



QUÊNIA MARA SILVA

**FITO (GENO) TOXICIDADE DE HERBICIDAS A BASE DE
NICOSULFURON E S-METOLACHLOR NOS MODELOS
VEGETAIS *Lactuca sativa* L. E *Zea mays* L.**

**LAVRAS-MG
2021**

QUÊNIA MARA SILVA

**FITO(GENO)TOXICIDADE DE HERBICIDAS A BASE DE NICOSULFURON E S-
METOLACHLOR NOS MODELOS VEGETAIS *Lactuca sativa* L. E *Zea mays* L.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Botânica Aplicada, área de
concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção
do título de Doutora.

Orientadora:
Profª Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira

**LAVRAS-MG
2021**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Quênia Mara.

Fito (geno) toxicidade de herbicidas a base de Nicosulfuron e
S-metolachlor nos modelos vegetais *Lactuca sativa* L. e *Zea mays*
L. / Quênia Mara Silva. - 2021.

93 p. : il.

Orientador(a): Larissa Fonseca Andrade Vieira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Herbicidas. 2. Citogenotoxicidade. 3. Bioensaios vegetais. I.
Vieira, Larissa Fonseca Andrade. II. Título.

QUÊNIA MARA SILVA

FITO(GENO)TOXICIDADE DE HERBICIDAS A BASE DE NICOSULFURON E S-METOLACHLOR NOS MODELOS VEGETAIS *Lactuca sativa* L. E *Zea mays* L.

PHYTO(GENO)TOXICITY OF NICOSULFURON AND S-METOLACHLOR BASED-HERBICIDES IN PLANT MODELS *Lactuca sativa* L. AND *Zea mays* L.

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutora.

Aprovada em 16 de abril de 2021.

Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira (UFLA)
Dra. Cintya Aparecida Christofolletti de Figueiredo (FHO)
Dra. Cleiton Pereira de Souza (ASR)
Dra. Elisa Monteze Bicalho (UFLA)
Dra. José Marcello Salabert de Campos (UFJF)



Orientadora:

Profª Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira

**LAVRAS-MG
2021**

*Aos meus pais, por todo o amor e apoio.
Ao Haroldo, por todo o incentivo e o apoio nesses anos de convivência.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela estrutura concedida para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira, por toda dedicação, pela paciência, por toda a sua contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores, pelos conhecimentos compartilhados e transmissão de seus valores, que deixaram de ser apenas professores e se tornaram exemplos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, por todos os ensinamentos e contribuições.

A todos os integrantes do nosso grupo de pesquisa, Prospecção de Efeitos Biológicos, pela amizade, pela troca de experiências, pela disponibilidade de ajudar em minha pesquisa.

Aos técnicos do Laboratório de Citogenética, Iara e Felipe, por toda a ajuda.

À minha querida amiga Maria de Fátima, por toda a boa vontade de me ajudar sempre.

Aos amigos antigos, de longa data, por estarem sempre presentes. E também aos novos, tão importantes nessa etapa, que jamais serão esquecidos.

Aos meus pais, minha sobrinha, meu irmão e minha cunhada, por todo o amor, carinho e incentivo.

Ao Haroldo, por todo apoio e companheirismo, durante todos os momentos de alegria e incertezas.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"Tudo acontece na hora certa. Tudo acontece exatamente quando deve acontecer."

(Albert Einstein)

RESUMO

O impacto de poluentes no ecossistema e na saúde humana é uma questão internacional urgente, uma vez que há um número cada vez maior de distúrbios ambientais devido a atividades antropogênicas. Nos tempos atuais, os agrotóxicos são apontados como um dos principais contaminantes oriundos das atividades agrícolas. Os bioensaios envolvendo plantas superiores como organismos testes têm sido amplamente utilizados para a compreensão dos efeitos tóxicos desses contaminantes ambientais. Diante do exposto, esse trabalho foi delineado com o objetivo avaliar os efeitos dos herbicidas à base de Nicosulfuron e S-metolachlor no desenvolvimento inicial dos modelos vegetais *Lactuca sativa* L. e *Zea mays* L.. O herbicida contendo Nicosulfuron afetou negativamente a germinação das sementes da alface, bem como a velocidade da germinação. Houve redução no crescimento da raiz e da parte aérea da alface em todas as concentrações utilizadas nos testes, quando comparado ao controle, com mais evidência a partir da dosagem recomendada para uso pelo fabricante. O herbicida também afetou o índice mitótico da alface e induziu a formação de micronúcleos nas maiores dosagens. No milho, este mesmo herbicida também reduziu estatisticamente a germinação, a velocidade de germinação, o crescimento da raiz e da parte aérea, e o desenvolvimento das plântulas, também com mais evidência a partir da dosagem recomendada para uso pelo fabricante. O herbicida a base de S-metolachlor afetou drasticamente a alface em todos os parâmetros macroscópicos e microscópicos testados. Quanto ao milho, não houve interferência estatisticamente significativa na germinação. Já na velocidade de germinação, no crescimento da raiz e da parte aérea, e no desenvolvimento da plântula houve interferência negativa em todas as concentrações, quando comparados ao controle. Os efeitos nocivos do herbicida a base de S-metolachlor nas duas espécies ficaram mais ainda mais evidentes à medida que as dosagens ficavam maiores. Em conclusão, ambos os herbicidas, à base de Nicosulfuron e S-metolachlor, possuem potencial fitotóxico, pois apresentou fitotoxicidade nos modelos vegetais testados.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Ecotoxicidade. Bioensaios. Desenvolvimento inicial. Germinação.

