobre diversas culturas. Assim como os organofosforados, os carbamatos também atuam interferindo na transmissão de sinais do sistema nervoso, ocasionando a morte dos organismos por envenenamento (Yadav *et al.*, 2015). Desde então, muitos produtos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de apresentar uma maior especificidade de ação e menor toxicidade para organismos não alvos, em comparação aos pesticidas organofosforados (Vale e Lotti, 2015).

3.4.4 Piretróides

Os piretróides são agrotóxicos derivados do ácido crisântemo, muito utilizados no controle de pragas agrícolas, na pecuária, bem como em uso doméstico (Abukabar *et al.*, 2020). Esses compostos foram desenvolvidos na década de 70, como uma alternativa sustentável ao uso de pesticidas organofosforados (Soderlund, 2012). Essas moléculas têm como modo de ação a modificação dos canais de sódio das membranas das células nervosas, pois alteram a transmissão do impulso nervoso, causando a paralisação do organismo (Singh *et al.*, 2022). Esses pesticidas não apresentam toxicidade aguda para mamíferos, porém são altamente neurotóxicos para insetos e peixes (Zhu *et al.*, 2020; Abukabar *et al.*, 2020). São substâncias com baixa persistência no solo e facilmente degradadas por microorganismos (Singh *et al.*, 2022).

3.5 Natureza do agrotóxico, quanto ao organismo alvo

3.5.1 Herbicidas

Dentre a grande variedade de agrotóxicos existentes, os herbicidas são os mais utilizados, atingindo um percentual de aplicação correspondente a 47,5%, dentre todos os pesticidas (Syafrudin *et al.*, 2021). Os herbicidas são

produtos químicos usados para eliminar ou inibir o crescimento de plantas invasoras de cultura.

Antes do desenvolvimento dos agrotóxicos, houve uma busca lenta e contínua de produtos que pudessem erradicar ou controlar as pragas da agricultura (Fisher Scientific, 2024). Muitos materiais foram usados como herbicidas, como a cal (CaO), azeite de oliva, sal, sulfato de cobre e de ferro, ácido sulfúrico, arsenito de sódio, nitrato de cobre, clorato de sódio, tricloreto de arsênico, óleos de petróleo, dentre outros, que não se mostraram suficientemente eficazes.

O uso de biocida químicos manufaturados na agricultura se iniciou no século XIX, quando começou a extração e purificação, em laboratórios, de compostos químicos de plantas (nicotina do tabaco; piretroides de crisântemos; rotenona de raízes, cianetos de caroços de frutas). Com o passar dos anos, muitos compostos diferentes foram misturados, na busca de maior eficiência para o controle das pragas. No final do sec. XIX foi desenvolvida a Mistura Bordeaux (sulfato de cobre (II) – “Paris Green” e hidróxido de cálcio), para combater infecções fúngicas de vinhedos (Fischer Scientific, 2024).

Com o desenvolvimento do conhecimento científico, iniciou-se o desenvolvimento de formulações de princípios ativos sintéticos. O primeiro marco de produto orgânico sintético, usado como agrotóxico, foi o 2-(1-metilpropil)-4,6-dinitrofenol (Pokorny, 1941). O 2-4D foi sintetizado pela primeira vez em 1941, por Pokorny. A eficiência do produto levou a uma mudança na prática de controle de plantas invasoras de cultura da agricultura (Dayan, 2019).

Os herbicidas podem ser classificados em duas classes, os pré-emergentes e os pós emergentes. Os produtos pré-emergentes são aplicados antes da germinação das sementes e do desenvolvimento das ervas daninhas, inibindo assim o sucesso da planta. A aplicação em pós-emergência é aquela realizada após a emergência de plantas daninhas e antes que essas interfiram no desenvolvimento da cultura, devido à competição (Burke & Bell, 2014).

Nos últimos anos, o uso intensivo de herbicidas vem se tornando, cada vez maior, caracterizando-se como uma preocupação ambiental. Muitos autores relatam que o uso desses produtos químicos causa graves danos ao solo, às águas subterrâneas e superficiais, à flora e à fauna (Araújo; Monteiro; Abarkeli,

2003; Cox, 2003; Sanches *et al.*, 2003; Laine e Cheng, 2007; Britto *et al.*, 2012; Bianchi *et al.*, 2015).

3.5.2 Inseticidas

Os inseticidas são compostos químicos de origem natural, sintéticas ou biológica, utilizados no controle de insetos que causam danos à agricultura, à saúde pública e ao meio ambiente (Wojciechowska *et al.*, 2016). De acordo com Menezes *et al.* (2005), desde meados de 1800, já eram usados compostos inorgânicos para o controlar insetos indesejados. Mas, no início do século XX compostos botânicos começaram a ser utilizados para o controle dessas pragas, componentes estes que se destacaram pela complexidade estrutural, alto potencial biocida e seletividade, porém apresentavam custo elevado, pouca disponibilidade e sensibilidade à luz.

O primeiro inseticida sintético, o DDT, descoberto em 1939 por Paul Muller, foi amplamente utilizado a partir da década de 40 do século passado, para combater pragas da lavoura, como também de insetos transmissores de doenças (Abukabar *et al.*, 2020). Em 1962, Rachel Carson publicou o livro “Primavera Silenciosa”, que alertava sobre o risco de contaminação ambiental devido ao uso abusivo de agrotóxicos organoclorados, principalmente o DDT. Essa publicação, sensibilizou alguns governantes, o que culminou na proibição desse produto, na década de 70, em diversos países (Morais e Prado, 2016). Com a proibição dos organoclorados, iniciou-se o desenvolvimento dos inseticidas de Terceira Geração, cujas formulações contém moléculas menos tóxicas ambientalmente e mais específicas, como os organofosforados e carbanatos (Abukabar *et al.*, 2020).

De acordo com Dwivedi *et al.*, (2022), são utilizados, anualmente, cerca de 3 bilhões de toneladas de agrotóxicos no mundo, sendo 29,5% destes inseticidas, estando atrás apenas dos herbicidas, que representam 47,5% do total. Entre os 10 países que mais consomem inseticidas no mundo, estão a China, Estados Unidos, a Argentina, a Tailândia, o Brasil, a Itália, a França, o Canadá, o Japão e a Índia (Zhang *et al.*, 2018).

3.5.3 Fungicida

Os fungicidas são compostos químicos usados para combater fungos patogênicos da lavoura, quer seja das plantas ou das sementes. De acordo com Gupta (2018), eles podem ser classificados como fungicidas foliares, de solo ou de cobertura. Os foliares são aplicados na parte aérea das plantas, formando uma barreira protetora, que prejudica o desenvolvimento do fungo. Os fungicidas de solo são aplicados, na forma líquida, em pó ou grânulos, agindo por volatilização ou por propriedades sistêmicas. Já os de cobertura, são utilizados nos produtos, após a colheita, para evitar infestações fúngicas, decorrentes de condições inapropriadas de armazenamento.

De acordo com Dwivedi *et al.* (2021), os fungicidas são o terceiro tipo de agrotóxico mais utilizado globalmente, correspondendo a 17.5% dos agrotóxicos utilizados na agricultura. Materiais inorgânicos, como enxofre, cal, cobre já eram utilizados como fungicidas desde o início do século XIX. Contudo, Gupta (2018) alerta que estas substâncias também podem ser tóxicas para os humanos. Gammon *et al.* (2010) também destacam que o enxofre, muito utilizado como fungicida, pode provocar dermatites em humanos.

3.6 Importância da avaliação toxicológica de agrotóxicos

A utilização de agrotóxicos nas lavouras pode até trazer resultados eficazes no combate das pragas, mas, por outro lado, podem causar sérios impactos ambientais. Os seres vivos estão em constante interação com o meio onde vivem, expondo o seu genoma, continuamente, às adversidades do mesmo. Os agrotóxicos, de maneira geral, não são tão específicos como deveriam, podendo assim agir, desfavoravelmente, sobre outros organismos a ele expostos (Menegazzo *et al.*, 2021). Devido a isto, o uso desses produtos requer cautela na aplicação, para que não haja prejuízos biológicos derivados da sua ação (Younes, 2000).

Os agrotóxicos, de acordo com Caverzan *et al.* (2019), podem conter moléculas de com ação oxidante, capazes de originar radicais livres em sistemas biológicos. Esses radicais têm a capacidade de interagir com as estruturas e macromoléculas celulares, alterando, por exemplo, sistemas de membranas, lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Leme e Marin-Morales, 2009).

Os agentes genotóxicos têm a capacidade de interagir quimicamente com o material genético, resultando em alterações cromossômicas estruturais e numéricas (Leme e Marin-Morales, 2009). De acordo com esses mesmos autores, caso esses danos não sejam reparados, e a célula sobreviva, estas alterações podem ser mantidas através das gerações, perpetuando, assim, a mudança ocorrida (mutação). Apesar de haver uma possibilidade basal de ocorrência de danos nas células, a maioria das mutações ocorre de forma induzida, por xenobióticos com potencial genotóxico (Calviello *et al.*, 2006).

Considerando todas as possibilidades reativas dos agrotóxicos no meio biológico; a sua crescente presença no ambiente; e o seu potencial reconhecidamente tóxico, torna-se necessário que eles sejam avaliados, cada vez mais, quanto aos seus efeitos citogenotóxico para organismos não alvos, bem como para a saúde humana. Os resultados destas avaliações poderão ser usados para conscientizar, de maneira mais efetiva e consistente, os gestores públicos ambientais e de saúde pública, bem como a população em geral. Estas informações também poderão ser usadas para a avaliação dos riscos potenciais dos agrotóxicos para a saúde ambiental, atendendo, assim, a chamada da Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, proposta pela ONU.

3.7 Utilização de bioindicadores em avaliações da toxicidade ambiental

Como já citado anteriormente, o uso abusivo de agrotóxicos tem comprometido o meio ambiente e a saúde humana. Avaliações mais realistas sobre a toxicidade desses agentes podem ser estimadas por meio de estudos ecotoxicológicos, realizados com bioindicadores indicados para cada tipo de avaliação toxicológica. Os bioindicadores são organismos que apresentam alta sensibilidade à contaminação ambiental, cujas modificações observadas inferem sobre os efeitos do contaminante e os ensaios são de fácil execução e altamente reprodutíveis em diferentes laboratórios (Fernandes; Mazzeo; Marin-Morales, 2007). É indispensável, em estudos ambientais, a realização de ensaios de ecotoxicidade e genotoxicidade, pois esses permitem avaliar os efeitos reais e as reações do agente estudado sobre os organismos, como também verificar as possíveis interações tóxicas (aditismo, sinergismo, antagonismo) entre diferentes substâncias presentes no local contaminado.

De acordo com Temmerman *et al.*, (2001), desde o século XVII, os pesquisadores já observavam as respostas de organismos vegetais à poluição ambiental. Porém, a ideia de biomonitoramento surgiu com o estudo de Nylander (1866), onde o autor associou a abundância de líquens aos efeitos da poluição de ar. Atualmente, muitos bioensaios de toxicidade ambiental estão padronizados e, dentre eles, os que usam bioindicadores vegetais (Geras'kin; Evseeva; Oudalova, 2011). Muitas plantas são usadas em avaliações ecotoxicológicas, mas a espécie *Lactuca sativa* (alface) se destaca como biomarcador de fitotoxicidade e *Allium cepa* (cebola) como marcador de citogenotoxicidade e de potencial mutagênico (Aguiar, Andrade-Vieira e Oliveira 2016; Braga *et al.*, 2023; Gonçalves *et al.*, 2020).

3.7.1 Ensaios de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*

Para avaliação do efeito fitotóxico de substâncias, são comumente utilizados os bioensaios de germinação de sementes e de crescimento radicular (Braga *et al.*, 2023; Gonçalves *et al.*, 2020; Kapanen; Itavaara, 2001). Diversas instituições governamentais indicam esses bioensaios para estimar o grau de contaminação química no ambiente (OECD, 1984; USEPA, 1996). Os ensaios de fitotoxicidade, além de apresentarem baixo custo e possibilidade de serem realizados de forma contínua, permitem a avaliação de uma grande variedade de parâmetros de toxicidade, como a taxa de germinação, ganho de biomassa, alongamento de raízes e variados aspectos bioquímicos da planta (Tiquia; Tam; Hodgkiss, 1996; Rodrigues *et al.*, 2013). A OECD (1984) e a USEPA (1996) recomendam diferentes espécies vegetais para serem utilizadas como bioindicadores de toxicidade ambiental (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies vegetais recomendados pela OECD (Guidelines for the Testing of Chemicals) e USEPA (United States Environmental Protection Agency), para testes de fitotoxicidade

OECD	USEPA
<i>Oryza sativa</i>	<i>Lactuca sativa</i>
<i>Triticuma estivum</i>	<i>Brassica oleraceae</i>
<i>Lactuca sativa</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Raphanus sativus</i>	<i>Zea mays</i>
<i>Brassica campestris</i>	<i>Allium cepa</i>

Lepidium sativum

Brassica sativum

Fonte: Kapanen e Itavaara (2001), citado por Araújo (2003).

A espécie *Lactuca sativa* L. é uma dicotiledônea (família Asteraceae) muito utilizadas e bem avaliadas como bioindicadora de monitoramento da ecotoxicidade de poluentes ambientais. É um dos vegetais mais usados em ensaios de fitotoxicidade (Lutterbeck *et al.*, 2015), sendo considerada uma espécie modelo para este tipo de avaliação. De acordo com Braga *et al.*, (2023), a utilização desta espécie como bioindicador de toxicidade traz várias vantagens, como: ser um teste simples, de rápida execução, preditivo e confiável, além de apresentar baixo custo e alta repetibilidade.

Park *et al.*, (2016) salienta que a avaliação da fitotoxicidade com este bioindicador é realizada por meio de testes macroscópicas, que avaliam a taxa de germinação de sementes e a inibição do crescimento do eixo hipocótilo/radícula. A germinação é considerada uma etapa de alta sensibilidade aos efeitos adversos de xenobiontes, pois, neste período, ocorrem vários processos fisiológicos, que podem sofrer interferência de compostos tóxicos (Sobrero e Ronco, 2004). De acordo com Vieira *et al.*, (2022), este bioindicador pode ser também usado em testes de alterações citogenéticas, pois apresentam baixo número cromossômico ($2n = 18$) e características cariotípicas favoráveis para este tipo de avaliação (Leme e Marin Morales, 2009).

Ensaio realizados por Aragão *et al.* (2021) mostraram que todas as concentrações testadas do fungicida tebuconazole, foram fitotóxicas para *L. sativa*, pois afetaram, negativamente, o crescimento radicular da planta. Vieira *et al.*, (2022) avaliaram diferentes concentrações do herbicida glifosato. Os autores observaram que a concentração indicada pelo fabricante não interferiu na germinação de sementes de alface, mas reduziu em 58% o tamanho das suas raízes. Esses resultados confirmam a sensibilidade dos ensaios de fitotoxicidade realizados com a espécie *L. sativa*, indicando que os resultados desses ensaios podem ser usados em avaliação do risco de toxicidade ambiental.

3.7.2 Teste de alterações cromossômicas com *Allium cepa*

Ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade são capazes de detectar efeitos tóxicos no ambiente, mesmo que os compostos estejam em concentrações muito baixas (Aguiar; Vieira; David, 2016). As plantas apresentam alta sensibilidade a agentes citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, passíveis de serem observados por marcadores citogenéticos distintos (mutações pontuais e cromossômicas), se caracterizando como eficientes bioindicadores de toxicidade ambiental (Matos *et al.*, 2017).

De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), a espécie *Allium cepa* ($2n=16$) é um dos melhores sistemas para avaliar efeitos citogenéticos de substâncias químicas e amostras ambientais, devido ao pequeno número e grande tamanho de seus cromossomos, além de possuir alta sensibilidade na detecção de agentes químicos. Essas características fazem com que esta espécie seja amplamente utilizada no monitoramento do efeito de poluentes ambientais (Bianchi; Espindola; Marin-Morales, 2011; Braga *et al.*, 2023; Gonçalves *et al.*, 2020; Mazzeo *et al.*, 2015).

Além disso, esse sistema fornece informações importantes para avaliar os mecanismos de ação de um agente, em relação aos efeitos sobre o material genético (efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos) (Gonçalves *et al.*, 2020). Outra vantagem do teste de *A. cepa* é a possibilidade de expor o organismo teste diretamente em um agente, uma mistura complexa ou a uma amostra ambiental de interesse, sem a necessidade de tratamento prévio da amostra (Leme e Marin-Morales, 2009).

Os agrotóxicos podem induzir danos à biota do local onde ele é aplicado, como, por exemplo, alterar a composição genética das populações naturais. De acordo com Souza *et al.*, (2016), foi observado um aumento de aberrações cromossômicas em células de ervas daninhas de locais que receberam aplicação de herbicidas.