ABSTRACT

The impact of pollutants on the ecosystem and human health is an international-urgent issue, since there is an increase number of environmental disturbances due to anthropogenic activities. Nowadays, agrochemicals are recognized as the main source of agriculture pollution. Bioassays using higher plants as test organisms have been widely used to understand the toxic effects of these environmental contaminants. In this sense, this work was designed with the objective of evaluating the effects of Nicosulfuron and S-metolachlor based-herbicides on the initial development of the plant models *Lactuca sativa* L. and *Zea mays* L. The herbicide containing Nicosulfuron affected negatively the seed germination and germination speed index in lettuce. There was a reduction in root and shoot of lettuce plantlets in all concentrations used in the tests, comparing treatments with the control group. It was more evidenced from the recommended dosage of use by the manufacturer. The herbicide also affected the mitotic index of lettuce and induced the formation of micronuclei in the highest dosages. In maize, this same herbicide also statistically reduced germination, germination speed index, root and shoot growth, and seedling development, also with more evidence from the dosage recommended for use by the manufacturer. The herbicide based on S-metolachlor drastically affected lettuce in all macroscopic and microscopic parameters tested. However, for maize, there was no statistically significant interference in germination. In germination speed, root and shoot growth, and seedling development, there was negative interference in all concentrations when compared to control. The harmful effects of the herbicide based on S-metolachlor in the two species became even more evident as the dosages became larger. In conclusion, the Nicosulfuron and S-metolachlor based-herbicides, have phytotoxic potential, as they showed phytotoxicity in the tested plant models.

Keywords: Pesticides. Ecotoxicity. Bioassays. Initial development. Germination.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Toxicologia ambiental	14
2.2	Importância dos ensaios biológicos com modelos vegetais nos estudos de toxicologia ambiental	15
2.3	Praguicidas	20
2.4	Herbicidas	23
2.5	Nicosulfuron	26
2.6	S-metolachlor	30
	REFERÊNCIAS	35
	ARTIGO 1 - FITO-CITO-GENOTOXICIDADE DE UM HERBICIDA À BASE DE NICOSULFURON NAS PLANTAS MODELO <i>Lactuca sativa</i> L. E <i>Zea mays</i> L.	44
	ARTIGO 2 - EFEITOS DE UM HERBICIDA À BASE DE S-METOLACHLOR EM MODELOS VEGETAIS: FITOTOXICIDADE EM <i>Zea mays</i> L. E CITOGENOTOXICIDADE EM <i>Lactuca sativa</i> L.	73

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento global e as atividades antrópicas, caracterizado por um rápido aumento no uso de substâncias químicas associadas às atividades industriais, urbanas, comerciais e agrícolas, têm contribuído para um crescimento rápido e global dos poluentes da biosfera, gerando dúvidas sobre as possíveis consequências para a biota, incluindo os humanos (GARCÍA-MEDINA *et al.*, 2020; TORRES RODRÍGUEZ, 2003).

A poluição causada pelos praguicidas é um dos distúrbios antropogênicos mais persistentes e penetrantes nas comunidades biológicas (BANKS *et al.*, 2008). A aplicação de praguicidas é uma prática comum para melhorar a produtividade na agricultura (MIKÓ *et al.*, 2015), tanto nos países mais desenvolvidos, quanto nos em desenvolvimento, apesar dos esforços para conscientização sobre os riscos e para a redução do uso deles (BANKS *et al.*, 2008).

Os praguicidas podem afetar a fisiologia, diminuir o sucesso reprodutivo, interromper as funções endócrinas e ter efeitos imunotóxicos em organismos não-alvos. Assim, os praguicidas e seus resíduos podem impactar negativamente a existência das espécies e, em última instância, a biodiversidade (MIKÓ *et al.*, 2015).

No Brasil, a classe de praguicidas mais utilizada é a dos herbicidas (VIERA *et al.*, 2017). Os herbicidas são substâncias químicas sintéticas, utilizados no controle das ervas daninhas das culturas, que promovem o controle e a morte das pragas. Para isso, esses compostos atuam de diferentes maneiras, a exemplo da inibição da fotossíntese e da síntese de pigmentos, da formação de aminoácidos e da síntese lipídica, bloqueando a divisão celular e, conseqüentemente, inibindo o crescimento das plantas alvo (DE SOUZA *et al.*, 2020).

O Nicosulfuron é um herbicida pertencente ao grupo químico das sulfoniluréias. É utilizado no controle de pós-emergência de gramíneas e algumas eudicotiledôneas na cultura do milho (CAVALIERI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2018). Ele atua inibindo a atividade da acetolactatosintase (ALS), reduzindo a síntese de aminoácidos de cadeia ramificada e atua eliminando as ervas daninhas (WANG *et al.*, 2018). O Nicosulfuron é amplamente utilizado em

todo o mundo, e os riscos potenciais de contaminação ambiental, bem como os problemas de fitotoxicidade levantam preocupações crescentes (ZHAO *et al.*, 2015). Apesar de ser considerado de baixa persistência, seus resíduos foram relatados em muitos materiais, como solo, águas superficiais e algumas culturas (DUGANDŽIĆ *et al.*, 2017).

O S-metolachlor é um composto da família das cloroacetamidas, utilizado no controle em pré-emergência e pós-emergência das ervas daninhas de folhas largas e gramíneas das culturas (COPIN; PERRONET; CHÈVRE, 2016; DEMAILLY *et al.*, 2019). Ele é aplicado principalmente em campos de milho, mas também em soja, sorgo, amendoim, batata, vagem e algodão (COPIN; PERRONET; CHÈVRE, 2016). Este herbicida atua inibindo a síntese de clorofila, de proteínas, de ácidos graxos, de lipídios e, por fim, o crescimento do organismo. Ele é considerado uma molécula potencialmente perigosa para o meio ambiente (DEMAILLY *et al.*, 2019).

Sabendo que todas as formas de vida do planeta estão interligadas, e que a saúde humana está estreitamente conectada à saúde do ecossistema, um entendimento claro de todos os perigos representados pelos poluentes ambientais para as populações humanas e sistemas ecológicos torna-se fundamental (GARCÍA-MEDINA *et al.*, 2020).

Os estudos dos efeitos de praguicidas em condições laboratoriais são usados para determinar os mecanismos de ação dos mesmos sobre organismos modelos. Testes de laboratório padronizados são de alta eficiência, seus resultados podem ser facilmente interpretados e comparados entre os laboratórios e, muitas vezes, predizem corretamente os efeitos tóxicos em comunidades naturais (MIKÓ *et al.*, 2015). Neste sentido, nas últimas décadas, bioensaios rápidos envolvendo plantas superiores como organismos-teste têm sido amplamente utilizados, funcionando como boas ferramentas de trabalho (LUTTERBECK *et al.*, 2015; TORRES RODRÍGUEZ, 2003). Esses ensaios são eficientes para a identificação de toxicidade de poluentes ambientais (DOS REIS *et al.*, 2017; PALMIERI *et al.*, 2014), além de serem simples, rápidos, confiáveis e econômicos (PALMIERI *et al.*, 2014). Dentre eles, destaca-se o bioensaio de

germinação e crescimento radicular e o bioensaio citogenético com plantas vasculares (PALMIERI *et al.*, 2014).

Diante disso, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos de herbicidas à base dos princípios ativos Nicosulfuron e S-metolachlor no desenvolvimento inicial dos modelos vegetais *Lactuca sativa* L. e *Zea mays* L, bem como sobre o ciclo celular de células meristemáticas de *L. sativa* L.. A hipótese é de que ambos os herbicidas sejam altamente tóxicos para os modelos vegetais testados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Toxicologia ambiental

Os estudos toxicológicos do meio ambiente podem ser caracterizados principalmente como toxicologia ambiental (CHAPMAN, 2002). A Toxicologia Ambiental recebeu atenção a partir da década de 1950-1960, com o aumento da preocupação sobre os riscos que os produtos químicos agrícolas e industriais lançados no ambiente podem oferecer (AGATHOKLEOUS; CALABRESE, 2020).

A poluição ambiental cresceu muito nas últimas décadas devido ao aumento da população e às suas atividades relacionadas (KUMAR *et al.*, 2021; VERMA; SRIVASTAVA, 2018) e o impacto de poluentes no ecossistema e na saúde humana é uma questão preocupante e internacional, uma vez que há a possibilidade de afetar a biota e os humanos (FALLAH *et al.*, 2021; KUMAR *et al.*, 2021; MOORE, 2002). Levando-se em consideração que todas as formas de vida do planeta estão interligadas, e que a saúde humana está estreitamente conectada à saúde do ecossistema, é de suma importância entender os perigos representados pelos poluentes ambientais (GARCÍA-MEDINA *et al.*, 2020).

Há uma preocupação crescente em todo o mundo com o uso dos agrotóxicos. Eles são apontados como um dos principais contaminantes provenientes das atividades agrícolas nos tempos atuais. A aplicação excessiva de agrotóxicos levou a um aumento da presença dos resíduos dos mesmos no solo, na água e no ar. Essa presença causa poluição, que pode gerar problemas de alta toxicidade e causar danos ao meio ambiente (KUMAR *et al.*, 2021; VERMA; SRIVASTAVA, 2018).

2.2 Importância dos ensaios biológicos com modelos vegetais nos estudos de toxicologia ambiental

Para determinação da toxicidade de substâncias químicas no ambiente e para obter maiores informações sobre o risco das mesmas, são realizados bioensaios de toxicidade. Por meio desses bioensaios é possível investigar os efeitos, mecanismos de ação e o potencial tóxico de poluentes ambientais (REPETTO *et al.*, 2001; WORTH, 2019).

O potencial tóxico dos químicos presentes no ambiente pode ser detectado pelas alterações causadas em organismos testes que são utilizados nos bioensaios (ALENGEBAWY *et al.*, 2021; VALERIO; GARCÍA; PEINADO, 2007), uma vez que os organismos vivos apresentam alguma resposta a níveis perigosos de qualquer substância química ou mistura complexa de toxinas (TORRES RODRÍGUEZ, 2003).

Os estudos em condições laboratoriais são então usados para testar poluentes e possíveis poluentes. Bioensaios *in vitro* são bem aceitos nas estratégias de biomonitoramento, pois fornecem resultados confiáveis, podem ter alto rendimento, seus resultados podem ser facilmente interpretados e comparados entre os laboratórios, além de serem econômicos, simples e rápidos (MIKÓ *et al.*, 2015; TORRES RODRÍGUEZ, 2003; VALERIO; GARCÍA; PEINADO, 2007). Esses bioensaios podem auxiliar na avaliação dos efeitos diversas substâncias químicas tóxicas introduzidas por diversas vias no meio ambiente e permitem sua aplicação em programas de monitoramento de avaliação de toxicidade (TORRES RODRÍGUEZ, 2003).

Nas últimas décadas, bioensaios rápidos de fitotoxicidade utilizando plantas superiores como organismos-teste, têm sido desenvolvidos e amplamente aplicados, funcionando como boas ferramentas de trabalho para monitoramento ambiental de vários tóxicos ambientais (PARK *et al.*, 2016; GOVEA, KAMILA PACHECO *et al.*, 2020).

Os bioensaios usando sistemas de plantas como modelo possuem várias vantagens. Eles são robustos, confiáveis, raramente produzem resultados falsos, são facilmente replicáveis, a sensibilidade é comparada a outros testes utilizados para o mesmo fim, são de baixo custo e de facilidade de manuseio (ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2017; EGUREFA; ORJI; UBA, 2020; LUTTERBECK *et al.*, 2015).

Tendo em vista que também existe um esforço da comunidade científica para reduzir os testes baseados em animais (LANZERSTORFER *et al.*, 2021; LAUE *et al.*, 2020), os testes com sistemas vegetais representam uma alternativa interessante e acessível, pois possuem uma boa correlação com sistemas de teste, inclusive de mamíferos (ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2014; LUTTERBECK *et al.*, 2015; TORRES RODRÍGUEZ, 2003). Além disso, os resultados obtidos com células vegetais mostraram ter boa correlação com os de leucócitos humanos (ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2017).

Um dos testes biológicos disponíveis e comumente utilizado para avaliar a poluição ambiental é o bioensaio de germinação e crescimento radicular com plantas vasculares (PALMIERI, *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2016).

Esses ensaios são particularmente interessantes, pois permitem a avaliação dos efeitos adversos de um composto tóxico na germinação e no crescimento da raiz, mesmo nos estágios iniciais do desenvolvimento da semente. Como a germinação é a primeira etapa da troca de material entre a planta em desenvolvimento e o ambiente, tanto o número de sementes germinadas quanto o alongamento da raiz são parâmetros sensíveis para testes de fitotoxicidade, tornando o processo consideravelmente mais simples, rápido, confiável e econômico (CHANKEB *et al.*, 2018; MACAGNO; LESCAN.; BERLI, 2019; PALMIERI, *et al.*, 2014; PRIAC; BADOT; CRINI, 2017; TORRES RODRÍGUEZ, 2003). Além disso, esses testes requerem apenas uma quantidade relativamente pequena da amostra a ser testada, são altamente reproduzíveis, as sementes são fáceis de adquirir e permanecem utilizáveis por muito tempo (PRIAC; BADOT; CRINI, 2017).