Estudos realizados por Almac e Liman (2021) com clopyralid, mostraram que este herbicida foi genotóxico e citotóxico para *A. cepa*, para todas as concentrações testadas. Em outro estudo, Liman e Özkan (2019) verificaram que o herbicida penoxsulam apresentou efeito citotóxico para o mesmo bioindicador, detectado pela redução do desenvolvimento radicular e do índice mitótico (IM); efeito genotóxico, pela indução de alterações cromossômicas (CAs, ponte de

anáfase, retardatários cromossômicos, poliploidia, anelofase perturbada e pegajosidade) e por danos ao DNA, em comparação ao teste controle.

Estudando os herbicidas Mesotrione e Atrazina, de forma isolada e em mistura, Feslibino *et al.*, (2018) observaram efeito genotóxico para a atrazina, mas não tóxicos para o mesotrione. Porém, quando esses herbicidas foram associados, foi verificado um crescimento de toxicidade, mostrando que o mesotrione potencializou a genotoxicidade do herbicida atrazina.

3.7.3 Teste de toxicidade do solo com *Folsomia candida*

Os invertebrados terrestres são considerados ferramentas importantes para serem usadas em ensaios ecotoxicológicos de contaminantes de sistemas edáficos (Alves e Cardoso, 2016). Os colêmbolos da espécie *Folsomia candida* têm sido muito utilizados para este fim, pois se destacam dentre os invertebrados, pela sua ampla distribuição no solo e por se alimentar de matéria orgânica em decomposição, por isso, importantes para a ciclagem de nutrientes e fertilidade do solo (William *et al.*, 2023). Além disso, esses organismos são considerados excelentes bioindicadores da qualidade de solo, por responderem, eficientemente, a uma variedade de fatores ambientais (Baretta *et al.*, 2008; Bartz *et al.*, 2014; Parisi *et al.*, 2005, Ponge *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2006), o que os tornam importantes também para avaliação de riscos ambientais. Os testes de reprodução realizados com *F. candida* (ISO 11267, 2014) e o de “fuga” (ISO 17512-2, 2011), são padronizados pela International Organization for Standardization- ISO (Luz *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2014).

O teste de reprodução com *F. candida* tem sido usado como um auxiliar na identificação de riscos ambientais (baseado na avaliação das alterações da dinâmica populacional), e para estimar a amplitude de exposição que uma comunidade edáfica pode suportar (Alves *et al.*, 2014). Estudos realizados por Fernandes *et al.* (2023), com os inseticidas teflubenzuron, imidacloprid, tiaclopride, mostraram que todos esses agrotóxicos foram tóxicos para os colêmbolos, afetando, principalmente, os indivíduos juvenis. Em outro estudo, realizado por William *et al.*, (2023) com neonicotinoides, mostraram que essa família de pesticidas interfere na sobrevivência e reprodução da espécie *F. candida*. Resultados como os apresentados acima sugerem que a aplicação de

agrotóxicos pode prejudicar a reprodução e o desenvolvimento de invertebrados do solo.

3.8 A utilização dos herbicidas Imazetapir e Flumioxazin

O uso em larga escala do herbicida glifosato tem proporcionado uma maior tolerância de muitas plantas invasoras via seleção natural (Owen, 2008). A busca de novos produtos é a solução para contornar essa problemática. As moléculas flumioxazin + imazetapir vêm sendo utilizadas como alternativa para o controle de plantas invasoras. Essas moléculas, quando associadas, conferem uma maior amplitude ao controle de pragas, porque podem ser aplicadas em pré ou pós-emergência das plantas invasoras, antes do plantio da própria cultura.

3.8.1 Imazetapir

O imazetapir (Figura 1), é um herbicida de modo de ação sistêmico pertencente à família das imidazolininas. Esse composto é absorvido pelas raízes e folhas das ervas daninhas, e atua inibindo da enzima acetohidroxiácido sintetase, no qual é crucial para a síntese dos aminoácidos de cadeia ramificada (valina, isoleucina e leucina) (Villa *et al.*, 2007). Essa inibição interfere na síntese das moléculas de DNA, interferindo na divisão celular e consequentemente no desenvolvimento do organismo alvo (Souto *et al.*, 2013).

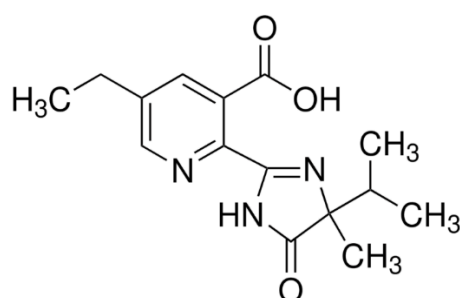


Figura 1. Imazetapir {(RS)-5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl)nicotinic acid}. Fonte: Sigma-Aldrich.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o classifica como moderadamente tóxico (Classe 3), e é usado em culturas como arroz, feijão e soja. De acordo com Liman, Cigerci e Öztürk (2015), o imazetapir tem se destacando nos últimos anos por ser uma alternativa ao uso do glifosato, como

também por apresentar uma alta eficiência no controle de plantas daninhas, flexibilidade no período de aplicação, baixa toxicidade para mamíferos e elevada seletividade. No entanto, este herbicida apresenta uma longa persistência no solo, conferindo risco de contaminação a organismos não-alvo, como também para águas subterrâneas e superficiais (Villa *et al.*, 2007; Souto *et al.*, 2013).

3.8.2 Flumioxazin

O flumioxazin (Figura 2) é um herbicida de contato do grupo químico ftalamidas usado tanto na pré, como na pós-emergência, para o controle de plantas invasoras latifoliadas e gramíneas (Guimarães e Valente, 1995).

Este herbicida é responsável por controlar o desenvolvimento de diversas espécies de dicotiledôneas e monocotiledôneas invasoras da cultura de soja, por interferir na rota da síntese da clorofila das plantas invasoras, devido ao acúmulo de porfirinas (Oliveira *et al.*, 1999). Esse acúmulo é decorrente da ação inibidora do herbicida sobre a enzima protoporfirinogênio oxidase, denominado, por isso, de inibidor da PROTOX. Com a inibição da PROTOX, a protoporfirina IX se acumula muito rapidamente nas células da planta e descontrola a rota metabólica da sua síntese. No citoplasma, a protoporfirina IX, na presença de luz e oxigênio, produz oxigênio singlete, que promove a peroxidação dos lipídios da membrana e, conseqüentemente, a necrose celular. O uso desse herbicida em pré-emergência danifica o tecido foliar no momento em que a plântula emerge. Similarmente, à aplicação em pós-emergência, o sintoma característico é a necrose do tecido que entrou em contato com o herbicida (Ferreira *et al.*, 2005).

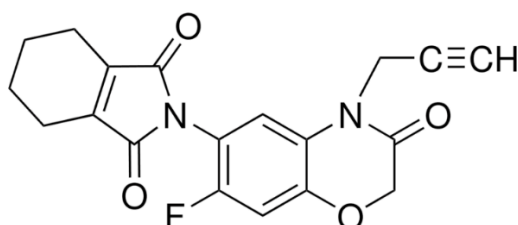


Figura 2. Flumioxazin {(N-(7-fluoro-3,4-dihydro-3-oxo-4-prop-2-ynyl-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)cyclohex-1-ene-1,2-dicarboxamide)}. Fonte: Sigma-Aldrich.

De acordo com a ANVISA, o flumioxazin é classificada como um produto pouco tóxico (Classe IV), usada principalmente nas culturas de amendoim, algodão soja e feijão. Estudos mostram que este herbicida pode se degradar

rapidamente no solo, além de apresentar uma baixa mobilidade no solo (Sondhia e Dixit, 2008; Oliveira *et al.*, 1999). Porém, em um estudo realizado com mamíferos, mostrou que a flumioxania foi teratogênica em ratos, mostrando um risco de toxicidade para organismos não-alvos (Iwashita *et al.*, 2022)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Solo utilizado no estudo

4.1.1 Teste de solo com histórico de contaminação

Foram coletadas amostras de solo argiloso de áreas de lavoura de soja, localizada no município de Sambaíba/MA, com histórico de dois anos de aplicação dos herbicidas flumioxazin e imazetapir (flumioxazin - 20 g i.a./kg; imazetapir - 106g i.a./L; imazetapir + flumioxazin - 85 g i.a./L e 40 g i.a./L).

Os herbicidas foram aplicados uma vez ao ano, sempre durante a fase de pré-plantio. Os solos com dois anos de aplicação consecutivas foram coletados um ano após essa área ser contaminada (Amostragem 1). Adicionalmente, foram obtidas amostras de solo da mesma área, porém com aplicação recente (Amostragem 2).

4.1.2 Teste de solo com contaminação artificial

4.1.2.1 Preparo das diluições do herbicida

A calda do herbicida foi preparada de acordo com as recomendações de dose da bula do fabricante. Dessa forma, foi diluído 4 ml do produto comercial em 1 litro de água (imazetapir + flumioxazin - 85 g i.a./L e 40 g i.a./L, respectivamente). Partindo disso, foram preparadas mais quatro concentrações, além da calda de campo: 2 ml/L; 3 ml/L; 5 ml/L; 6 ml/L.

4.1.2.2 Aplicação do herbicida no solo

O solo controle e o solo utilizado no preparo dos tratamentos estudados foram coletados no Jardim Experimental da Universidade Estadual Paulista (UNESP), como os descrito por Mazzeo *et al.* (2015). Para calcular o volume de herbicida a ser aplicado, primeiramente foi determinado a massa do solo em 1 ha. Para calcular a massa de solo, considerou-se a profundidade a que o solo foi recolhido (0,10 m), a densidade do solo de 1.040 kg m⁻³ cm (Reis *et al.*, 2019). Foi aplicado 96 µl das soluções em 1kg de solo, e em seguida homogeneizado com um auxílio de uma espátula.

4.2 Montagem dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos em delineamentos inteiramente casualizados (DIC) no Laboratório de Mutagênese, da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Os ensaios do solo com histórico de contaminação foram compostos pelos tratamentos: associação do solo com os herbicidas (solo + flumioxazin; solo + imazetapir; solo + flumioxazin + imazetapir), controle ambiental (solo não contaminado), controle negativo e controle positivo. Foram avaliadas amostras com dois anos de aplicação consecutivas (Amostragem 1) e amostras recém aplicadas (Amostragem 2). Para o ensaio do solo contaminação artificial com diferentes concentrações da mistura dos herbicidas, foram determinados os seguintes tratamentos: cinco concentrações da mistura dos herbicidas (2 ml/L, 3 ml/L, 4 ml/L, 5 ml/L, 6 ml/L), controle ambiental (solo não contaminado), controle negativo (CN) e controle positivo.

4.3 Capacidade de retenção de água (WHC)

Para calcular a capacidade máxima de retenção de água no solo (Water Holding Capacity – WHC), foram utilizados cadinhos de 25ml preenchidos de solo e submersos em água por 2h. Passado esse período, os cadinhos foram colocados em um recipiente por mais 2h para drenar a água. Em seguida, os cadinhos foram para estufa à 105 °C até obtenção de uma massa constante. O WHC foi calculado através da porcentagem de massa seca. Nos testes realizados, o WHC foi estabelecido em 70% para as espécies *L. sativa* e *A. cepa* e 45% para *F.candida* (Braga *et al.*, 2023).

4.4 Ensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*

As sementes de *L. sativa* foram submetidas a germinação em placas de Petri individuais (20 sementes por placa) contendo 20g de solo. Como controle negativo foi utilizado 5 ml de água ultra pura, e para controle positivo 5 ml de sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M) (Gonçalves *et al.*, 2020). O ensaio foi realizado em estufa BOD, sem fotoperíodo, a 22 °C, com exposição de 120 horas, em quintuplicata.

Após período de exposição, foram calculados os percentuais de Germinação (%), Crescimento Radicular (%) e Índice de Germinação (%), de acordo com protocolo usado por (Gabriel *et al.*, 2019; Gonçalves *et al.*, 2020; Tiquia, Tama e Hodgkiss, 1996).

Germinação de sementes (%):

$$GS(\%) = \frac{N^{\circ} \text{ de sementes germinadas}}{N^{\circ} \text{ de sementes germinadas no controle}} \times 100$$

Crescimento radicular (%):

$$CR(\%) = \frac{\text{Média do comprimento radicular no extrato}}{\text{Média do comprimento radicular no controle}} \times 100$$

Índice de Germinação (%):

$$IG(\%) = \frac{(\% \text{ de germinação de sementes}) \times (\% \text{ crescimento radicular})}{100\%}$$

4.5 Ensaio de citogenotoxicidade com *Allium cepa*

As sementes de *A. cepa* (2n = 16 cromossomos) do mesmo lote e variedade (Baia Periforme) foram submetidas à germinação em placas de Petri individuais (100 sementes por placa) contendo 20g de solo. Como CN foi utilizado água ultrapura, os controles positivos foram: 10 mg/L de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), Trifluralina (0,84 mg/L). O ensaio foi realizado em estufa BOD, com fotoperíodo de 12h de luz, a 21 °C, por um tempo de exposição de 120 horas, em triplicata.

Após germinação, foram coletadas e fixadas em Carnoy (álcool: ácido acético: - 3:1 – v/v), por 6 a 8 horas em temperatura ambiente, radículas com cerca de 2,0 cm de comprimento. Passado esse período, o fixador foi substituído por um novo e as raízes armazenadas a 4 °C. Para a confecção das lâminas, foi utilizado a região meristemática das raízes fixadas, seguindo o protocolo descrito por (Leme e Marin-Morales, 2009).

A citotoxicidade foi avaliada pela presença de alterações no Índice Mitótico, a genotoxicidade pelo Índice Genotóxico (perda, ponte, atraso, aderência cromossômica, metáfase poliplóide e C-metáfases). A análise de todos esses parâmetros foi realizada, em microscópio de luz, pela contagem de 6000 células por tratamento, sendo 6 lâminas por amostra (cerca de 1000 células/lâmina).

$$\text{Índice mitótico} = \frac{N^{\circ} \text{ de células em divisão}}{N^{\circ} \text{ de células totais}} \times 100$$

$$\text{Índice Genotóxico} = \frac{N^{\circ} \text{ de aberrações cromossômicas}}{N^{\circ} \text{ de células totais}} \times 100$$

4.6 Bioensaio com *Folsomia candida*

Os espécimes de *F. candida* foram obtidos a partir de culturas sincronizadas do Laboratório de Mutagênese Ambiental da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro/SP. Os indivíduos foram mantidos em potes de plástico, com perfurações nas tampas, permitindo troca gasosa. Como substrato foi utilizado uma mistura de gesso com carvão ativado, na proporção de 10:1. Os organismos foram mantidos em estufa BOD à $20 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12h de luz, e alimentados com fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), duas vezes por semana. A umidade dos substratos da cultura foi mantida adicionando água de osmose (Braga *et al.*, 2023).

4.6.1 Teste de reprodução com *F. candida*

Para realização do teste de reprodução com *F. candida* utilizou-se os procedimentos descritos na norma ISO 11267 (2014). Foram utilizados recipientes cilíndricos de vidro (4 cm de diâmetro e 7 cm de altura). O ensaio foi realizado em quintuplicata, onde cada réplica recebeu 30g de solo contaminado com as concentrações do herbicida.

Em cada recipiente foram colocados 10 colêmbolos com idade entre 10 e 12 dias, além de 2 mg de fermento biológico. Semanalmente os recipientes foram abertos para realização de troca gasosa e correção da umidade. A cultura foi alimentada novamente após 14 dias passados do início do experimento. O teste teve duração de 28 dias, e ao final desse período, cada réplica foi transferida individualmente para um recipiente com água, provocando a flutuação dos indivíduos. Para melhor visualização dos espécimes, foi aplicado um corante azul. Em seguida, cada réplica foi fotografada e contabilizada com o auxílio do software ImageJ (Braga *et al.*, 2023).