O teste consiste na exposição de sementes de uma planta a um agente potencialmente tóxico. Posteriormente, o número de sementes germinadas, bem como a extensão do alongamento da raiz e da parte aérea são estabelecidos (PALMIERI, *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2016). A fitotoxicidade pode ser avaliada com a inibição ou atraso da germinação das sementes, inibição do crescimento das plântulas ou qualquer efeito adverso nas plantas causado pelas substâncias específicas (PINHO *et al.*, 2017). Tendo em vista que o crescimento radicular é inibido quando o

órgão é exposto a uma substância tóxica, e o crescimento e o desenvolvimento da raiz estão intimamente relacionados à proliferação celular, se uma substância for tóxica, reduzirá a frequência de divisão das células, afetando o desenvolvimento da raiz (ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2017). Além disso, o prolongamento da raiz pode ser inibido em concentrações mais baixas das substâncias tóxicas do que no caso da germinação das sementes, podendo ser um indicador sensível de efeitos biológicos (TORRES RODRÍGUEZ, 2003). Sendo assim, a germinação é considerada menos sensível, enquanto o crescimento da raiz e o crescimento da parte aérea são considerados mais sensíveis para detectar toxicidade de compostos (CARVALHO *et al.*, 2019).

Esse bioensaio de toxicidade se justifica pela importância dos eventos iniciais de desenvolvimento e sobrevivência das plantas (TORRES RODRÍGUEZ, 2003). O sucesso ou aptidão de uma plântula para se estabelecer em um determinado ambiente é de grande importância para garantir a sobrevivência da espécie. A avaliação do desenvolvimento da radícula e do hipocótilo constituem indicadores representativos para determinar a capacidade de estabelecimento e desenvolvimento da planta (CHAN-KEB *et al.*, 2018). Dessa forma, os bioensaios de fitotoxicidade podem detectar qualquer substância capaz de gerar estresse temporário ou de longo prazo na capacidade de germinação das sementes, crescimento das raízes e evolução da matéria seca (PINHO *et al.*, 2017).

O ensaio citogenético é outro teste que pode ser aliado aos testes macroscópicos (PALMIERI *et al.*, 2014). O bioensaio pode identificar alterações no ciclo celular por meio da detecção de anormalidades na taxa de divisão celular e a presença de alterações cromossômicas ou nucleares (ARAGÃO *et al.*, 2021; PALMIERI *et al.*, 2014). Se um organismo vivo é exposto a uma substância tóxica, provavelmente ocorrerão alterações no seu ciclo celular. As alterações podem ser observadas por meio de uma série de parâmetros, como variações na taxa de divisão celular, presença de alterações cromossômicas, micronúcleos e frequências de núcleos condensados (PALMIERI *et al.*, 2016).

Além disso, a germinação e o crescimento radicular são variáveis que podem ser associadas aos ensaios citogenéticos. O índice mitótico é um parâmetro confiável para determinar

a presença de compostos citotóxicos no ambiente e um teste adequado para biomonitoramento da poluição (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010).

Os bioensaios podem ser realizados com qualquer espécie vegetal (TORRES RODRÍGUEZ, 2003). Porém, alguns critérios devem ser levados em consideração, como a disponibilidade e acessibilidade, a importância econômica, o tempo de germinação e crescimento rápido, a relevância ecológica das espécies, as características específicas do ciclo de vida das espécies, a região de ocorrência natural, a uniformidade da planta, a sensibilidade a compostos tóxicos, e se a espécie é passível de testes em laboratório e reprodutibilidade dentro e entre as instalações de teste (OECD, 2006). Algumas espécies de plantas têm sido mais comumente utilizadas em estudos como bons bioindicadores de toxicidade de poluentes ambientais. Algumas delas são: *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana*, *Crepis capilaris*, *Glycine max*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Lactuca sativa*, *Tradescantia*, *Pisum sativum*, *Nicotiana glauca*, etc. (ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2014; BHAT *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2005). Além disso, é recomendado que seja utilizado pelo menos uma monocotiledônea e uma eudicotiledônea nos ensaios (ISO 18763, 2006).

O número de espécies de eudicotiledôneas e monocotiledôneas a serem utilizadas nos testes de fitotoxicidade é variado. Alguns pesquisadores propõem o uso de pelo menos três monocotiledôneas, três dicotiledôneas, incluindo uma leguminosa como representante de plantas fixadoras de nitrogênio, bem como a *Avena* e a *Brassica* (FÜLL; JUNG; SCHULTE, 2000; SANTIN-MONTANYA *et al.*, 2006). Outros sugerem usar quatro espécies de plantas superiores, duas monocotiledôneas e duas dicotiledôneas. A seleção das espécies de plantas é específica para cada situação e depende de cada herbicida (SANTIN-MONTANYA *et al.*, 2006), além dos outros parâmetros já citados.

O ensaio com *Lactuca sativa* L. (alface), além de ser bastante simples e barato, foi aceito e validado para uso em estudos de toxicidade (SILVEIRA *et al.*, 2017). É um representante das principais culturas comerciais eudicotiledôneas e considerada uma espécie padrão de uso em testes fitotoxicológicos (ARAGÃO *et al.*, 2021; GOVEA *et al.*, 2020; LUTTERBECK *et al.*,

2015), devido à sua rápida germinação, uniformidade e sensibilidade (ARAGÃO *et al.*, 2021; GOVEA *et al.*, 2020; SILVEIRA *et al.*, 2017). Além disso, apresenta alta correlação com organismos de teste animal por ser um organismo eucarioto, possui cromossomos de fácil visualização, rápida proliferação celular, além de permitir testes macro e microscópicos simultaneamente (ARAGÃO *et al.*, 2021).

O milho (*Zea mays* L.), é uma espécie de grande importância econômica e um representante das monocotiledôneas, também é utilizado como espécie de planta de teste devido à sua sensibilidade a uma ampla gama de contaminantes (SANG *et al.*, 2010), sendo, assim, capaz prever com confiança os efeitos de possíveis tóxicos ambientais (EGUREFA; ORJI; UBA, 2020).

2.3 Praguicidas

O termo "praguicida" é utilizado para definir uma variedade de agentes que são classificados com base em seu potencial de matar organismos vivos. São compostos projetados para interferir em certos organismos vivos e diferem de todas as outras substâncias químicas (AHMAD *et al.*, 2010; ALENGBAWY *et al.*, 2021). As estruturas dos praguicidas são desenvolvidas para imitar e, então, substituir moléculas específicas em reações biológicas direcionadas (AHMAD *et al.*, 2010).

Os praguicidas são amplamente utilizados em todo o mundo em sistemas agrícolas intensivos pelos agricultores que visam prevenir, destruir, repelir ou mitigar organismos responsáveis por problemas na agricultura, como micro-organismos (bactérias, fungos e vírus), insetos, animais e vegetais (ervas daninhas), conhecidos coletivamente como pragas. Além disso, os praguicidas também podem ser usados como um regulador da planta (estimulando ou retardando o crescimento), um desfolhante, um dessecante (acelerando artificialmente a secagem de tecidos da planta) ou um estabilizador de nitrogênio (DE SOUZA *et al.*, 2020; NEHRA *et al.*, 2020; VIERA *et al.*, 2017).

Os praguicidas podem ser categorizados por meio do organismo-alvo e classe química (AHMAD *et al.*, 2010; MOJIRI *et al.*, 2020). Eles podem ser divididos em grupos principais com base em seus usos na produção agrícola, como fungicidas, herbicidas, inseticidas, miticidas, algicidas, acaricidas e rodenticidas, sendo os herbicidas representantes da maior proporção de uso desses praguicidas (MOJIRI *et al.*, 2020).

Embora os praguicidas ajudem a controlar efetivamente as principais pragas das culturas, seu uso excessivo causa efeitos colaterais que geralmente são prejudiciais à saúde humana e à biodiversidade (LE BELLEC *et al.*, 2015; NEHRA *et al.*, 2020), e mesmo em pequenas quantidades, esses produtos representam risco devido à sua mobilidade e persistência (DE QUEIROZ, *et al.*, 2018).

Além disso, a aplicação repetida de praguicidas é uma prática comum para alcançar alta produtividade. A aplicação inadequada, mesmo em baixas concentrações, pode levar a danos as culturas e a problemas adicionais, como a alta concentração de resíduos em alimentos para consumo humano e em partes de plantas que podem ser usadas na alimentação de animais (VIERA *et al.*, 2017), além de contaminar o solo, o ar, a água, vegetais, frutas, grãos (ALI *et al.*, 2019; MOJIRI *et al.*, 2020), bem como levar a degradação do desempenho fisiológico a longo prazo de espécies de biota (abelhas, por exemplo) e também tem efeitos perigosos sobre a vida selvagem (NEHRA *et al.*, 2020).

A exposição humana a praguicidas por rotas diretas ou indiretas leva a vários problemas de saúde, como, por exemplo, chiado alérgico, distúrbios neurológicos, depressão, câncer, infertilidade, obesidade e doenças endócrinas (GOMES *et al.*, 2020; NEHRA *et al.*, 2020). Essa exposição a praguicidas causa grande preocupação (AHMAD *et al.*, 2010; ALENGBAWY *et al.*, 2021). Acredita-se que dois terços da população mundial estejam expostos a seus efeitos nocivos, seja pela atividade laboral ou pelo consumo de alimentos contaminados (DE QUEIROZ *et al.*, 2018).

A contaminação do meio ambiente pelos praguicidas ocorre através do escoamento, lixiviação, erosão, bioacumulação, volatilização e deriva de praguicidas, podendo ser

transportados para diferentes partes do ambiente (MOJIRI *et al.*, 2020; NEHRA *et al.*, 2020; LE BELLEC *et al.*, 2015).

O grau de transporte de praguicidas no ambiente depende de vários fatores, como taxa de aplicação, persistência, mobilidade, precipitação, topografia e clima. Os praguicidas no solo estão sujeitos à sorção, bem como a vários mecanismos de degradação biológica e química. Elas envolvem decomposição química, microbiana e fotodecomposição, que levam a uma diminuição nas concentrações de praguicidas no solo (LE BELLEC *et al.*, 2015; MOJIRI *et al.*, 2020).

Nos países em desenvolvimento, a situação é especialmente crítica devido ao uso de compostos altamente tóxicos que já foram banidos ou restringidos nos países ocidentais (NEHRA *et al.*, 2020). Atualmente, são comercializadas cerca de 2.300 formulações de agrotóxicos no Brasil, e muitas dessas formulações são proibidas na União Europeia. Além disso, com a mudança do presidente do Brasil em 2019, o número de agrotóxicos aprovados no país foi muito maior do que nos anos anteriores. Até outubro de 2019, já haviam sido registradas 382 novas formulações, sendo que 15 formulações continham novos princípios ativos, dos quais cerca de 30% desses ingredientes já haviam sido proibidos fora do Brasil (DA SILVA *et al.*, 2020).

O Brasil é país com o maior consumo de praguicidas no mundo (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ *et al.*, 2020; DIAS *et al.*, 2021; GOMES *et al.*, 2020). Em 2008, se tornou o maior consumidor mundial ao usar mais de 700.000 toneladas de praguicidas. O crescimento exponencial do consumo de praguicidas no país foi estimulado por políticas governamentais implementadas na década de 1960, que forneceram subsídios substanciais para grandes proprietários interessados em plantar culturas comerciais como soja, cana de açúcar, milho e café para exportação (PEDLOWSKI *et al.*, 2012). O consumo de ingredientes ativos de praguicidas no país quase dobrou de 2009 a 2018, onde foi de 300,5 mil toneladas em 2009, para 549,3 mil toneladas em 2018 (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ *et al.*, 2020).

Os praguicidas mais utilizados no Brasil são herbicidas, inseticidas e fungicidas (VIERA *et al.*, 2017). O perfil de uso dos agrotóxicos nos anos de 2009 a 2018 no mercado nacional manteve um crescimento e tendência semelhante de uso, em que a venda de inseticidas/acaricidas

e fungicidas representou 28,9% do mercado nacional, e as demais classes de pesticidas (nematicidas, bactericidas, adjuvantes, reguladores de crescimento, etc.) ocuparam 12,9%. Já os herbicidas dominam o mercado nacional de agrotóxicos, com 58,2% das vendas (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ *et al.*, 2020).