4.7 Análise estatística

As análises dos resultados foram realizadas com o auxílio do software R 4.2.1 (R Core Team, 2023). Primeiramente foram realizados testes de homogeneidade (Bartlett test) e normalidade (Shapiro-wilk test). Dados que apresentaram distribuição normal e homogênea foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de média Dunnet, enquanto os dados sem

distribuição normal e homogênea foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, ambos a 5% de probabilidade (Aguiar, Andrade-Vieira e Oliveira 2016; Gonçalves, de *et al.*, 2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho estão apresentados na forma dos seguintes artigos:

Artigo 1: Avaliação da fitogenotoxicidade de solos com histórico de contaminação pelos herbicidas flumioxazin e imazetapir

Artigo 2: Avaliação da toxicidade de diferentes concentrações da mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazin através de diferentes ensaios ecotoxicológicos

Toxicidade de solos com histórico de contaminação pelos herbicidas flumioxazin e imazetapir

Matheus de Moraes Cunha Gonçalves, Letícia Rosa de Souza, Ana Paula Braga, Ademir Sergio Ferreira de Araujo, Maria Aparecida Marin-Morales

Resumo

A soja é a leguminosa de maior cultivo no mundo, e que também tem uma grande representatividade na agricultura brasileira. Porém, um dos principais problemas da sua produção é a presença de plantas invasoras, cujo controle é, na sua grande maioria, feito pela aplicação de herbicidas. O uso intensivo de herbicida vem aumentando a preocupação com seus riscos de contaminação ambiental. Muitos autores reportam que a utilização desses químicos causa graves danos ao solo, às águas subterrâneas e superficiais, a flora e a fauna. Os herbicidas imazetapir e flumioxazin vêm sendo muito utilizados como alternativa para o controle de plantas invasoras de muitas culturas, dentre elas as de soja. Devido aos riscos ambientais ocasionados pelos herbicidas, nosso trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de bioensaios ecotoxicológicos realizados com bioindicadores vegetais, os potenciais efeitos tóxicos de solos contaminados com os herbicidas flumioxazin e imazetapir, isolados e em mistura. Os bioensaios de *Lactuca sativa* mostraram que os agrotóxicos testados afetaram o crescimento radicular da planta, tanto por efeitos residuais do produto presentes no solo agrícola (solos da amostragem 1), quanto pelo próprio princípio ativo desses herbicidas (solos da amostragem 2). Os herbicidas também demonstraram efeitos citotóxicos e genotóxicos para as células de *Allium cepa*. Assim, os resultados mostraram que os herbicidas imazetapir e flumioxazin, isolados e em mistura, ocasionaram efeitos fitotóxicos e citogenotóxicos, além de apresentarem persistência no ambiente edáfico. Pelos resultados de toxicidade dos herbicidas, observada pelos resultados de índice de germinação, estes químicos não devem ser aplicados na lavoura, por não serem seguros para a vida.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a soja ocupa a posição de planta de maior cultivo global. De acordo com dados fornecidos em 2024, pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2024), a produção desse grão, para a safra de 2023/2024 foi de 395 milhões de toneladas. No Brasil, dados divulgados pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2024), mostram que a produção desse grão, para a safra atual, foi de 147 milhões de toneladas. Este valor reflete um aumento de 2,8% na área plantada, em comparação com a safra anterior, sugerindo a possibilidade de alcançar a maior produção mundial de soja nesse período (CONAB, 2024).

As plantas invasoras ou daninhas, são consideradas um dos principais fatores limitantes da produção agrícola, fato este que também afeta a cultura de soja (Vasconcelos *et al.*, 2012). São consideradas ervas daninhas todas as plantas que aparecem em lugares onde o ser humano não deseja que elas cresçam, como em campos cultivados, pastos, hortas e jardins. A presença destas plantas em sistemas agrícolas, sistematicamente, acarreta prejuízos às lavouras, por diminuir a produtividade, quer seja pela competição direta pelos recursos nutricionais, água e espaço; pelos compostos alelopáticos liberados por elas; ou outros fatores relacionados estratégias agressividade da planta (Horvath *et al.*, 2023).

Os herbicidas são agentes defensivos de cultura, que controlam ou inibem o desenvolvimento de plantas daninhas. São utilizados, anualmente, cerca de 3 bilhões toneladas de agrotóxicos para o controle de pragas nas lavouras (Sharma *et al.*, 2020). Os herbicidas e inseticidas são os principais produtos utilizados como biocidas agrícolas, representando 47,5% e 29,5% dos agrotóxicos usados na agricultura (Syafudin *et al.*, 2021). De acordo com Sharma *et al.* (2020), os 10 países de maior consumo desses produtos são a China, EUA, Argentina, Índia, Japão, Canadá, Brasil, França, Itália e Tailândia.

Atualmente, o glifosato está sendo substituído na cultura de soja por outros agrotóxicos, como os herbicidas imazetapir e flumioxazin. Esta substituição está relacionada ao amplo espectro de ação desses produtos (Pertile *et al.*, 2020). O imazetapir {(RS)-5-ethyl-2-(4-isopropyl-4-methyl-5-oxo-2-imidazolin-2-yl) nicotinic acid} pertence à família das imidazolininas, tendo como mecanismo de ação a inibição da enzima acetohidroxiácido sintetase, que é crucial para a biossíntese dos aminoácidos de cadeia ramificada (valina, isoleucina e leucina), essenciais para a síntese de DNA e crescimento do organismo (Duggleby, McCourt e Guddat, 2008; Tan, Evans e Singh, 2006). O flumioxazin {(N-(7-fluoro-3,4-dihydro-3-oxo-4-prop-2-ynyl-2H-1,4-benzoxazin-6-yl)cyclohex-1-ene-1,2-dicarboxamide)}, pertencente à família N-fenilftalimida, possui como modo de ação a inibição da protoporfirinogênio oxidase (Protox), uma enzima essencial para a síntese de clorofila (Iwashita *et al.*, 2022). Esses herbicidas, que são aplicados para controlar plantas invasoras, de folha larga e gramíneas, em pré e pós-emergência inicial, são encontrados residualmente no solo (Chhokar *et al.*, 2019).

Devido ao amplo uso de herbicidas e as características tóxicas destes químicos, se torna cada vez mais clara a necessidade de realização de ensaios ecotoxicológicos, que possam informar sobre os reais riscos ambientais e à saúde humana desses compostos. Os organismos vegetais permitem estimar comprometimentos em um estrato biológico situado na base da cadeia alimentar, portanto importante para a segurança de toda uma comunidade biológica. Esses bioindicadores também permitem avaliar diferentes marcadores de toxicidade (fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e também do potencial mutagênico do contaminante), por meio de uma bateria de testes, responsivos, de rápida execução, de alta correlação com outros grupos biológicos, de baixo custo e indicados por importantes agências ambientais internacionais (OECD, 1984; USEPA, 1996). Os ensaios de germinação e crescimento radicular, realizados com o bioindicador *L. sativa*, são frequentemente utilizados para a avaliação de fitotoxicidade (Gonçalves *et al.*, 2020). O teste de alterações cromossômicas com *A. cepa* é capaz de detectar efeitos citogenotóxicos e potencial mutagênico, mesmo quando o contaminante se apresenta em concentrações muito baixas, tornando esta espécie uma valiosa bioindicadora de toxicidade ambiental (Aguiar, Andrade-Vieira e Oliveira, 2016; Leme e Marin-Morales, 2009; Matos *et al.*, 2017; Braga *et al.*, 2023). Esses ensaios são cruciais para a avaliação e um bom e eficiente monitoramento de impacto e da saúde ambiental.

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito fitotóxico e citogenotóxico de solos agrícolas com históricos de aplicação, por 2 anos consecutivos, dos herbicidas Imazetapir e Flumioxazin tanto isolados como em misturas, antes e após a terceira aplicação dos mesmos herbicidas, por meio de diferentes bioindicadores vegetais e ensaios ecotoxicológicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Solos utilizados no estudo

Foram coletadas amostras de solos argilosos de lavouras de soja, localizadas no município de Sambaíba/MA, com históricos de dois anos de aplicação dos herbicidas flumioxazin e imazetapir (flumioxazin - 20 g i.a./kg; imazetapir - 106g i.a./L; imazetapir + flumioxazin - 212 e 100g i.a./L), antes e após da terceira aplicação dos herbicidas no mesmo solo. As coletas de solos

foram feitas em 3 áreas distintas de uma mesma propriedade agrícola, como segue: 1. Solos preparados com o herbicida flumioxazin (FL); 2. Solos preparados com o herbicida imazetapir (IM); área 3: solos preparados com a misturas de (FL+IM). As aplicações dos herbicidas foram feitas na fase de pré-plantio das culturas de soja. Foram retiradas amostras destes solos, um ano após a segunda aplicação, em dois momentos distintos: Amostragem 1, solos coletados antes da terceira aplicação do herbicida correspondente ao ponto de coleta e Amostragem 2, após a reaplicação, pela terceira vez, do mesmo agrotóxico no local.

3 MONTAGEM DOS EXPERIMENTOS

Os experimentos foram conduzidos em delineamentos inteiramente casualizados (DIC) no Laboratório de Mutagênese Ambiental, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro. Os ensaios foram realizados com os tratamentos: solo contaminado com flumioxazin; solo contaminado com imazetapir; solo contaminado com flumioxazin e imazetapir. Foi realizado, conjuntamente com os tratamentos, ensaios de controle ambiental (solo não contaminado), controle negativo (água de osmose reversa) e controle positivo (sulfato de zinco - para *L. sativa*; e MMS para *A. cepa*).

3.1 Ensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*

Sementes de *L. sativa* foram submetidas a germinação em placas de Petri (20 sementes por placa), contendo 20 g dos solos. O controle negativo foi realizado com 5 ml de água de osmose reversa, e o controle positivo com 5 ml de sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M) ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Gonçalves *et al.*, 2020). O ensaio foi realizado em estufa BOD, sem fotoperíodo, a 22 °C, com exposição de 120 horas. Os testes foram realizados em quintuplicata.

Após o período de exposição, foram contabilizadas as sementes germinadas e mensuradas as sementes que germinaram. Foram calculados os percentuais de Germinação (%), de Crescimento Radicular (%) e o Índice de Germinação (%), de acordo com os protocolos descritos por Tiquia *et al.* (1996)

3.2 Ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade com *Allium cepa*

Sementes de *A. cepa* ($2n = 16$ cromossomos), de um mesmo lote (variedade “Baia Periforme”), foram submetidas à germinação em placas de Petri (100 sementes por placa), contendo 20 g de solo. Como controle negativo foi utilizado água de osmose reversa, e controle positivo 10 mg/L de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3). O ensaio foi realizado em estufa BOD, com fotoperíodo de 12h, a 21 °C, por um período de 120 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após germinação, as raízes (com cerca de 2,0 cm de comprimento) foram coletadas e fixadas em Carnoy (álcool: ácido acético: - 3:1 – v/v), por 6 a 8 horas, em temperatura ambiente. Decorrido esse período, o fixador foi substituído por um outro recém preparado, e as raízes armazenadas a 4 °C. As lâminas foram confeccionadas com a região meristemática das raízes fixadas, seguindo o protocolo descrito por Leme e Marin-Morales (2009).

O efeito citotóxico dos solos foi avaliado pela presença de alterações no índice mitótico; e o de genotoxicidade pelo índice das alterações cromossômicas (perda, ponte, atraso, aderência cromossômica, metáfase poliplóide e C-metáfases). A análise desses parâmetros foi realizada em microscópio de luz. Foram contabilizadas 6000 células por tratamento, sendo 3 lâminas por replica, totalizando 12 lâminas por tratamento (cerca 500 células/lâmina) (Leme e Marin-Morales, 2009).

3.3 Análise Estatística

Os níveis de significância dos resultados dos ensaios foram estimados pelo software R 4.2.1 (R Core Team, 2023). Inicialmente foram realizados os testes de Bartlett e Shapiro-wilk, para verificar a homogeneidade e normalidade, respectivamente. Os dados que apresentaram distribuição normal e homogênea foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido do teste Dunnet, enquanto os dados sem distribuição normal e homogênea foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Os testes foram conduzidos sob 5% de significância (Aguiar, Andrade-Vieira e Oliveira, 2016; Gonçalves *et al.*, 2020; Braga *et al.*, 2023).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio de fitotoxicidade

A fitotoxicidade das amostras dos solos contaminados com os herbicidas foi avaliada por meio de bioensaios de germinação, crescimento radicular e determinação do índice de germinação, realizados com o bioindicador *L. sativa*. Os resultados obtidos no teste de germinação com este bioindicador mostram que a germinação de todos os ensaios realizados foi superior a 80% (todos os solos da Amostragem 1 e 2), indicando ausência de toxicidade, relacionada ao parâmetro de germinação. Em contrapartida, os herbicidas causaram reduções significativas no desenvolvimento das raízes. Foram observadas reduções no crescimento radicular de 36% e 39%, para solos contaminados com Flumioxazin, derivados das amostragens 1 como 2, respectivamente; reduções respectivas de 38,51% e 37,78%, para as amostragens 1 e 2 dos solos contaminados com Imazetapir; e redução de 53,94% e 59,56%, respectivamente para os solos contaminados com a associação dos dois herbicidas, coletados nas amostragens 1 e 2 (Flumioxazin e Imazetapir) (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados dos testes de Germinação (%), Crescimento Radicular (%) e Índice de Germinação (%), realizados com o bioindicador *Lactuca sativa*, expostos às amostras de solos contaminadas com os herbicidas Flumioxazin e Imazetapir Isolados e em mistura.

Amostragem 1	Germinação (%)	Crescimento Radicular (%)	Índice de Germinação (%)
CN	100±0	100±0	100±0
CA	98.33±2.88	99.71±0.71	98.06±3.56
Flumioxazin	100±5.41	64.1±3.75*	64.25±6.77 *
Imazetapir	92.77±8.55	61.49±12.51*	57.74±16.19 *
Ima + Flumio	85.83±8.51	46.06±3.39*	39.73±6.88 *
CP	0±0	0±0	0±0
Amostragem 2	Germinação (%)	Crescimento Radicular (%)	Índice de Germinação (%)
CN	100±0	100±0	100±0
CA	98.33±2.88	99.71±0.71	98.06±3.56
Flumioxazin	96.57±2.96	61.2±3.62 *	59.18±5.37 *
Imazetapir	86.21±7.42	62.22±4.53 *	53.51±3.79 *
Ima + Flumio	89.82±10	40.44±9.05 *	36.21±8.41 *
CP	0±0*	0±0*	0±0*

Amostragem 1: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, antes da terceira aplicação do mesmo herbicida; Amostragem 2: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, após a terceira aplicação do mesmo herbicida; CN: Controle negativo (água de osmose reversa); CA: Controle ambiental (Solo não contaminado); CP Controle positivo

(ZnSO₄7H₂O). *Estatisticamente significativo, em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com ANOVA/Dunnet.

A supressão da germinação de sementes pode ser indicativa de efeito letal, manifestado pela inviabilidade do desenvolvimento do embrião (Gonçalves *et al.*, 2020). Já a redução do crescimento radicular pode ser utilizada como indicador de efeito subletal, uma vez que certos agentes não conseguem impedir a germinação das sementes, mas interferem drasticamente na capacidade de desenvolvimento da raiz (Sobrero e Ronco, 2004).

Estudos realizados por Liman *et al.* (2015) com herbicida Imazetapir, mostraram que todas as concentrações testadas pelos autores induziram redução significativa no crescimento radicular do bioindicador *A. cepa*. Em uma investigação semelhante, realizada por Magdaleno *et al.* (2015) com *L. sativa*, os autores também observaram efeito fitotóxico para o imazetapir. No estudo, todas as concentrações avaliadas do herbicida também não interferiram na taxa de germinação das sementes, mas ocasionaram uma diminuição significativa no crescimento das raízes. Melo *et al.* (2019) avaliaram a fitotoxicidade do herbicida flumioxazin, quando o herbicida foi aplicado em cultura de cebola. Os autores observaram que o herbicida, além não ser eficaz no controle das plantas invasoras dessa cultura, comprometeu o desenvolvimento da lavoura e, conseqüentemente, a sua produtividade. Pelas respostas observadas no estudo, os autores conjecturaram que plantas mais sensíveis podem ter os estágios iniciais do desenvolvimento suprimido pela ação do flumioxazin, uma vez que este herbicida inibe a enzima protoporfirinogênio oxidase (PPO), que acaba causando lesões graves e necrose nas plântulas (Melo *et al.*, 2019).

O índice de germinação, baseado nos resultados dos ensaios de germinação de sementes e de alongação radicular, é um parâmetro sensível, indicado para verificar baixos índices de toxicidade, que impacta o desenvolvimento das raízes, bem como elevados efeitos tóxicos, que podem interferir na germinação de sementes (Tiquia *et al.*, 1996). De acordo com Gonçalves *et al.* (2020), o Índice de Germinação (IG) é um parâmetro útil para quantificar o nível de fitotoxicidade de um agente.

Compostos que apresentam IG entre 100 a 80% são considerados não tóxicos; entre 80 a 70 % moderadamente tóxicos; entre 70% a 50% tóxicos; entre 50% a 30% altamente tóxicos; e abaixo de 30% extremamente tóxicos (Araújo,

Monteiro e Abarkeli, 2003; Gonçalves *et al.*, 2020; Tiquia, Tama e Hodgkiss, 1996). De acordo com Zucconi e Bertoldi (1987), compostos que induzem IG inferiores a 60% não devem ser aplicados em solos agrícolas, pois não devem ser seguros para a biota edáfica.

Pelas análises realizadas com o bioindicador *L. sativa*, foi possível observar que os solos contaminados com flumioxazin e imazetapir exibiram, baixos valores de IG, que identificam essas substâncias como tóxicas. Os IGs do flumioxazin, apresentaram valores de 64,25 e 57,74, para solo da amostragem 1 e 2, respectivamente; e os do imazetapir valores de IGs de 59,18 e 53,51, para as mesmas amostragens (1 e 2), respectivamente (Tabela 2). A mistura dos dois herbicidas foi ainda mais tóxica, quando comparada com as respostas dos herbicidas aplicados isoladamente (IGs de 39,73 e 36,21, para os solos das amostragens 1 e 2, respectivamente) (Tabela 2). Por esses resultados, é possível afirmar que os dois herbicidas avaliados são altamente tóxicos, portando não recomendáveis, de acordo com o estudo de Zucconi e Bertoldi, (1987), para uso agrícola quando de forma isolada, e tampouco associados entre si.