A maior parte dos agrotóxicos consumidos no Brasil (cerca de 81%) são utilizados na produção de quatro safras: soja (52,2%), cana-de-açúcar (11,7%), milho (10,6%) e algodão (6,7%) (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ *et al.*, 2020).

2.4 Herbicidas

Os herbicidas são substâncias químicas orgânicas obtidas por rotas sintéticas, não sendo encontradas naturalmente. Eles são capazes de selecionar populações de plantas, promovendo o controle e a morte de certas plantas e de outras não, como as ervas daninhas da cultura (DE OLIVEIRA JR; CONSTANTIN; INOUE, 2011; DE SOUZA *et al.*, 2020).

A dependência de herbicidas aumentou gradativamente e substituiu todos os outros métodos de controle de ervas daninhas, como manual, cultural e mecânico, desde seu lançamento em 1940 (ROZMÁNKOVÁ *et al.*, 2020). A aplicação de herbicidas é uma abordagem usual para controlar as ervas daninhas na agricultura (MOJIRI *et al.*, 2020; THIOUR-MAUPRIVEZ *et al.*, 2019).

O volume de vendas de herbicidas sempre representou a maior fração do mercado de praguicidas, tanto no Brasil, como em nível mundial. Atualmente representa de 40 a 45% do total de vendas do mercado de praguicidas (MOJIRI *et al.*, 2020; DE OLIVEIRA JR; CONSTANTIN; INOUE, 2011). O mercado global de herbicidas foi de US \$ 28,76 bilhões em 2017 e deverá chegar a US \$ 41,63 bilhões até 2023 (MOJIRI *et al.*, 2020).

Os herbicidas podem ser apresentados de várias formas, como grânulos, líquidos e por fumigação (MOJIRI *et al.*, 2020; THIOUR-MAUPRIVEZ *et al.*, 2019), e atuam de diferentes

maneiras para atingir o objetivo de inibir o crescimento das plantas alvos (DE SOUZA *et al.*, 2020).

Eles possuem propriedades físicas e químicas que permitem sua absorção após contato inicial com os tecidos vegetais. São translocados para os locais-alvo, onde inibem a fotossíntese e a síntese de pigmentos, inibem a formação de aminoácidos e a síntese lipídica e bloqueiam a divisão celular. O crescimento é inibido, seguindo-se de ferimentos e morte no caso de uma planta suscetível (DE SOUZA *et al.*, 2020; NAKKA *et al.*, 2019).

A morte de uma espécie vegetal vai depender do mecanismo de ação e do modo de ação do herbicida. O mecanismo de ação é relacionado ao primeiro processo bioquímico ou biofísico a ser inibido pela ação do herbicida no interior da célula vegetal. Esse primeiro processo pode ser suficiente para matar espécies sensíveis (DE OLIVEIRA JR; CONSTANTIN; INOUE, 2011; MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

Entretanto, normalmente outras diversas reações químicas ou processos são necessários para se matar uma planta. O somatório de eventos bioquímicos e fisiológicos que ocorrem na planta, desde o momento em que ela entra em contato com o herbicida, até sua morte completa é denominado modo de ação. Os herbicidas geralmente inibem a atividade de uma enzima ou proteína na célula, desencadeando uma série de eventos que inibem o desenvolvimento da célula e do organismo, podendo matar o indivíduo (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008; NAKKA *et al.*, 2019). Sendo assim, o efeito final da ação do herbicida é a morte da planta daninha (KUVELJA *et al.*, 2021).

Para exercer toxicidade, o herbicida deve ser absorvido e ir para o local de ação, onde deve estar presente em concentrações adequadas e na forma tóxica adequada, por um período de tempo suficiente (CAREY; PENNER; KELLS, 1997; KUVELJA *et al.*, 2021). Também depende da época de aplicação, das condições climáticas, bem como do processo de desintoxicação das moléculas do herbicida. A desintoxicação ocorre por enzimas que convertem as moléculas de herbicidas em compostos inativos, que posteriormente a planta incorpora na membrana celular, acumula no vacúolo ou expela do citoplasma (KUVELJA *et al.*, 2021). Espécies tolerantes

desintoxicam rapidamente os herbicidas, transformando-os em compostos não-fitotóxicos pela ação do citocromo P450 monooxigenase, em reações de hidroxilação e glioxilação (CAREY; PENNER; KELLS, 1997).

A aplicação de herbicidas causa muitos problemas ambientais. Eles entram no ambiente através de fontes pontuais e não pontuais e são distribuídos em água, sedimentos, solo e biota (ZHOU *et al.*, 2007). Dos vários problemas ambientais causados pelos agrotóxicos, os mais comuns são a degradação da matéria orgânica, eutrofização de solos, contaminação de águas superficiais e de águas subterrâneas, redução da biodiversidade e da qualidade do solo e da água, morte de plantas urbanas devido à pulverização agrícola, redução da polinização por abelhas, bem como envenenamento e morte das mesmas (ALVARENGA, 2017).

O comportamento ambiental dos herbicidas é determinado pelas interações ocorridas nas interfaces herbicida-solo. Essas interações determinam principalmente a biodisponibilidade do herbicida, que influencia a sorção-dessorção, volatilização, transformação por agentes bióticos e abióticos, e a possibilidade de contaminação das águas subterrâneas e superficiais por lixiviação e escoamento (MARÍN-BENITO *et al.*, 2021; MENDES *et al.*, 2016).

Todos os praguicidas possuem certo grau de toxicidade para o homem e para outras espécies de animais e para plantas (DE OLIVEIRA JR; CONSTANTIN; INOUE, 2011), porém, a toxicidade proveniente dos herbicidas é considerada maior dentre os vários grupos de praguicidas (SHAHID; ZAIDI; KHAN, 2021).