4.2 Avaliação da citogenotoxicidade de solo contaminado por herbicidas, pelo bioindicador *Allium cepa*

Os resultados da avaliação da citotoxicidade de solos contaminados com os herbicidas flumioxazin e imazetapir, realizada com sementes de *A. cepa*, estão apresentados na Figura 3.

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com amostras de solos contaminados com os herbicidas citados, derivados de duas amostragens temporais (1 e 2), revelaram diferença estatisticamente significativa, em relação aos dados do controle, o que evidencia que os herbicidas avaliados inibiram a divisão celular de *A. cepa*, portanto foram citotóxicos para este bioindicador

De acordo com Harashima e Schnittger (2010), existe uma relação intrínseca entre o número de células em processo de divisão e o crescimento radicular. A taxa de proliferação celular impacta, diretamente, o desenvolvimento e crescimento dos órgãos vegetais (Espen, Pirovano e Cocucci, 1997).

Os resultados indicaram que os herbicidas avaliados inibiram o processo de divisão celular de *A. cepa*. (Figura 3). Também foi observado que esses

herbicidas continuam potencialmente tóxico, mesmo após um ano da sua aplicação, sugerindo uma possível persistência ambiental. A Amostragem 2 (Figura 3), exibiu um efeito citotóxico mais pronunciado, sugerindo várias hipóteses para esta alta toxicidade: (a) toxidade alta, devido ao próprio princípio ativo do herbicida recém aplicado, que se encontra em uma concentração alta no momento desta aplicação; (b) somatória da toxicidade do princípio ativo do herbicida recém aplicado com a dos resíduo dos herbicidas aplicados nos anos anteriores; (c) somatória da toxicidade do princípio ativo do herbicida recém aplicado com metabólitos derivados da degradação dos herbicidas aplicados nos anos anteriores; (d) somatória da toxicidade do princípio ativo do herbicida resíduos das outras aplicações anteriores, por retenção do princípio ativo que ficaram adsorvidas nas partículas do solo argiloso.

Resultados semelhantes foram encontrados por Liman, *et al.* (2015) e Parvan *et al.* (2020), que também constataram uma redução na taxa de divisão celular em *A. cepa*, em resposta aos herbicidas imazepatir e flumioxazin. Em contrapartida, Magdaleno *et al.*, (2015) observaram um aumento significativo no índice mitótico das células de cebola, quando expostas à concentração testada de imazetapir. De acordo com os autores, esse resultado pode ser observado pela elevada presença de células em estágio de prófase, indicando que estas células não progrediram para as demais fases do ciclo mitótico.

Em relação aos efeitos genotóxicos (Figura 4), os dois herbicidas estudados foram genotóxicos para as células de *A. cepa*, tanto os de solos da Amostragem 1, quanto da Amostragem 2. Em contrapartida, não foi observado, pelos bioindicadores utilizados, potencial mutagênico para nenhum dos herbicidas aqui estudados.

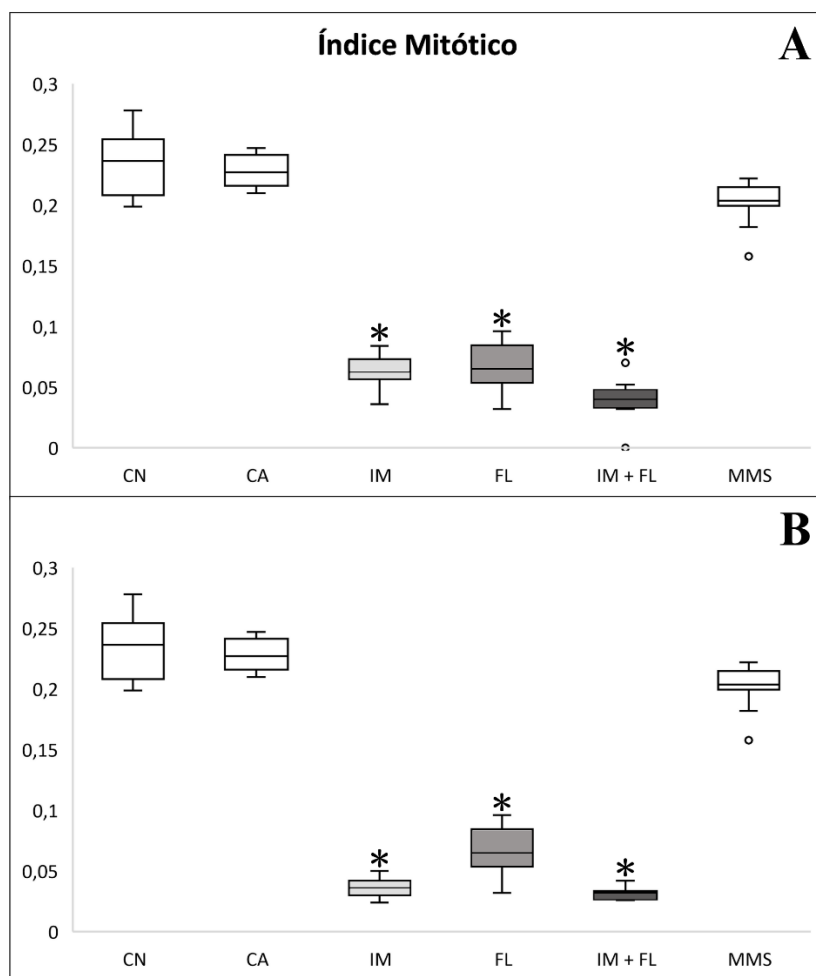


Figura 3. Avaliação do Índice Mitótico. A: Amostragem 1: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, antes da terceira aplicação do mesmo herbicida; B: Amostragem 2: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, após a terceira aplicação do mesmo herbicida; CN: Controle Negativo; CA: Controle Ambiental; IM: Imazetapir; FL: Flumioxazin; IM + FL: Mistura dos herbicidas; MMS: Metilmetano sulfonato. * Estatisticamente significativo, em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), por meio do teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

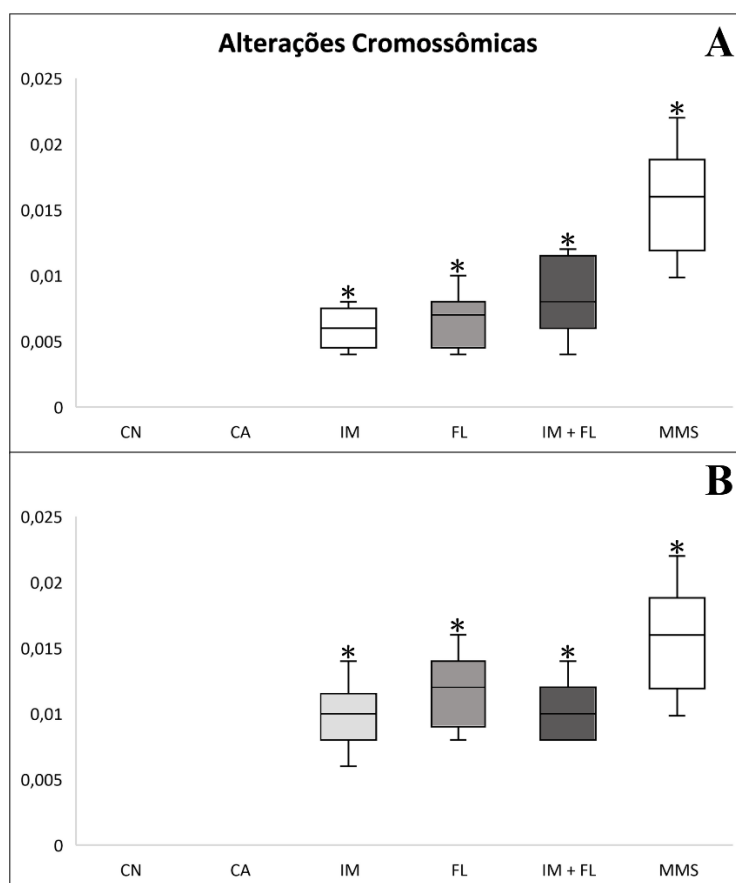


Figura 4. Avaliação da Genotoxicidade. A: Amostragem 1: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, antes da terceira aplicação do mesmo herbicida; B: Amostragem 2: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, após a terceira aplicação do mesmo herbicida; CN: Controle Negativo; CA: Controle Ambiental; IM: Imazetapir; FL: Flumioxazin; IM + FL: Mistura dos herbicidas; MMS: Metilmetano sulfonato. * Estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), por meio do teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

As alterações cromossômicas identificadas nas células de *A. cepa*, pós exposição a amostras de solos contaminados com os herbicidas flumioxazin e imazetapir, estão apresentadas na Tabela 3. As alterações encontradas em maior frequência foram aderências, C-metáfases e perdas cromossômicas. Os resultados destes ensaios indicam que os solos contaminados com resíduos de herbicidas, derivados de acúmulos de aplicações destes químico (como na amostragem 1) induzem alterações cromossômicas, mas, quando os herbicidas foram recém aplicados, pela terceira vez no solo (amostragem 2), houve uma maior incidência de danos cromossômicos, comprovando, mais uma vez, a maior toxicidade dos herbicidas, após reaplicações deste químico, inferindo que um potencial acumulativo desses herbicidas no ambiente. Outros autores relataram a presença de aderência cromossômica, perda e pontes cromossômicas e C-

metáfases em células de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de imazetapir (El-Nahas, 2000; Liman, Ciğerci e Öztürk, 2015). Parvan *et al.*, (2020) também encontraram alterações cromossômicas semelhantes (perda cromossômica e anormalidades na metáfase) ao avaliarem os efeitos do herbicida flumioxazin. Pelas alterações observadas para esses herbicidas, é possível atribuir a esses agrotóxicos uma atividade aneugênica, certificada pela presença de células com cromossomos aderentes, perdas cromossômicas e C-metáfases, inferindo ações relacionadas a interferência desses químicos na polimerização dos fusos mitóticos (Leme e Marin-Morales, 2009).

Tabela 3. Alterações observadas em células de *A. cepa* expostas a amostras de solos contaminados com os herbicidas Flumioxazin e Imazetapir

Amostragem 1	BN	AD	Perda	Ponte	CM	T.C.
Flumioxazin	0	15	10	0	15	6000
Imazetapir	2	15	5	0	14	6000
Ima + Flumio	1	18	14	1	17	6000
Amostragem 2	BN	AD	Perda	Ponte	CM	
Flumioxazin	0	29	17	2	24	6000
Imazetapir	0	9	12	0	38	6000
Ima + Flumio	5	22	18	0	16	6000

Amostragem 1: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, antes da terceira aplicação do mesmo herbicida; Amostragem 2: solos coletados em áreas de plantio de soja, que recebem aplicação dos herbicidas Flumioxazin e Imazetapir, isolados e em mistura, por dois anos consecutivos, após a terceira aplicação do mesmo herbicida; BN: Broto nuclear; AD: Aderência cromossômica; CM: C-Metáfases; T.C: Total de células analisadas.

Os resultados deste estudo indicam que, mesmo após um ano de repouso do solo (amostragem 1), o efeito tóxico persiste, tanto para o herbicida flumioxazin como imazetapir, aplicados de maneira isolada ou em mistura. Este fenômeno sugere a ausência de degradação significativa dos agrotóxicos ao longo desse período. Além disso, observa-se um efeito potencializador de toxicidade, quando ambos os produtos são empregados simultaneamente, como pode ser visto nos ensaios de IG.

As características químicas do solo, como pH, umidade, teor de matéria orgânica, bem textura e granulação, podem desempenhar um papel significativo na persistência e degradação dos herbicidas no ambiente edáfico (Alister & Kolgan, 2004; Alloway *et al.*, 2013). De acordo com Alister e Kogan (2005) e Mazzeo *et al.* (2015), solos argilosos apresentam estrutura física que favorece a

retenção prolongada de compostos químicos entre suas partículas, resultando em uma maior persistência dos agrotóxicos aplicados nesse tipo de solo.

De acordo com Goetz *et al.* (1990), o herbicida imazetapir apresenta a capacidade de persistir no solo por um período variável entre 60 e 360 dias, apresentando assim um potencial de contaminação para sistemas de culturas rotativas. Estudos de degradação do flumioxazin, realizados por Chen *et al.*, (2021), constataram uma faixa de degradação deste herbicida compreendida entre 8 e 50 dias. Entretanto, esse tempo pode ser influenciado por diversas características do solo, tais como umidade, atividade microbiana, teor de matéria orgânica e pH.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que as amostras de solo contaminadas com os herbicidas Flumioxazin e Imazetapir causaram efeitos fitotóxicos e citogenotóxico em *L. sativa* e *A. cepa*, respectivamente. Esses herbicidas, tanto isolados como em misturas, ocasionaram efeitos adversos no desenvolvimento radicular, interferem na divisão celular e induzem alterações cromossômicas.

A verificação de efeitos tóxicos, após um ano da aplicação do produto, mostra que estes herbicidas podem conferir sérios problemas ao ambiente e eventualmente à saúde humana.

6 REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; OLIVEIRA, D. J. A. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 133, p. 366–372, 2016.
2. ALISTER, C.; KOGAN, M. Efficacy of imidazolinone herbicides applied to imidazolinone-resistant maize and their carryover effect on rotational crops. *Crop Protection*, v. 24, p. 375–379, 2005.
3. Alloway, B. J. Sources of heavy metals and metalloids in soils. *Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*, p. 11–50, 2013.
4. ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, v. 52, p. 799–804, 2003.
5. BRAGA, A. *et al.* Cemeteries as a source of environmental contamination: phytogenotoxicity of the biogenic amines cadaverine and putrescine. 2023.
6. CHEN, Y. *et al.* Persistence, mobility, and leaching risk of flumioxazin in four Chinese soils. *Journal of Soils and Sediments*, v. 21, p. 1743–1754, 2021.

7. CHHOKAR, R.S. *et al.* Flumioxazin and Flufenacet as possible options for the control of multiple herbicide-resistant littleseed canarygrass (*Phalaris minor* Retz.) in wheat. *Weeds – Journal of Asian-Pacific Weed Science Society*, v. 1, 2019.
8. Companhia Nacional de Abastecimento. Conab atualiza a estimativa da safra de grãos 2023/2024, que deve chegar a 316,7 milhões de toneladas. CONAB, 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5258-conab-atualiza-a-estimativa-da-safra-de-graos-2023-2024-que-deve-chegar-a-316-7-milhoes-de-toneladas>. Acesso em 02 de fevereiro de 2024.
9. DUGGLEBY, R. G.; MCCOURT, J. A.; GUDDAT, L. W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008.
10. EL-NAHAS, A. I. Mutagenic Potential of Imazethapyr Herbicide (Pursuit*) on *Vicia faba* in the Presence of Urea Fertilizer. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 3, p. 900-906, 2020.
11. ESPEN, L.; PIROVANO, L.; COCUCCHI, S. M. Environmental and Experimental Botany Effects of Ni 2 + during the early phases of radish (*Raphanus sativus*) seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, v. 38, p. 187-197, 1997.
12. GOETZ, A. J.; LAVY, T. L.; GBUR, E. E. Degradation and Field Persistence of Imazethapyr. *Weed Science*, v. 38, n. 4–5, p. 421–428, 1990.
13. GONÇALVES, M. DE M. C. *et al.* Phytotoxicity and cytogenotoxicity of composted tannery sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 27, p. 34495–34502, 1 set. 2020.
14. HORVATH, D.P.; CLAY, S.A.; SWANTON, C.J.; ANDERSON, J.V.; CHAO, W. S. Weed-induced crop yield loss: a new paradigm and new challenges. *Trends in Plant Science*, v. 28, v. 5, 2023.
15. HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 13, p. 66-74, 2010.
16. IWASHITA, K. *et al.* Flumioxazin, a PPO inhibitor: A weight-of-evidence consideration of its mode of action as a developmental toxicant in the rat and its relevance to humans. *Toxicology*, v. 472, 2022.
17. LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, v. 682, p. 71-81, 2009.
18. LIMAN, R.; CIĞERCI, I. H.; ÖZTÜRK, N. S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 118, p. 38–42, 2015.
19. MAGDALENO, A. *et al.* Phytotoxicity and genotoxicity assessment of imazethapyr herbicide using a battery of bioassays. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 19194–19202, 2015.
20. MATOS, L. A. *et al.* The influence of heavy metals on toxicogenetic damage in a Brazilian tropical river. *Chemosphere*, v. 185, p. 852–859, 2017.
21. MAZZEI, J. R. F. *et al.* Comparative study of pesticide concentrations in soil from conventional, organic and sustainable tomato growing methods. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, p. 22981–23000, 2021.

22. MELO, C. A. D. *et al.* Effectiveness of reduced doses of flumioxazin herbicide at weed control in direct sow onions. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, v. 13, p. 71–80, 2019.
23. OECD. OECD guidelines for testing of chemicals: guideline 208, terrestrial plants,
24. PARVAN, L. G. *et al.* Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazin. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 11, 2020.
25. PERTILE, M. *et al.* Responses of soil microbial biomass and enzyme activity to herbicides imazethapyr and flumioxazin. *Scientific Reports*, v. 10, 2020.
26. SHARMA, A. *et al.* Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. *Ecotoxicology and Environmental*, v. 201, 2020.
27. SINGH CHHOKAR, R. *et al.* Flumioxazin and Flufenacet as possible options for the control of multiple herbicide-resistant littleseed canarygrass (*Phalaris minor* Retz.) in wheat. *Weeds-Journal of Asian-Pacific Weed Science Society*, v. 1, p. 46-62, 2019.
28. SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: G. Castillo (ed.) *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Canadá: IDRC/IMTA, p. 71-79. 2004.
29. SYAFRUDIN, M. *et al.* Pesticides in drinking water-a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v.18, p. 1-15, 2021.
30. TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. *Amino Acids*, v. 30, p. 195-204, 2006.
31. TIQUIA, S. M.; TAMA, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. EFFECTS OF COMPOSTING ON PHYTOTOXICITY OF SPENT PIG-MANURE SAWDUST LITTER. *Environmental Pollution*, v. 93, n. 3, p. 249–256, 1996.
32. U.S. Department of Agriculture. Soybeans. USDA, 2023. Disponível em: <https://fas.usda.gov/data/commodities/soybeans>. Acesso em 02 de fevereiro de 2024.
33. U.S.E.PA. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA 712-C-96-154. april 1996.
34. VASCONCELOS M. C. C. *et al.* Interferência de Plantas Daninhas sobre Plantas Cultivadas. *Agropecuária científica no semiárido*, v. 8, p. 01-06, 2012.
35. ZUCCONI, F., DE BERTOLD, M. Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste. In: de BERTOLDI, M., FERRANTI, M.P., L'HERMITE,
36. P.L., ZUCCONI, F. (Eds.), *Compost: Production, Quality and Use*. Elsevier, London, UK, p. 30–50.1987

Toxicidade da mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazina, avaliada por diferentes ensaios ecotoxicológicos

Matheus de Moraes Cunha Gonçalves, Letícia Rosa de Souza, Sergio Luiz Prolo Júnior, Maria Aparecida Marin-Morales

Resumo

O setor agrícola é vital para alimentar a crescente população mundial, estima-se que a até 2050 a produção de alimentos deverá aumentar em torno de 110%. O uso de agrotóxicos é uma ferramenta essencial para o controle de pragas nas lavouras garantindo uma alta produtividade. Com o surgimento resistência a pesticidas a utilização da mistura de produtos buscando uma combinação sinérgica torna-se cada vez mais necessária para um controle eficaz. Em torno de 3 bilhões de toneladas de pesticidas são utilizados anualmente em todo o mundo, porém menos de 1% de todo o produto atingem organismos alvos, todo o restante é disperso em todo meio ambiente, prejudicando o ar, o solo, água e organismos. Bioindicadores são utilizados para compreender a toxicidade causada por agrotóxicos a organismos não-alvos. As espécies vegetais, *Lactuca sativa* e *Allium cepa*, e o invertebrados *Folsomia candida* são excelentes organismos para estimar os efeitos tóxicos causados por produtos no meio ambiente. O estudo teve como objetivos avaliar a toxicidade de diferentes concentrações de dois herbicidas utilizados em mistura através de diferentes ensaios ecotoxicológicos. Os resultados mostraram que todas as concentrações testadas foram fitotóxicos para *L. sativa* e citogenotóxicas para *A. cepa*, por outro lado, nenhum dos tratamentos testados afetou a atividade da espécie *F. candida*. De acordo com os dados analisados, possivelmente existe uma interação sinérgica entre os produtos testados.

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é um setor fundamental à sobrevivência humana, que envolve cultivo de plantas economicamente importantes para a produção de itens básicos, como alimentos, rações, fibras, entre outros (Pedroso *et al.*, 2022). Atualmente, a população global é composta por 7 bilhões de pessoas, com aumento estimado para 10 bilhões, até 2050. Para o suprimento alimentar desta população futura será necessário um aumento da produção agrícola, na ordem 60 a 110% (Rajak *et al.*, 2023). Dentre os desafios para aumentar essa produção, estão, o melhor gerenciamento no controle das pragas agrícolas e o desenvolvimento de produtos agrícolas mais sustentáveis e seguros para o ambiental e para a saúde humana.

Os agrotóxicos são substâncias químicas, de origem biológica ou mineral, amplamente utilizadas no controle de pragas, tanto de lavouras, como de ambientes urbanos (Langley e Mort, 2012; Mostafalou e Abdollahi, 2017; Marins

et al., 2021). Esses compostos pertencem a diferentes famílias químicas, sendo classificados, de acordo com o tipo de praga que combate, em herbicida, inseticida, fungicida, rodenticida, acaricida, moluscicida, dentre outros (Pedroso

Anualmente, são aplicados em torno de 3 bilhões de toneladas de agrotóxicos em todo o mundo, o que representa um custo, aproximado, de 40 bilhões de dólares (Sharma *et al.*, 2019). Embora a aplicação desses compostos seja importante para garantir boa produtividade agrícola, eles podem ocasionar impactos negativos no meio ambiente, à biodiversidade e à saúde pública (Pedroso *et al.*, 2022).

Dentre a grande variedade de agrotóxicos existentes, os herbicidas são os mais utilizados, correspondendo a cerca de 47,5% dos agrotóxicos aplicados no mundo. (Syafrudin *et al.*, 2021). Esses compostos podem ser aplicados tanto de forma isolada, como também em misturas de diferentes princípios ativos. Ndikuryayo & Yang (2023) destacam que os herbicidas são compostos importante no controle de ervas daninhas, sendo uma prática comum na agricultura moderna. Contudo, de acordo com os mesmos autores, corroborado por Diggle *et al.* (2003), seu uso continuado pode desencadear reações adversas ao meio ambiente e à saúde humana, bem como selecionar plantas daninhas resistentes, aumentando ainda mais os seus riscos ambientais. A utilização de misturas de dois ou mais agrotóxicos pode resultar interações entre eles, do tipo sinérgicas, aditivas ou antagônicas, cujas toxicidades podem ser maiores, iguais ou menores que a ação dos compostos aplicados de forma isolada (Ndikuryayo e Yang, 2023).

Estima-se que apenas 1% dos agrotóxicos aplicados atinjam os seus alvos, o restante é disperso no meio ambiente, contaminando o ar, o solo, água e consequentemente os organismos não-alvo, incluindo nestes o próprio ser humano (Alehashem *et al.*, 2024; Maritano *et al.*, 2022). A utilização desses compostos pode induzir citototoxicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade, alterações hormonais, comportamentais, estrogênicas, em organismos não alvos, tanto de forma aguda como crônica (VoPham *et al.*, 2017; Kapeleka *et al.*, 2019). Os agrotóxicos podem gerar radicais livres e, consequentemente, estresse oxidativo, que causam danos ao material genético, como quebras da

fita de DNA, alterações cromossômicas e formação de adutos de DNA (Barrón Cuenca *et al.*, 2019; Marcelino, Wachtel e Ghisi, 2019).

Muitos pesquisadores têm buscado informações sobre a toxicidade dos herbicidas para organismos não-alvo e as consequências ambientais desta toxicidade. As espécies vegetais *L. sativa* e *A. cepa* são consideradas modelos biológicos de excelência, usadas para avaliar toxicidade de compostos químicos, de misturas complexas e de amostras de ambientes impactados. Essas duas espécies são bons bioindicadores de fitotoxicidade e citogenotoxicidade, respectivamente, que têm como vantagem serem testes de fácil e rápida execução, confiáveis, de baixo custo e de alta repetibilidade (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Além das espécies vegetais, os invertebrados terrestres também desempenham um papel crucial na avaliação ecotoxicológica de sistemas edáficos. Os colêmbolos (*Folsomia candida*) são considerados excelentes bioindicadores da qualidade do solo, por responderem, eficazmente, a uma variedade de fatores ambientais, o que permite que eles sejam indicados (e muito utilizados em avaliação de riscos ambientais (Parisi *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2006; Bartz, Pasini e Brown, 2013). Os testes de reprodução e fuga, realizados com *F. candida* são padronizados pela International Organization for Standardization (ISO 11267:2014 e ISO 17512-2:2011, respectivamente) (Luz *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2014).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de diferentes concentrações de dois herbicidas utilizados em mistura. Para essa análise realizamos diferentes testes ecotoxicológicos, realizados com biomarcadores vegetais e animal, para estimar possíveis danos ambientais que esses compostos promovem nos organismos não alvos e, conseqüentemente, no ambiente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo das diluições do herbicida

No presente estudo, foi utilizada uma formulação comercial, composta de dois herbicidas: o imazetapir (85 g i.a/L) e flumioxazin (40 g i.a/L). Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos, foram preparadas cinco diferentes concentrações do produto comercial, como segue: uma solução de 4 ml do

herbicida/L de água (4 mL/L), conforme proposto para uso em campo pelo fabricante; duas concentrações abaixo desta concentração (2 mL/L e 3 mL/L) e duas acima dela (5 mL/L e 6 mL/L).

2.2 Preparo das mostras de solo e capacidade de retenção de água no solo (WHC)

Foram coletados solos no Jardim Experimental da Universidade Estadual Paulista- UNESP (Rio Claro/SP – Brasil) (Lat: 22° 23' 47", Long: 47° 32' 39") amostras de solo (latossolo), que foram usados como substrato para os experimentos com os bioindicadores *L. sativa*, *A. cepa* e *F. candida*. O cálculo da capacidade máxima de retenção de água no solo (Water Holding Capacity – WHC), seguiu o protocolo descrito por Mazzeo *et al.* (2015), para o mesmo solo. O WHC foi calculado pela porcentagem de massa seca. Nos testes realizados, o WHC foi estabelecido em 70% para as espécies *L. sativa* e *A. cepa* e 45% para *F. candida* (Braga *et al.*, 2023).

2.3 Aplicação do herbicida no solo

Para calcular o volume de herbicida a ser aplicado no solo, primeiramente foi determinado a massa do solo em 1 ha. Para o cálculo da massa de solo, foi considerada a profundidade que o solo foi coletado (0,10 m) e a densidade do solo de 1.040 kg m⁻³ cm (Reis *et al.*, 2019). Com base nestes parâmetros, foram aplicados 96 µl das soluções preparadas/1kg de solo. A mistura foi, em seguida, homogeneizada com um auxílio de uma espátula.

2.4 Montagem dos experimentos

Os experimentos foram conduzidos em delineamentos inteiramente casualizados (DIC), no Laboratório de Mutagênese Ambiental, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Rio Claro/SP. Os ensaios foram realizados com cinco concentrações do herbicida (2 mL/L, 3 mL/L, 4 mL/L, 5 mL/L, 6 mL/L), conforme citado no item 6.1., e controle ambiental (solo não contaminado). Os controles, negativo (CN) e positivo (CP), foram realizados conforme os protocolos estabelecidos para cada bioindicador utilizado.

2.5 Ensaio de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*

As sementes de *L. sativa* foram submetidas a germinação em placas de Petri individuais (20 sementes por placa), contendo: 20 g de solos contaminados (tratamentos com 2, 3, 4, 5, e 6 mL/L do herbicida); 20 g de solo controle ambiental (mesmo solo sem contaminação - CA); 5 ml de água de osmose reversa para o CN; e 5 ml de sulfato de zinco heptahidratado (0,05 M), para o CP (Lopes, 2014). O ensaio, em quintuplicata, foi realizado em estufa BOD, sem fotoperíodo, a 22 °C, com exposição por 120 horas. Após o período de exposição, foram calculados os percentuais de Germinação (%), Crescimento Radicular (%) e Índice de Germinação (%), de acordo com protocolo usado por Tiquia *et al.* (1996).

2.6 Ensaio de citogenotoxicidade com *Allium cepa*

Sementes de *A. cepa* (variedade Baia Periforme) foram submetidas à germinação em placas de Petri individuais (100 sementes/placa), contendo 20 g de solos contaminados (tratamentos com 2, 3, 4, 5, e 6 mL/L do herbicida); 20 g de solo controle ambiental (mesmo solo sem contaminação - CA); 5 ml de água de osmose reversa para o CN; 5 ml de de metilmetano sulfonato (10 mg/L de MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3) e 5 mL do herbicida Trifluralina (0,84 mg/L) para os CP. O ensaio, em triplicata, foi realizado em estufa BOD, com fotoperíodo de 12h, a 21 °C, por um tempo de exposição de 120 horas.

Após a germinação, as radículas com cerca de 2,0 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em Carnoy (álcool: ácido acético: - 3:1 – v/v), por 6 a 8 horas, em temperatura ambiente. Passado esse período, o fixador foi substituído por um fixador recém preparado e as raízes armazenadas a 4 °C, até a sua sutilização no preparo das lâminas. Para a confecção das lâminas, foram utilizadas a região meristemática das raízes fixadas, seguindo o protocolo descrito por (Leme e Marin-Morales, 2009).

A citotoxicidade do herbicida foi avaliada pelo ensaio do índice mitótico (alterações nas fases do ciclo celular) e de genotoxicidade, pelo ensaio de alterações cromossômicas (presença de alterações como perda, ponte, atraso e aderência cromossômica, metáfase poliplóide e C-metáfases). A análise de todos esses parâmetros foi realizada, em microscópio de luz, pela contagem de

6.000 células/tratamento, sendo 2 lâminas/réplica (6 lâminas/tratamento) e cerca de 1000 células/lâmina.

2.7 Bioensaio de reprodução com *Folsomia candida*

Espécimes de *F. candida* foram obtidos de culturas sincronizadas, mantidas no Laboratório de Mutagênese Ambiental da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Rio Claro/SP. Os indivíduos foram mantidos em potes de plástico, com perfurações nas tampas, para que houvesse trocas gasosas entre o ambiente e a cultura. Como substrato foi utilizado uma mistura de gesso com carvão ativado, na proporção de 10:1, respectivamente. Os organismos foram mantidos em estufa BOD à 20 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12h, e alimentados com fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*), duas vezes por semana. A umidade dos substratos da cultura foi mantida, adicionando água de osmose reversa (Braga *et al.*, 2023).

A realização do teste de reprodução com *F. candida* seguiu o protocolo descritos na norma ISO 11267 (2014). Foram utilizados recipientes de vidro (4 cm de diâmetro e 7 cm de altura). Os ensaios foram realizados em quintuplicata, onde cada réplica recebeu 30 g de solo contaminado com as diluições do herbicida (2 mL; 3. mL, 4 mL, 5 mL, 6 mL). O CN foi desenvolvido com 30 g do mesmo solo de referência usado no preparo dos tratamentos do herbicida.

Em cada recipiente foram colocados 10 colêmbolos, com idade entre 10 a 12 dias, e 2 mg de fermento biológico. Semanalmente, os recipientes foram abertos para correção da umidade e reforço das trocas gasosas. A cultura foi alimentada, novamente, após 14 dias do início do experimento. O teste teve duração de 28 dias e, no final deste período, cada réplica foi transferida, individualmente, para um recipiente com água, onde os indivíduos flutuaram. Foi misturada na água com corante azul, para facilitar a visualização dos colêmbolos. Em seguida, cada réplica foi fotografada, para a contabilização dos indivíduos, que foi feita com o auxílio do software ImageJ (Braga *et al.*, 2023).

2.8 Análise estatística

As análises dos resultados dos ensaios ecotoxicológicos foram realizadas com o auxílio do software R 4.2.1 (R Core Team, 2023). Primeiramente, foram

realizados testes de homogeneidade (Bartlett test) e normalidade (Shapiro-wilk test). Os dados que apresentaram distribuição normal e homogênea foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de média Dunnet, enquanto os dados sem distribuição normal e homogênea foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Todas as avaliações foram feitas ao nível de probabilidade de 5% (Aguiar, Andrade-Vieira e Oliveira 2016; Gonçalves, de *et al.*, 2020).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de fitotoxicidade com *L. sativa*

Os dados do ensaio de fitotoxicidade com *L. sativa* estão apresentados na Tabela 4. Para verificar a toxicidade foram avaliados três parâmetros: a Germinação de Sementes (%), Crescimento Radicular (%) e o Índice de Germinação (IG%). Os testes de germinação de sementes e de desenvolvimento da radícula são comumente indicados, por agências governamentais, como método de avaliação da contaminação ambiental (Mendes *et al.*, 2021). A espécie *L. sativa* é um dos vegetais mais usados como bioindicador de toxicidade ambiental, por apresentar alta sensibilidade a compostos tóxicos, facilidade de aquisição durante o ano todo, fácil manuseio e baixo custo (Silva e Mattiolo, 2011). Esses parâmetros são muito usados em avaliações de toxicidade de agrotóxicos, (Piotrowicz-Cieślak, Adomas e Michalczyk, 2009; Vieira, Marcon e Droste, 2024).

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar uma correlação direta entre a concentração do herbicida e redução da germinação de sementes (GS%), onde quanto maior a concentração, maior a redução da germinação. As concentrações de 6 ml/L e 5 ml/L reduziram a taxa de germinação em 47,1% e 36,25%, respectivamente, em comparação com o CN. Em relação ao parâmetro de crescimento radicular, foi observado que todas as concentrações testadas apresentaram efeitos significativos, em comparação com o CN. Estes resultados indicam que mesmo na concentração mais baixa (2 ml/L), que representa metade da concentração indicada para o campo (4 ml/L), foi observado efeitos tóxicos para as raízes de *L. sativa*. Foi observado que, à

medida que a concentração do herbicida aumenta, fica mais evidente a toxicidade de produto, pois diminui, proporcionalmente, o tamanho das raízes.