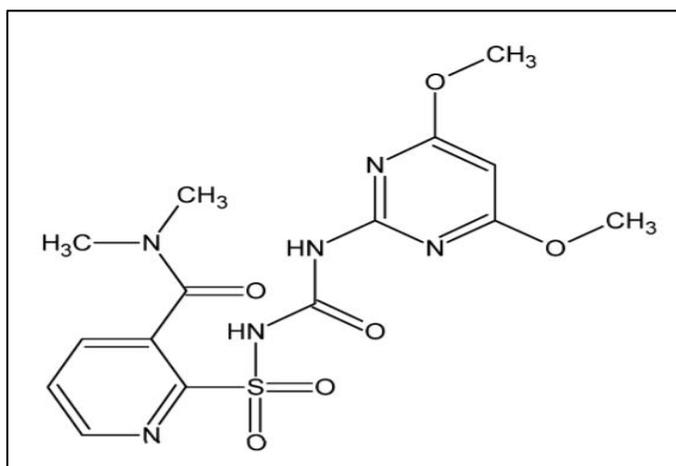
Embora a tendência atual seja de que os novos herbicidas lançados no mercado apresentem um menor grau de toxicidade, ainda existem preocupações com relação a sua toxicidade (DE OLIVEIRA JR; CONSTANTIN; INOUE, 2011, QU *et al.*, 2021).

2.5 Nicosulfuron

O herbicida Nicosulfuron (2-[(4,6-dimethoxypyrimidin-2-yl)carbamoil] sulfamoyl]-N,N-dimethylnicotinamide) ($C_{15}H_{18}N_6O_6S$) é pertencente ao grupo químico das sulfoniluréias. Ele é

caracterizado pela presença dos anéis piridina e pirimidina conectados à ponte de sulfoniluréia na molécula (Figura 1) (CAVALIERI *et al.*, 2008; DUGANDŽIĆ, *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2018).

Figura 1 – Estrutura química do Nicosulfuron.



Fonte: Adaptado de Regitano e Koskinen (2008).

Ele foi desenvolvido pela ISK Bioscience Corporation (JOLY *et al.*, 2013) e foi introduzido no mercado de milho nos EUA em 1990 (CAREY; PENNER; KELLS, 1997).

É utilizado como um herbicida seletivo para controle das ervas daninhas da cultura do milho (CHOE; WILLIAMS, 2020; LI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2018), sendo usado principalmente no controle de pós-emergência das ervas daninhas gramíneas anuais e perenes e algumas ervas daninhas de folhas largas (WANG *et al.*, 2018, ZHANG *et al.*, 2020). Segundo a bula do herbicida Nortox 40 SC (Nicosulfuron), as espécies de monocotiledôneas controladas pelo herbicida são: *Echinochloa crusgalli*, *Brachiaria decumbens*, *Cenchrus echinatus*, *Digitaria horizontalis*, *Brachiaria plantaginea*, *Sorghum halepense*, *Eleusine indica*, *Commelina benghalensis*. As espécies de eudicotiledôneas são: *Acanthospermum hispidum*, *Ageratum conyzoides*, *Alternanthera tenella*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus viridis*, *Bidens pilosa*,

Euphorbia heterophylla, *Ipomoea grandifolia*, *Leonurus sibiricus*, *Raphanus raphanistrum*, *Richardia brasiliensis*.

Suas moléculas são ativas tanto por meio da via foliar quanto via solo, translocando-se via apoplasto e simplasto (DE OLIVEIRA JR; CONSTANTIN; INOUE, 2011).

O mecanismo de ação do herbicida é a inibição da enzima acetolactato sintase (ALS) (também conhecida como aceto hidroxíácido sintase - AHAS), que é a primeira enzima comum na rota de biossíntese dos aminoácidos essenciais de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina nos cloroplastos. Essa enzima está presente em plantas, fungos, arqueias e bactérias, mas não em animais. Ela regula a síntese desses aminoácidos de acordo com a necessidade de utilização na síntese de proteínas e da quantidade disponível dos mesmos (CAREY; PENNER; KELLS, 1997; CAVALIERI *et al.*, 2008; DE OLIVEIRA JR; CONSTANTIN; INOUE, 2011; DIYANAT; GHASEMKHAN-GHAJAR, 2020; THIOUR-MAUPRIVEZ *et al.*, 2019).

Nas vias que levam à biossíntese de valina e leucina, a ALS catalisa a condensação de duas moléculas de piruvato para formar 2-acetolactato, enquanto que para a formação de isoleucina uma molécula de piruvato reage com 2-cetobutirato em uma reação semelhante, originando acetato hidroxibutirato (DURNER; GAILUS; BÖGER, 1991; SHANER; SINGH, 1993; THIOUR-MAUPRIVEZ *et al.*, 2019). Os inibidores da ALS podem se ligar à enzima ALS no local de entrada do substrato da ALS ou do canal de acesso ao substrato, reduzindo ou bloqueando a atividade da enzima (ZHOU *et al.*, 2007).

Os efeitos do herbicida podem resultar de um esgotamento direto dos produtos finais, do esgotamento de intermediários da via para alguns processos críticos ou do acúmulo de um substrato tóxico. Qualquer um ou todos esses mecanismos podem ser responsáveis pela morte da planta (SHANER; SINGH, 1993). O Nicosulfuron leva a uma rápida interrupção da divisão celular e crescimento das plantas suscetíveis. O crescimento é retardado ou inibido poucas horas após o contato com o herbicida, mas os sintomas físicos no campo podem levar mais tempo para se desenvolver (DUUS; KRUSE; STREIBIG, 2018). Os sintomas de fitotoxicidade induzida pelo

herbicida em plantas sensíveis em condição de campo incluem displasia, raízes curtas, clorose e folhas encaracoladas (ZHANG *et al.*, 2021).

A biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina ocorre principalmente nos tecidos jovens. É por isso que o herbicida mata as plantas muito lentamente e os primeiros sintomas aparecem nos tecidos meristemáticos. Os tecidos maduros têm grupos maiores de aminoácidos, bem como reservas de proteínas que podem ser catabolizadas para aminoácidos, demorando mais a aparecerem os sintomas fitotóxicos nos tecidos maduros (ZHOU *et al.*, 2007).

O herbicida também pode diminuir o conteúdo de clorofila, causar danos aos aparelhos fotossintéticos, reduzir a taxa fotossintética líquida e a eficiência fotoquímica das plantas, inibindo, assim, o crescimento e o desenvolvimento das mesmas. Ele é um inibidor do sistema fotossintético e pode se ligar à proteína D1 no fotossistema II, onde prejudica a transferência de fotoelétrons. Com as taxas de transferência de fotoelétrons reduzidas, há o aumento do coeficiente de extinção fotoquímica e o fechamento do centro de reação PSII, diminuindo a proporção de energia de excitação disponível para a reação fotoquímica. Dessa forma, a capacidade de transferir fotoelétrons diminui e a capacidade de sintetizar ATP e NADPH é degradada. A diminuição na atividade de fotofosforilação afeta drasticamente o processo de assimilação do carbono (WANG *et al.*, 2021).