O imazetapir tem como modo de ação a inibição da enzima acetohidroxiácido sintetase, que é crucial para síntese de material genético e, consequentemente do para o crescimento vegetal. Zhou *et al.* (2009) constataram, em milho, que o imazetapir causou fitotoxicidade, danificando as raízes das plantas. Os autores observaram efeitos como clorose das folhas, redução no crescimento das plantas e putrescência nas pontas das raízes. Em outro estudo, Magdaleno *et al.* (2015) observaram que o herbicida imazetapir, na formulação recomendada pelo fabricante, foi altamente tóxico para algas verdes (organismo não-alvo), além de apresentar efeitos inibitórios para o crescimento radicular de *L. sativa*.

Estudos de crescimento de plântulas de videira (*Vitis vinifera* L.), realizados por Saladin *et al.* (2003), constataram que o flumioxazin penetra na planta por meio das raízes, induzindo estresse químico; danos celulares, como alterações na membrana; inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox), que prejudica a fotossíntese e, consequentemente, o desenvolvimento da planta.

Em relação ao Índice de Germinação (IG%), todas as concentrações testadas foram estatisticamente diferentes do CN. De acordo com os valores do IG, as concentrações 2 ml/L, 3 ml/L e 4 ml/L foram consideradas como componentes tóxicos para o solo, a concentração de 5 ml/L muito tóxica, e a de 6 ml/L extremamente tóxica, para este compartimento ambiental (Gonçalves *et al.*, 2020). Produtos que apresentam IG (%) menores do que 60% não podem ser aplicados, com segurança, no ambiente (Gonçalves *et al.*, 2020; Zucconi e Bertoldi, 1987). Os resultados do presente estudo indicaram que os herbicidas podem resultar em graves efeitos tóxicos para organismos não-alvos.

Tabela 4. Resultados dos testes de Germinação, Crescimento Radicular e Índice de Germinação, realizados com o bioindicador *Lactuca sativa*, cujas sementes foram expostas a solo contaminado com diferentes concentrações do herbicida comercial composto dos princípios imazetapir e flumioxazin.

Tratamentos	Germinação (%)	Crescimento Radicular (%)	Índice de Germinação (%)
CN	100±0	100±0	100±0
CA	96.79±6.42	87.73±6.21	84.84±7.28
2ml/L	94.8±8.52	70.75±13.79*	67.73±17.84*

3ml/L	92.32±6.16	69.22±7.23*	64.24±10.80*
4ml/L	90.29±7.02	67.55±10.02*	61.37±12.82*
5ml/L	63.75±5.89*	49.05±15.57*	31.85±12.94*
6ml/L	52.87±4.50*	37.46±5.99*	19.81±3.39*
CP	0±0*	0±0*	0±0*

CN: Controle negativo (água de osmose reversa); CA: Controle ambiental (Solo não contaminado); CP Controle positivo (ZnSO₄·7H₂O). *Estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo (p<0,05), de acordo com ANOVA/Dunnet.

A utilização da mistura de agrotóxicos pode resultar em danos ambientais inesperados. Os resultados deste estudo ressaltam a necessidade de investigações ecotoxicológicas mais abrangentes e com mais agrotóxicos liberados para uso agrícola, para que se possa compreender melhor os danos que esses produtos podem causar no ambiente. Pertile *et al.* (2022) investigaram o impacto dos herbicidas imazetapir e flumioxazin, isolados e em mistura, sob a rizosfera de soja. Os resultados indicaram que a mistura desses herbicidas desencadeou um efeito mais prejudicial, para o crescimento das plantas de soja, do que os herbicidas usados em separado. Essa observação sugere um provável efeito sinérgico entre os princípios ativos desses dois herbicidas.

3.2 Ensaio de alterações cromossômicas com *Allium cepa*

Para a avaliação de danos celulares induzidos por diferentes concentrações da formulação do herbicida aqui estudado, foram realizados ensaios do Índice Mitótico (IM) e de Alterações Cromossômicas (AC). A avaliação do IM (Figura 5) mostrou que todas as concentrações testadas afetaram a divisão celular de *A. cepa* de forma dose dependente, onde o aumento da concentração do herbicida testado diminuiu o número de células em divisão. Esses resultados corroboram os resultados dos testes de fitotoxicidade, realizados com o bioindicador *L. sativa* (maior toxicidade para a maior concentração testadas). Por esses ensaios, foi possível inferir que todas as concentrações testadas do herbicida foram potencialmente fitotóxicas, bem como citotóxicas, pois interferiram no desenvolvimento das raízes em alface, e no ciclo de celular de cebola.

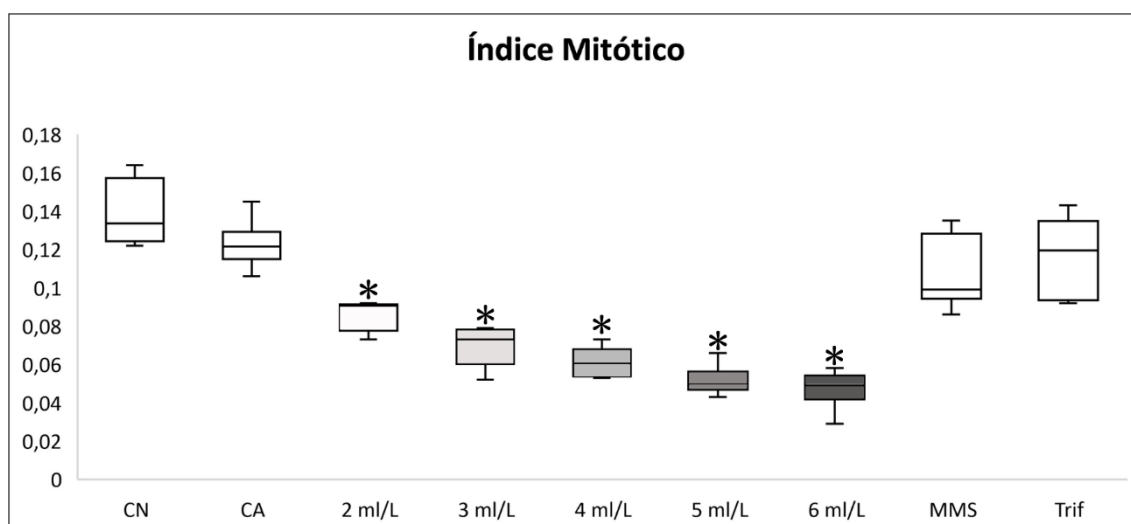


Figura 5. Avaliação do Índice Mitótico de células de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do herbicida comercial composto dos princípios imazetapir e flumioxazin; CN: Controle negativo (água de osmose reversa); CA: Controle ambiental *mesmo solo dos tratamentos, porém sem contaminação). *Estatisticamente significativo, em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

Os ensaios de AC, utilizados para avaliar a toxicidade de agrotóxicos, já são bem difundidos na literatura. Estudos de toxicidade realizados por Sharma e Vig (2012), com quatro diferentes herbicidas (Atrazine, Avenoxan, Diuron e Quizalofop-P-ethyl), mostraram um maior decréscimo do IM, para as maiores concentrações testadas.

Rad, *et al.* (2011) avaliaram os efeitos de diferentes concentrações do herbicida imazetapir em células de trigo (*Triticum durum*). Os autores constataram que todos os tratamentos causaram danos citotóxicos às células somáticas, bloqueando a mitose e interrompendo o ciclo celular, no estágio de prometáfase. Magdaleno *et al.* (2015) e Liman *et al.* (2015) também observaram danos no ciclo mitótico em células de cebola expostas a diferentes concentrações de imazetapir. De acordo com os mesmos autores, a molécula do imazetapir bloqueia a síntese dos aminoácidos valina, leucila e isoleucina. A deficiência destes aminoácidos pode causar diminuição da síntese proteica e, consequentemente, desaceleração da taxa de divisão, levando a morte celular. Em outro estudo, Parvan *et al.* (2020) observaram que a exposição das células de *A. cepa* à concentração de campo do pesticida flumioxazin ocasionou danos citotóxicos às células, prejudicando o progresso do ciclo de divisão.

Os resultados dos ensaios de genotoxicidade, realizados com o herbicida comercial usado no presente estudo, estão apresentados nas figuras 6 e 7. Neste estudo, foi possível observar que todas as concentrações testadas induziram um número significativo alterações cromossômicas, em relação ao CN (Figura 6). A Tabela 2 apresenta a descrição das alterações cromossômicas observadas nas células meristemáticas de *A. cepa*. As alterações mais frequentes foram poliploidia, interfases lubuladas, brotos nucleares, aderências, pontes e perda cromossômicas e C-metáfases (Figura 7).

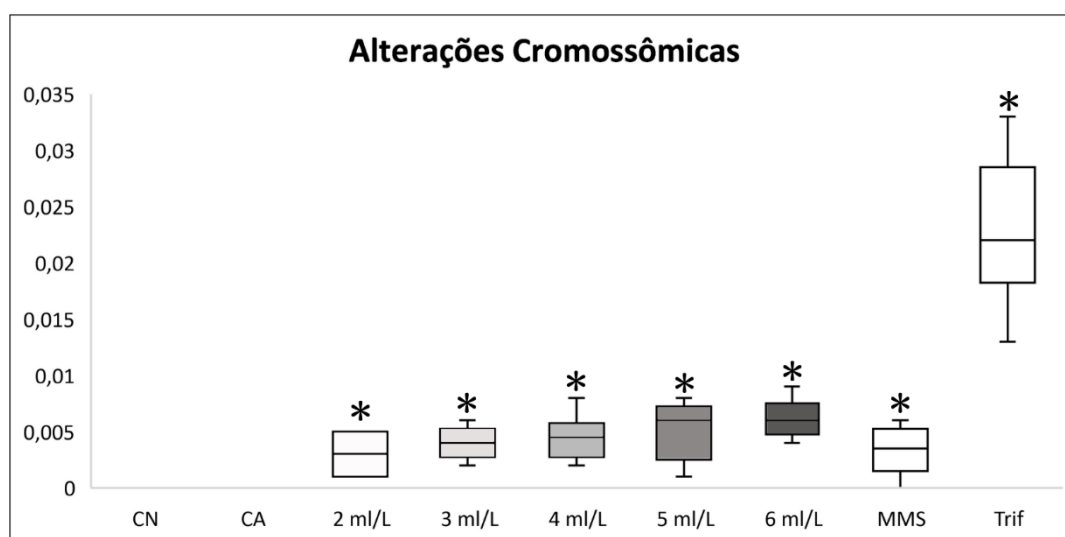


Figura 6. Avaliação das alterações cromossômicas de células de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações do herbicida testado (mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazin); CN: Controle negativo; CA: Controle ambiental. *Estatisticamente significativo em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), de acordo com o teste de Kruskal-Wallis/Dunn.

Tabela 5. Alterações registradas em células de *A. cepa* expostas ao herbicida comercial avaliado (mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazin).

Tratamentos	Poliploidia	IL	BN	AD	Perda cromossômica	Ponte cromossômica	CM	T.C.
2 ml/L	2	3	2	5	3	0	6	6000
3 ml/L	3	2	3	5	6	1	6	6000
4 ml/L	4	3	4	5	5	1	8	6000
5 ml/L	4	4	5	9	3	1	9	6000
6 ml/L	5	4	8	7	7	2	8	6000

IL: Interfase lobulada; BN: Broto nuclear; AD: Aderência cromossômica; CM: C-Metáfases; T.C: Total de células analisadas

Alguns estudos relataram danos no material genético provocados tanto pelo herbicida imazetapir, quanto pelo flumioxazin. Magdaleno *et al.* (2015) observaram que o imazetapir, mesmo em concentrações baixas (0.01, 0.1 e 1 mg a.i./L), foi capaz de induzir alterações cromossômicas em células de *A. cepa*. De acordo com os autores, as alterações encontradas com maior frequência foram quebras, pontes e perdas cromossômicas. Rad *et al.* (2011) observaram em, células de trigo, que todas as concentrações testadas de imazetapir (0.5, 0.89, 1.58, 2.81 e 5 ppm) induziram danos no material genético, resultando em perdas de cromossomos, C-metáfases e pontes cromossômicas. Parvan *et al.* (2020) avaliaram duas concentrações de flumioxazin (0.5 g/L e 1 g/L), onde os resultados indicaram que ambos os tratamentos provocaram alterações cromossômicas nas células de cebola. De acordo com as alterações encontradas neste estudo (Tabela 5), a mistura de herbicidas induziu danos aneugênicos às células expostas, resultados estes corroborados pelos autores anteriormente citado. Fernandes *et al.* (2009) e Leme & Marin-Morales (2009) destacam que, alterações cromossômicas como aderência, perdas cromossômicas, células poliploides e C-metáfases são indicativas de alterações aneugênicas. Os resultados do presente estudo corroboram as afirmações de outros autores de efeito aneugênico dos herbicidas (Figura 7) utilizados na formulação do produto comercial, o que também sugere uma possível interação sinérgica ou aditiva entre os princípios ativos presente no produto comercial. Também foi possível observar uma toxicidade dose depende do produto comercial, pois à medida que se aumenta a concentração deste composto, aumenta também a toxicidade do herbicida testado.

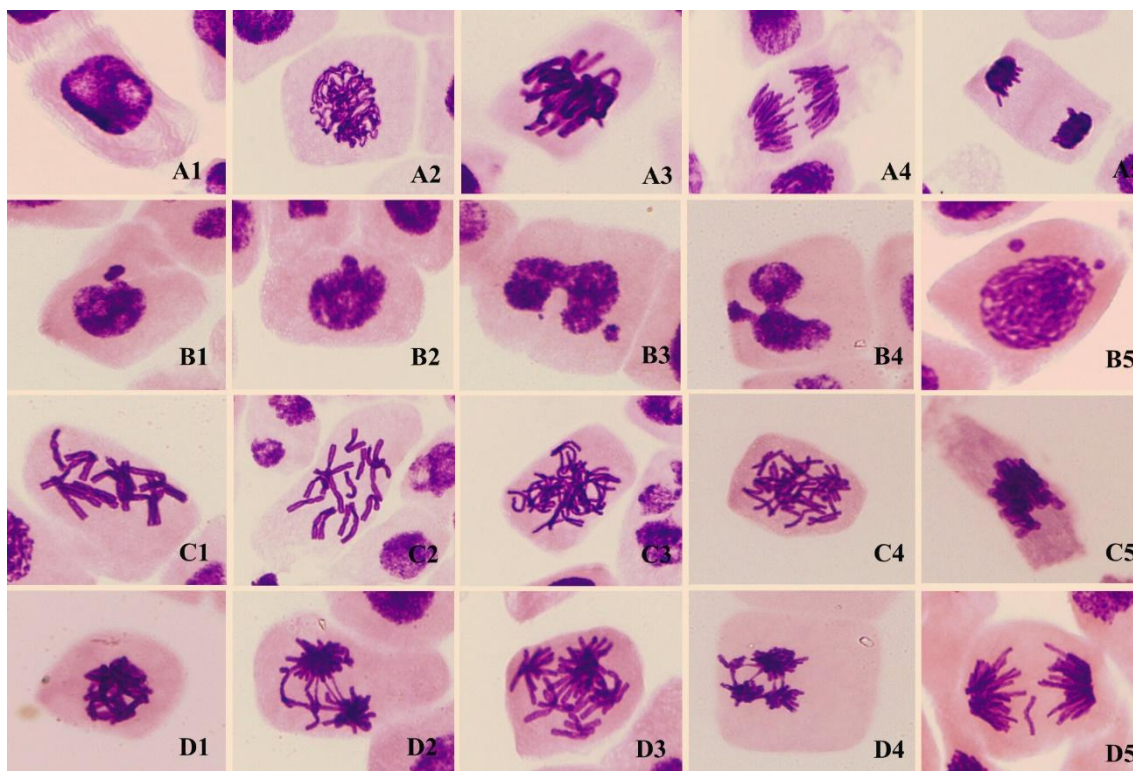


Figura 7. Alterações Cromossômicas encontradas em células de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações da mistura dos herbicidas. A1: Interfase normal; A2: Prófase normal; A3: Metáfase normal; A4: Anáfase normal; A5: Telófase normal. B1, B2: Interfase com broto nuclear; B3 e B4: Interfase lobulada. B5: Prófase com micronúcleo. C1 e C2: C-Metáfase; C3 e C4: Metáfase Poliploide; C5 e D1: Metáfase com aderência cromossômica. D2 e D5: Anáfase com cromossomos perdidos. D3 e D4: Anáfase Poliploide.

3.3 Ensaio de Reprodução com *Folsomia candida*

O ensaio ecotoxicológico de reprodução (Tabela 6) seguiu os critérios de validação da norma ISO 11267 (2014). O solo controle apresentou uma taxa de sobrevivência acima de 80%, com coeficiente de variação menor do que 30%. O pH das amostras ficou, durante o experimento, dentro da faixa ideal para a reprodução de *F. candida* (5.5 – 6.5). Os resultados mostraram que todas as concentrações testadas da mistura dos herbicidas apresentaram taxa de sobrevivência acima de 80%, indicando que o produto não apresentou toxicidade para os indivíduos adultos.

Tabela 6. Sobrevivência de adultos e reprodução de *F. candida* exposta a solo contaminado com diferentes concentrações do herbicida comercial, composto da mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazin.

Tratamentos	Teste de Reprodução com <i>F. candida</i>			
	<i>Folsomia candida</i>		pH	
	Número de adultos	Número de juvenis	Inicial	Final
Controle	9.8±0.44	739.8±39.79	6.38	6.3

2 ml/L	9.6±0.54	734.6±134.94	6.3	6.33
3 ml/L	9.4±0.89	744.6±41.72	6.23	6.3
4 ml/L	9.4±0.89	751.6±102.82	6.06	6.08
5 ml/L	9.6±0.54	763.4±107.66	6.04	6.05
6 ml/L	9.4±0.89	653.6±114.73	6.03	5.9

Não houve diferenças significativas ($p < 0.05$) de acordo com ANOVA/Dunnet.

A avaliação da toxicidade crônica de *F. candida*, expostas a diferentes concentrações dos herbicidas, mostrou que nenhum dos tratamentos testados afetou o número de juvenis, pois não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre os dados dos tratamentos, em relação ao CN (Tabela 3). De acordo com Greenslade *et al.* (2010), doses recomendadas de herbicidas para utilização em campo não afetam a comunidade de colêmbolos. Em outro estudo, Santos *et al.* (2012) realizaram testes de fuga e de reprodução com colêmbolos expostos aos inseticidas clorpirifós, endosulfan e glifosato. Os autores constataram que os inseticidas clorpirifós, endosulfan podem reduzir a sobrevivência e a capacidade de reprodução dos colêmbolos. Por outro lado, o glifosato, em sua dose de campo, não afetou o comportamento dos indivíduos.

4 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que todas as doses testadas da mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazin apresentaram tanto efeitos fitotóxicos, como danos citogenotóxicos em *L. sativa* e *A. cepa*, respectivamente. Esses resultados mostram que a mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazin pode causar danos tóxicos a organismos não-alvo, mostrando que estes herbicidas apresentam potencial risco ambiental. Provavelmente, existe uma interação sinérgica/aditiva entre os dois princípios ativos, já que à medida que as concentrações foram aumentadas, os efeitos tóxicos foram aumentando. Por outro lado, a mistura desses pesticidas parece não afetar a comunidade de *F. candida*, visto que nenhuma das concentrações testadas afetou a sobrevivência e a reprodução dessa espécie.

5 REFERÊNCIAS

1. AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; OLIVEIRA DAVID, J. A. DE. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 133, p. 366–372, 2016.

2. ALEHASHEM, M. *et al.* Herbicides and pesticides synergistically interact at low concentrations in complex mixtures. *Chemosphere*, v. 353, 2024.
3. BARRÓN CUENCA, J. *et al.* Increased levels of genotoxic damage in a Bolivian agricultural population exposed to mixtures of pesticides. *Science of the Total Environment*, v. 695, 2019.
4. BARTZ, M. L. C.; PASINI, A.; BROWN, G. G. Earthworms as soil quality indicators in Brazilian no-tillage systems. *Applied Soil Ecology*, v. 69, p. 39–48, 2013.
5. BRAGA, A. *et al.* Cemeteries as a source of environmental contamination: phytogenotoxicity of the biogenic amines cadaverine and putrescine. *Environmental Science and Pollution Research*. 2023.
6. BRITO RODRIGUES, L. DE *et al.* Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 36, n. 7, p. 1755–1763, 2017.
7. DIGGLE, A. J.; NEVE, P. B.; SMITHÀ, F. P. Herbicides used in combination can reduce the probability of herbicide resistance in finite weed populations. *Weed Research*, v. 43, p. 371–382, 2003.
8. FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. *Ecotoxicity and Environmental safety*, 72: 1680- 1686 2009.
9. GONÇALVES, M. M. C. *et al.* Phytotoxicity and cytogenotoxicity of composted tannery sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 27, p. 34495–34502, 2020.
10. GREENSLADE, P. J. M.; REID, I. A.; PACKER, I. J. Herbicides have negligible effects on ants and springtails in an Australian wheat field. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 7, p. 1172–1175, 2010.
11. ISO 11267. Soil quality — Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil contaminants. ISO - International Standardization Organization, 2014. 19 p. 2014
12. ISO ISO 17512-2. Soil quality: Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior. Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*). ISO - International Organization for Standardization, 2011.
13. KAPELEKA, J. A. *et al.* Biomonitoring of Acetylcholinesterase (AChE) Activity among Smallholder Horticultural Farmers Occupationally Exposed to Mixtures of Pesticides in Tanzania. *Journal of Environmental and Public Health*, v. 2019, 2019.
14. LANGLEY, R. L.; MORT, S. A. Human exposures to pesticides in the united states. *Journal of Agromedicine*, v. 17, n. 3, p. 300–315, 2012.
15. LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, v. 682, p. 71-81, 2009.
16. LIMAN, R.; CİĞERCI, I. H.; ÖZTÜRK, N. S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 118, p. 38–42, 2015.
17. MAGDALENO, A. *et al.* Phytotoxicity and genotoxicity assessment of imazethapyr herbicide using a battery of bioassays. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 23, p. 19194–19202, 2015.
18. MARCELINO, A. F.; WACHTEL, C. C.; GHISI, N. DE C. Are our farm workers in danger? Genetic damage in farmers exposed to pesticides. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 3, 2019.

19. MARINS, A. T. *et al.* A mixture of pesticides at environmental concentrations induces oxidative stress and cholinergic effects in the neotropical fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology*, v. 30, n. 1, p. 164–174, 2021.
20. MARITANO, S. *et al.* Maternal pesticides exposure in pregnancy and the risk of wheezing in infancy: A prospective cohort study. *Environment International*, v. 163, 2022.
21. MAZZEO, D.E.C. *et al.* Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. *Ecological Indicators*, v. 56, p. 60–69, 2015.
22. MENDES, P. M. *et al.* Phytotoxicity test in check: Proposition of methodology for comparison of different method adaptations usually used worldwide. *Journal of Environmental Management*, v. 291, 2021.
23. MORAIS, L.A.S.; PRADO, J. S.M. Plantas com Atividade Inseticida. *Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas*, p. 542-593, 2016.
24. MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 2017.
25. NDIKURYAYO, F.; YANG, W. C. New Insights into the Interactions between Herbicides: Trends from Recent Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023.
26. PARISI, V. *et al.* Microarthropod communities as a tool to assess soil quality and biodiversity: A new approach in Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 105, n. 1–2, p. 323–333, 2005.
27. PARVAN, L. G. *et al.* Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 11, 2020.
28. PEDROSO, T. M. A. *et al.* Cancer and occupational exposure to pesticides: a bibliometric study of the past 10 years. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 29, p. 17464–17475, 2022.
29. PERTILE, M. *et al.* Flumioxazin, imazethapyr and their mixture in the rhizosphere of soybean: effect on early nodulation and biological N fixation. *Revista Ceres*, v. 69, p. 571–577, 2022.
30. PIOTROWICZ-CIEŚLAK, A. I.; ADOMAS, B.; MICHALCZYK, D. J. Different Glyphosate Phytotoxicity of Seeds. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 19, p. 123–129, 2009.
31. RAD, M. H.; AIVAZI, A. A.; JAGANNATH, S. Cytogenetic and biochemical effects of imazethapyr in wheat (*Triticum durum*). *Turkish Journal of Biology*, v. 35, p. 663–670, 2011.
32. RAJAK, P. *et al.* Agricultural pesticides – friends or foes to biosphere? *Journal of Hazardous Materials Advances*, v. 10, 2023.
33. REIS, F. C. DOS *et al.* Respiration induced by substrate and bacteria diversity after application of diuron, hexazinone, and sulfometuron-methyl alone and in mixture. *J Environ Sci Health B*, v. 54, p. 560–568, 2019.
34. SALADIN, G.; CLÉMENT, C.; MAGNÉ, C. Stress effects of flumioxazin herbicide on grapevine (*Vitis vinifera* L.) grown in vitro. *Plant Cell Reports*, v. 21, p. 1221–1227, 2003.
35. SANTOS, M. J. G. *et al.* Pesticide application to agricultural fields: Effects on the reproduction and avoidance behaviour of *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology*, v. 21, p. 2113–2122, 2012.

36. SHARMA, A. *et al.* Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. SN Applied Sciences, 2019.
37. SHARMA, S.; VIG, A. P. Genotoxicity of Atrazine, Avenoxan, Diuron and Quizalofop-P-ethyl Herbicides using the *Allium cepa* Root Chromosomal Aberration Assay. Terrestrial and Aquatic Environmental Toxicology, v. 6, p. 90–95, 2012.
38. SILVA, J.N.; MATTIOLO, S.R. Fitotoxicidade do dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) em sementes de alface (*Lactuca sativa*). São Paulo: Centro Tecnológico da Marinha (CTMSP), 2011.
39. SOUSA, J. P. *et al.* Changes in Collembola richness and diversity along a gradient of land-use intensity: A pan European study. Pedobiologia, v. 50, p. 147–156, 2006.
40. SYAFRUDIN, M. *et al.* Pesticides in drinking water-a review. Int. J. Environ. Res. Public Health, 2021.
41. TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. Environmental Pollution, v. 93, p. 249–256, 1996.
42. VIEIRA, C.; MARCON, C.; DROSTE, A. Phytotoxic and cytogenotoxic assessment of glyphosate on *Lactuca sativa* L. Brazilian Journal of Biology, v. 84, 2024.
43. VOPHAM, T. *et al.* Pesticide exposure and liver cancer: a review. Cancer Causes and Control, v. 28, p. 177-190, 2017.
44. ZHOU, Q. *et al.* Enantioselectivity in the phytotoxicity of herbicide imazethapyr. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, n. 4, p. 1624–1631, 2009.
45. ZUCCONI, F., DE BERTOLD, M. Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste. In: de BERTOLDI, M., FERRANTI, M.P., L'HERMITE, P.L., ZUCCONI, F. (Eds.), Compost: Production, Quality and Use. Elsevier, London, UK, p. 30–50.1987.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo trouxe importantes informações sobre o risco de contaminação ambiental ocasionado pela aplicação dos herbicidas imazetapir e flumioxazin, isolados e em mistura. De acordo com os resultados obtidos nos ensaios realizados com diferentes bioindicadores, é possível concluir:

- As análises das amostras de solo com histórico de contaminação pelos herbicidas imazetapir e flumioxazin mostraram ser tóxicas para os bioindicadores *Lactuca sativa* e *Allium cepa*;
- O ensaio de fitotoxicidade com sementes de *L. sativa* mostrou que os solos contaminados pelos herbicidas, isolados e em mistura, não interferiram na germinação de sementes, porém interferiram, negativamente, no crescimento radicular. Além disso, todas as amostras avaliadas quanto à toxicidade, apresentaram valor baixos de IG, o que representa um risco de toxicidade ambiental;
- O efeito tóxico dos herbicidas foi concentração dependente, onde concentrações mais altas induziram efeitos tóxicos mais pronunciados de redução de desenvolvimento das raízes;
- Os resultados mostraram que a menor concentração utilizada (2ml/L) já alterou, significativamente, o desenvolvimento das raízes;
- As diferentes concentrações testadas também apresentaram efeitos tóxicos para as células de *A. cepa*. O ensaio de alterações cromossômicas mostrou que todos os tratamentos afetaram a divisão celular, e esse efeito ficava mais evidente com o aumento das concentrações;
- O teste de alterações cromossômicas com *A. cepa* mostrou que todas as amostras de solo contaminadas com os herbicidas (testados isoladamente ou em mistura), induziram redução do IM, que, consequentemente, prejudicou a dinâmica da divisão celular;
- Solos que coletados antes e após a terceira aplicação dos herbicidas (isolados e em mistura) apresentaram toxicidade. Esses resultados sugerem a persistência dos herbicidas no sistema edáfico;

- As associações dos dois herbicidas apresentaram efeitos tóxicos mais evidentes, o que indica um possível efeito sinérgico/aditivo entre os princípios ativos destes agrotóxicos;
- A avaliação da toxicidade de solos contaminados artificialmente, realizada em laboratório com diferentes concentrações da mistura dos dois herbicidas, mostrou fitotóxicos, para *L. sativa* e citogenotóxico, para *A. cepa*;
- Foram observados efeitos genotóxicos para todas as concentrações testadas. As alterações mais frequentes foram poliploidia, brotos nucleares, aderências, pontes e perda cromossômicas e C-metáfases
- O teste de reprodução com *Folsomia candida* mostrou que nenhum dos tratamentos testados afetou a sobrevivência e a reprodução dos indivíduos, indicando que os herbicidas isolados e em mistura não foram tóxicos para esses microartrópodes;
- Nossos resultados sugerem um potencial de risco de contaminação ambiental para a mistura dos herbicidas imazetapir e flumioxazin, visto que concentrações menores do que a indicada para uso agrícola pelo fabricante já ocasionou efeitos tóxicos.

7 REFERÊNCIAS

1. ABUBAKAR, Y. *et al.* Pesticides, history, and classification. Em: Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control, p. 29–42, 2020.
2. AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; OLIVEIRA, D. J. A. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 133, p. 366–372, 2016.
3. ALEHASHIM, M. *et al.* Herbicides and pesticides synergistically interact at low concentrations in complex mixtures. *Chemosphere*, v. 353, 2024.
4. AMAÇ, E.; LIMAN, R. Cytotoxic and genotoxic effects of clopyralid herbicide on *Allium cepa* roots. *Environ Sci Pollut Res Int.*, v. 35, 2021.
5. ALMEIDA, D. P. *et al.* Volumes de aplicação e tamanhos de gotas para aplicação do herbicida diquat no controle de *Eichhornia crassipes*. *Planta Daninha*, v. 34, p. 171–179, 1 jan. 2016.
6. ALVES, P. R. L. *et al.* Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 105, p. 65–71, 2014.
7. ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N. Overview of the Standard Methods for Soil Ecotoxicology Testing. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Org.). *Invertebrates - Experimental Models in Toxicity Screening*. 1ed. Rijeka: InTech, p. 35-56, 2016.
8. ARAGÃO, F.B. *et al.* Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 213, 2021.
9. ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, v. 52, p. 799–804, 2003.
10. ASIF FAROOQ, M. Comparative Efficacy of Different Pesticide Residue Mitigation Modules in Mango. *American Journal of Biomedical Science & Research*, v. 4, p. 214–219, 2019.
11. AYILARA, M. S. *et al.* Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, 2023.
12. BARETTA, D. *et al.* Colêmbolos (Hexapoda: Collembola) como bioindicadores de qualidade do solo em áreas com *Araucaria angustifolia*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Rio Claro, v. 32, p. 2693-2699, 2008.
13. BARTZ, M. L. C.; PASINI, A.; BROWN, G. G. Earthworms as soil quality indicators in Brazilian no-tillage systems. *Applied Soil Ecology*, v. 69, p. 39–48, 2013.
14. BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 826–833, 2011.
15. BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. *Journal of Environmental Sciences (China)*, v. 36, p. 102–111, 2015.
16. Braga, A. P. *et al.* Evaluation of the ecotoxicological effects of biogenic amines derived from cadaverous putrefaction on springtails *Folsomia candida*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2023.

17. BRITTO, F. B. *et al.* Herbicidas no alto Rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos. *Revista Ciencia Agronomica*, v. 43, n. 2, p. 390–398, 2012.
18. BUCH, A. C. *et al.* Food preference and ecotoxicological tests with millipedes in litter contaminated with mercury. *Science of the Total Environment*, v. 633, p. 1173–1182, 2018.
19. BURKE, I. C.; BELL, J. L. Plant Health Management: Herbicides. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, v.4, p. 425–440, 2014.
20. CALVIELLO, G. *et al.* DNA damage and apoptosis induction by the pesticide Mancozeb in rat cells: Involvement of the oxidative mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 211, p. 87–96, 2006.
21. CAVERZAN, A. *et al.* Defenses against ROS in crops and weeds: The effects of interference and herbicides. *International Journal of Molecular Sciences*, v.20, 2019.
22. CHARLES, J. *et al.* Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 2057–2064, 2011.
23. CHEN, Y. *et al.* Quantitative analysis of carbaryl and thiabendazole in complex matrices using excitation-emission fluorescence matrices with second-order calibration methods. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 264, 2022.
24. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Conab atualiza a estimativa da safra de grãos 2023/2024, que deve chegar a 316,7 milhões de toneladas. CONAB, 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5258-conab-atualiza-a-estimativa-da-safra-de-graos-2023-2024-que-deve-chegar-a-316-7-milhoes-de-toneladas>. Acesso em 02 de fevereiro de 2024.
25. COUTINHO, C. F. *et al.* Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Pesticidas: revistas de ecotoxicologia e meio ambiente*, v. 15, p. 65–72, 2005.
26. COX, C. Insecticide factsheet–malathion. *J. Pest. Reform*, v. 23, 10–15, 2003.
27. D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. *Quim. Nova*, v. 25, n. 6, p. 995–1002, 2002.
28. DAYAN, F. E. Current status and future prospects in herbicide discovery. *Plants*, v. 8, 2019.
29. DWIVEDI, S. A.; SONAWANE, V. K.; PANDIT, T. R. Review on the Impact of Insecticides Utilization in Crop Ecosystem: Their Prosperity and Threats, 2022.
30. DUGGLEBY, R. G.; MCCOURT, J. A.; GUDDAT, L. W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2008.
31. ECOBICHON; D. J. & JOY, R. M. Pesticides and neurological diseases. In: Casarett, L. J. & Doull, J. *Toxicology the basic science of poisons*. 4th ed. Boca Raton, CRC Press, p. 565-622, 1991.
32. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. What are Biopesticides?. EPA, 2023. Disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides>. Acesso em 02 de maio de 2024.
33. FAKHARI, R. *et al.* Study of Changes in Activity of Wheat Antioxidant Enzymes under Stress Residue of Imazethapyr Herbicide. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, v. 8, p. 165–179, 2020.

34. FARIA, M. *et al.* Androgenic activation, impairment of the monoaminergic system and altered behavior in zebrafish larvae exposed to environmental concentrations of fenitrothion. *Science of the Total Environment*, v. 775, 2021.
35. FAROOQ, M. A. *et al.* Evaluation of integrated pest management modulation for mitigation of pesticide residues in mango. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 54, 2024.
36. FELISBINO, K. ET AL. Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of Atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 150, p. 83-88, 2018.
37. FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 88, p.252-259, 2007.
38. FERNANDES, S. *et al.* Effects of Life Stage on the Sensitivity of *Folsomia candida* to Four Pesticides. *Environ Toxicol Chem*, v. 42, p. 1782-1790, 2023.
39. Ferreira, E. A. *et al.* Composição química da cera epicuticular e caracterização da superfície foliar em genótipos de cana-de-açúcar. *Planta Daninha*, v.23, n.4, p.611-619, 2005.
40. FIOREZE, S. L. *et al.* Source-sink relationships of wheat plants obtained by the application of systemic herbicides. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 56, p. 1–8, 2021.
41. FISCHER SCIENTIFIC. The Evolution of Chemical Pesticides. 2024. Disponível em: <https://www.fishersci.com/us/en/scientific-products/publications/lab-reporter/2016/issue-4/the-evolution-chemical-pesticides.html>. Acesso em 02 de maio de 2024
42. FRANCO, D. S. P. *et al.* Advances made in removing paraquat herbicide by adsorption technology: A review. *Journal of Water Process Engineering*, v. 49, 2022.
43. GABRIEL, G. R. *et al.* Synthesis and Characterization of Sodium Carboxymethyl Cellulose/Sodium Alginate/Hydroxypropyl Cellulose Hydrogel for Agricultural Water Storage and Controlled Nutrient Release. *Solid State Phenomena*, v. 304, p. 51-57, 2019.
44. GAMMON, D. W.; MOORE, T. B.; O'MALLEY, M. A. A Toxicological Assessment of Sulfur as a Pesticide. *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, v. 1, p. 1889–1901, 2010.
45. GERAS'KIN, S.; EVSEEVA, T.; OUDALOVA, A. Plants as a Tool for the Environmental Health Assessment. *Encyclopedia of Environmental Health*, v. 5, p. 571-579, 2011.
46. GONÇALVES, M. M. C. *et al.* Phytotoxicity and cytogenotoxicity of composted tannery sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, p. 34495–34502, 2020.
47. GUPTA, A. Pesticide use in South and South-East Asia: Environmental Public Health and Legal Concerns. *American Journal of Environmental Sciences*, v. 8, p. 152–157, 2012.
48. GUPTA, P. K. Toxicity of Fungicides. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*, p. 569–580, 2018.
49. GUPTA, R. C. Carbamate Pesticides. *Encyclopedia of Toxicology*, p. 661–664, 2014.
50. Halfeld-Vieira, B. A. *et al.* Defensivos agrícolas naturais: uso e perspectivas. Brasília, DF: Embrapa, E-book no formato PDF, 2016
51. HUND-RINKE, K. *et al.* Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: Results of a laboratory comparison test. *Journal of Soils and Sediments*, v. 3, p. 7–12, 2003.

52. IWASHITA, K. *et al.* Flumioxazin, a PPO inhibitor: A weight-of-evidence consideration of its mode of action as a developmental toxicant in the rat and its relevance to humans. *Toxicology*, v. 472, 2022.
53. JAYARAJ, R.; MEGHA, P.; SREEDEV, P. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology*, v. 9, p. 90-100, 2016.
54. JING, X.; YANG, J.; WANG, T. Effects of Salinity on Herbicide Lactofen Residues in Soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 229, 2018.
55. KALPANA, T.; ANIL, K. A Review of Biopesticides and Their Plant Phytochemicals Information. *Annals of R.S.C.B*, v. 25, p. 3576–3588, 2021.
56. KAPANEN, A.; ITÄVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and Environmental*, v. 49, p. 1-16 2001.
57. KAPELEKA, J. A. *et al.* Biomonitoring of Acetylcholinesterase (AChE) Activity among Smallholder Horticultural Farmers Occupationally Exposed to Mixtures of Pesticides in Tanzania. *Journal of Environmental and Public Health*, v. 2019, 2019.
58. KUBIAK, A. *et al.* The Problem of Weed Infestation of Agricultural Plantations vs. the Assumptions of the European Biodiversity Strategy. *Agronomy*, v. 12, 2022.
59. LAINE, D. F.; CHENG, I. F. The destruction of organic pollutants under mild reaction conditions: A review. *Microchemical Journal*, v. 85, p. 183-193, 2007.
60. LAMEGO F.P; FLECK, N.G.; BIANCHI, M.A; SCHAEGLER, C.E. Tolerância a interferência de plantas competidoras e habilidade de supressão por genótipos de soja II. Respostas de variáveis de produtividade. *Planta daninha*, v.22, p.491-498,2014.
61. LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, v. 682, p. 71-81, 2009.
62. LEXMOND, M. B. VAN *et al.* Worldwide integrated assessment on systemic pesticides global collapse of the entomofauna: Exploring the role of systemic insecticides. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, p. 1-4, 2015.
63. LIMAN, R.; CIĞERCI, İ.H.; ÖZTÜRK, N.S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. *Pestic Biochem Physiol.*, 2015.
64. LIMAN, R.; ÖZKAN, S. Cytotoxicity and Genotoxicity in *Allium cepa* L. Root Meristem Cells Exposed to the Herbicide Penoxsulam. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, v. 15, p. 221-226, 2019.
65. LUTTERBECK, C. A. *et al.* Evaluation of the toxic effects of four anti-cancer drugs in plant bioassays and its potency for screening in the context of waste water reuse for irrigation. *Chemosphere*, v. 135, p. 403–410, 2015.
66. LUZ, D. A.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.23, p. 2188-2193, 2004.
67. LUZ, T.; MOREIRA-SANTOS, M.; RUEPERT, C.; CASTILLO, L. E.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. Ecotoxicological characterization of a tropical soil after diazinon Spraying. *Ecotoxicology*, Coimbra, v. 21, p. 2163-2176, 2012.
68. SANCHES, S. M. *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 53–58, 2003.

69. SÁNCHEZ, B. F. R.; FAJARDO, F. J. U. Cholinesterase levels as a biomarker of organophosphate and carbamate poisoning in and forensic toxicology. *Ciencia Digital*, v. 7, n. 3, p. 38-58, 5 Jul. 2023.
70. MARITANO, S. *et al.* Maternal pesticides exposure in pregnancy and the risk of wheezing in infancy: A prospective cohort study. *Environment International*, v. 163, 2022.
71. MATOS, L. A. *et al.* The influence of heavy metals on toxicogenetic damage in a Brazilian tropical river. *Chemosphere*, v. 185, p. 852–859, 2017.
72. MCKENZIE, N. *et al.* Azadirachtin: An effective systemic insecticide for control of *agrilus planipennis* (Coleoptera: Buprestidae). *Journal of Economic Entomology*, v. 103, p. 708–717, 2010.
73. MENEGAZZO, R. F. *et al.* Resposta diferencial a diferentes classes de herbicidas: *Tradescantia pallida* (Rose) D. R. Hunt var. *purpurea* Boom como planta modelo. *Research, Society and Development*, v. 10, 2021.
74. MENEZES, E. L. A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, p.58, 2005.
75. MOSHI, A. P.; MATOJU, I. The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. *Review Crop Protection*, v. 92, p. 16-28, 2017.
76. Nylander, M.W. Les Lichens Du Jardin Du Luxembourg. *Bulletin de la Société Botanique de France*, v. 13, p. 364-371, 1866.
77. OECD. OECD guidelines for testing of chemicals: guideline 208, terrestrial plants, 1984.
78. OLIVEIRA, M. F. *et al.* Lixiviação de flumioxazin e metribuzin em dois solos em condições de laboratório. *Planta Daninha*, v. 17, n. 2, p. 207–215, 1999.
79. OWEN, M. D. K. Weed species shifts in glyphosate resistant crops. *Pest Management Science*, v. 64, n. 4, p. 377-387, 2008.
80. Pansare, S. *et al.* Study on Bio-Pesticides and Organic Pest. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology*, p. 127-134, 2022.
81. PARDEY, P. G. *et al.* A Bounds Analysis of World Food Futures: Global Agriculture Through to 2050. *Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, v. 58, p. 571–589, 2014.
82. PARISI, V. *et al.* Microarthropod communities as a tool to assess soil quality and biodiversity: A new approach in Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 105, p. 323–333, 2005.
83. PARK, J. *et al.* The sensitivity of an hydroponic lettuce root elongation bioassay to metals, phenol and wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 126, p. 147–153, 2016.
84. PONGE, J. F.; *et al.* Collembolan communities as bioindicators of land use intensification. *Soil Biology and Biochemistry*, Brunoy, v. 35, n. 6, p. 813-826, 2003.
85. POKORNY, R. Some chlorophenoxyacetic acids. *J. Amer. Chem. Soc.*, v.63, p.1768, 1941.
86. PETTER, F. A. *et al.* Manejo de herbicidas na cultura da soja Roundup Ready. *Planta Daninha*, v. 25, n. 3, p. 557-566, 2007.

87. RAFIQ, S. *et al.* Biopesticides as an Opportunistic Control Measures. Just Agriculture: Multidisciplinary e-Newsletter, v. 2, 2022.
88. RAJAK, P. *et al.* Agricultural pesticides – friends or foes to biosphere? Journal of Hazardous Materials Advances, v. 10, 2023.
89. REA SÁNCHEZ, B. F.; USTÁRIZ FAJARDO, F. J. Niveles de colinesterasas como biomarcador de intoxicación por organofosforados y carbamatos en toxicología forense. Ciencia Digital, v. 7, p. 38–58, 2023.
90. RODRIGUES, L. C. DE A. *et al.* Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 17, p. 1099–1108, 2013.
91. SAMANTARA, K.; BOHRA, A.; MOHAPATRA, S.R.; PRIHATINI, R.; ASIBE, F.; SINGH, L.; REYES, V.P.; TIWARI, A.; MAURYA, A.K.; CROSER, J.S.; *et al.* Breeding More Crops in Less Time: A Perspective on Speed Breeding. Biology, 11, 275, 2022.
92. SANCHES, S. M. *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 13, p. 53–58, 2003.
93. SAURABH PANSARE *et al.* Study on Bio-Pesticides and Organic Pest. International Journal of Scientific Research in Science and Technology, p. 127–13, 2022.
94. SHARMA, A. *et al.* Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives. Ecotoxicology and Environmental, v. 201, 2020.
95. SHARMA, A. *et al.* Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. SN Applied Sciences, 2019.
96. SILVA, L. L. M. DA; GARRIDO, R. G. Organofosforados e organoclorados: toxicologia médica e reflexos ambientais. Research, Society and Development, v. 10, 2021.
97. SIMON-DELISO, N. *et al.* Systemic insecticides (Neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. Environmental Science and Pollution Research, v. 22, p. 5–34, 2015.
98. SINGH, ASHUTOSH *et al.* Insecticidal Activity, Toxicity, Resistance and Metabolism of Pyrethroids: a Review. Science and Technology Indonesia, v. 7, p. 238-250, 2022.
99. SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC/IMTA. Canadá, Capítulo, v. 4, p. 71-79, 2004.
100. SODERLUND, D. M. Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: Recent advances. Archives of Toxicology, v. 86, p. 165-181, 2012.
101. SONDHIA, S.; DIXIT, A. Persistence of flumioxazin residues in soybean (*Glycine max*) crop and soil. Indian Journal of Agricultural Sciences, v. 8, n. 78, p. 68–70, 2008.
102. SOUSA, J. P. *et al.* Changes in Collembola richness and diversity along a gradient of land-use intensity: A pan European study. Pedobiologia, v. 50, p. 147–156, 2006.
103. SOUTO, K. M. *et al.* Biodegradação dos herbicidas imazetapir e imazapique em solo rizosférico de seis espécies vegetais. Ciência Rural, v. 43, n. 10, p. 1790–1796, 2013.
104. SOUZA, C. P.; GUEDES, T. DE A.; FONTANETTI, C. S. Evaluation of herbicides action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. Environmental Monitoring and Assessment, v. 188, 2016.

105. SYAFRUDIN, M. *et al.* Pesticides in drinking water-a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v.18, p. 1-15, 2021.
106. TEMMERMAN, L.; BELL, N.B.; GARREC, J.P.; KLUMPP, A.; KRAUSE, G.H.M.; TONNEIJCK, A.E.G. *Biomonitoring of air pollutants with plants - Considerations for the future. Urban Air Pollution, bioindication and Environmental Awareness*, 2001.
107. TIQUIA, S. M.; TAM, N. F. Y.; HODGKISS, I. J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environmental Pollution*, v. 93, p. 249–256, 1996.
108. U.S. Department of Agriculture. Soybeans. USDA, 2023. Disponível em: <https://fas.usda.gov/data/commodities/soybeans>. Acesso em 02 de fevereiro de 2024.
109. USEPA - United States Environmental Protection Agency. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA 712-C-96-154. 1996.
110. USEPA - United States Environmental Protection Agency. Herbicides. 2012. Disponível em: http://www.epa.gov/caddis/ssr_herb_int.html. Acesso em 02/02/2024.
111. VALE, A.; LOTTI, M. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. Em: *Handbook of Clinical Neurology*, v. 131, p. 149–168, 2015.
112. VASCONCELOS M. C. C. *et al.* Interferência de Plantas Daninhas sobre Plantas Cultivadas. *Agropecuária científica no semiárido*, v. 8, p. 01-06, 2012.
113. VIEIRA, C.; MARCON, C.; DROSTE, A. Phytotoxic and cytogenotoxic assessment of glyphosate on *Lactuca sativa* L. *Brazilian Journal of Biology*, v. 84, p. 1–8, 2022.
114. VILLA, S.C.C. *et al.* Arroz tolerante a imidazolinonas: controle do arroz-vermelho, fluxo gênico e efeito residual do herbicida em culturas sucessoras não-tolerantes. *Planta Daninha*, v. 24, n. 4, p. 761–768, 2007.
115. VOPHAM, T. *et al.* Pesticide exposure and liver cancer: a review. *Cancer Causes and Control*, v. 28, p. 177-190, 2017.
116. WILLIAM, J.; MARTIN, P.K.S.; RYAN, S.P. Comparação de inseticidas estabelecidos e novos na sobrevivência e Reprodução de *Folsomia candida*. *Toxicologia e Química Ambiental*, v. 42, p. 1516–1528, 2023.
117. WOJCIECHOWSKA, M.; STEPNOWSKI, P.; GOŁĘBIOWSKI, M. The use of insecticides to control insect pests. *Invertebrate Survival Journal*, v. 13, p. 210–220, 2016.
118. YADAV, I. C. *et al.* Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of the Total Environment*, v. 511, p. 123-137, 2015.
119. YOUNES, M.; GALAL-GORCHEV, H. Pesticides in Drinking Water - A Case Study. *Food and Chemical Toxicology*, v. 38, p. 87–90, 2000.
120. Yu, T., Xu, X., Mao, H. *et al.* Fenpropathrin exposure induces neurotoxicity in zebrafish embryos. *Fish Physiol Biochem*, v. 48, p. 1539–1554, 2022.
121. ZHANG, W. Global pesticide use: Profile, trend, cost / benefit and more *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, v. 8 p. 1-27, 2018.
122. ZHU, Q. *et al.* Synthesis, insecticidal activity, resistance, photodegradation and toxicity of pyrethroids (A review). *Chemosphere*, v. 254, 2020.

123. ZORTÉA, T. *et al.* Comportamento de fuga de colêmbolos expostos a solos contaminados com cipermetrina. *Revista Scientia Agraria*, v.16, p.49-58, 2015.