A especificidade e o espectro de espécies de plantas em que esse herbicida atua são variados (CAREY; PENNER; KELLS, 1997). A seletividade do herbicida para as culturas baseia-se nas diferentes taxas e processos de metabolização deste pelas plantas, na velocidade de absorção e de translocação nos vegetais, e a falta de desintoxicação metabólica do herbicida nas plantas (CAREY; PENNER; KELLS, 1997; CAVALIERI *et al.*, 2008).

O principal mecanismo das plantas na metabolização do Nicosulfuron parece ser a hidroxilação, que frequentemente resulta em desintoxicação do herbicida. No entanto, em alguns casos, reações de glicosilação são também requeridas para completar a desintoxicação (CAREY; PENNER; KELLS, 1997; CAVALIERI *et al.*, 2008). Já em espécies suscetíveis, esse processo de metabolismo é muito mais lento e menos extenso (CAREY; PENNER; KELLS, 1997).

As propriedades da enzima ALS também são fatores importantes que podem afetar a seletividade de herbicidas cujo modo de ação é a inibição dessa enzima (CAREY; PENNER; KELLS, 1997). Os metabólitos dos herbicidas sulfonilureias são inativos contra a ALS das plantas tolerantes, podendo o herbicida ser rapidamente metabolizado em produtos que não inibem a ALS. O nível de tolerância às sulfonilureias também pode estar relacionado à quantidade ou atividade específica da ALS presente nos tecidos. Diferenças que ocorrem naturalmente nos níveis de ALS a partir das raízes de certas raças de milho contribuem amplamente para respostas diferenciais *in vivo* (CAREY; PENNER; KELLS, 1997).

O Nicosulfuron pode ser classificado como persistente baixo a moderado no solo. Este composto não é volátil, é relativamente móvel e biodisponível no solo e na água, e é de degradação lenta (DUGANDŽIĆ *et al.*, 2017; JOLY, 2013). Apesar de sua baixa persistência, seus resíduos foram relatados em muitos materiais, como solo, águas superficiais e algumas culturas (DUGANDŽIĆ *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020). Este herbicida também pode causar poluição das águas subterrâneas devido à sua alta mobilidade no solo (ZHANG *et al.*, 2012). Uma vez nas águas subterrâneas ou nas águas superficiais, os compostos tenderão a persistir como composto-mãe, enquanto outros tenderão a hidrolisar (BATTAGLIN *et al.*, 2000).

Os resíduos de Nicosulfuron no solo e nos rios são degradados via hidrólise e atividade microbiana (WILLIAMS; HARVEY, 2000; WANG *et al.*, 2018). A hidrólise química quebra a ponte de sulfonilureia, resultando em derivados de sulfonamida e *s*-triazina. Uma via degradativa muito menos comum envolve rearranjo via contração da ponte. A dissipação do herbicida é influenciada não apenas pela estrutura química do herbicida parental, mas também pela matéria orgânica do solo, pH do solo e condições ambientais resultantes de combinações variáveis de umidade e temperatura, e ocorre lentamente em condições naturais (ASHBURN POPPELL; HAYES; MUELLER, 2008; SONG *et al.*, 2013). A degradação ocorre mais rapidamente em solos quentes, úmidos, com baixo teor de orgânicos e baixo pH (BATTAGLIN *et al.*, 2000). Os produtos da degradação podem persistir no solo por vários anos (DE LAFONTAINE *et al.*,

2014). Outros processos, como volatilização e fotólise, são relativamente insignificantes para sua degradação (SONG *et al.*, 2013).

O Nicosulfuron é amplamente utilizado em todo o mundo devido à sua baixa quantidade para a aplicação, alta atividade herbicida, amplo espectro de ação, boa seletividade e baixa toxicidade em mamíferos. No entanto, os riscos potenciais de contaminação ambiental, bem como os problemas de fitotoxicidade do Nicosulfuron, levantaram preocupações crescentes (ZHANG *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2015).

2.6 S-metolachlor

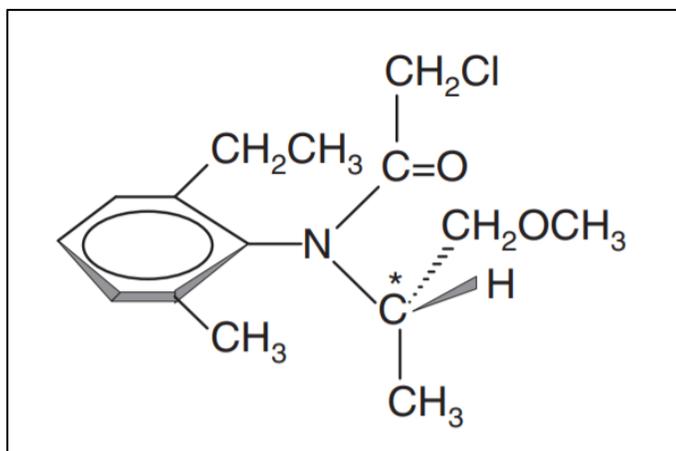
O S-metolachlor (2-cloro-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-[(1S)-2-metoxi-1-metiletil] acetamida) (FIGURA 2) é um composto não-iônico pertencente a família das cloroacetamidas. É o enantiômero ativo da molécula de metolachlor (DEMAILLY *et al.*, 2019; JOLY *et al.*, 2013).

O S-metolachlor é fisicamente e quimicamente equivalente ao metolachlor, mas foi enriquecido com o isômero *S* (ZEMOLIN *et al.*, 2014). Ele é composto de 88% de isômeros *S* e 12% de isômeros *R* (COPIN; PERRONET; CHÈVRE, 2016; MARÍN-BENITO *et al.*, 2021), resultantes de um avanço no sistema catalisador do processo de fabricação de metolachlor (que é composto por 50% de isômeros *R* e 50% *S*) (MARÍN-BENITO *et al.*, 2021; ZEMOLIN *et al.*, 2014), que aumenta sua atividade herbicida em plantas suscetíveis (QU *et al.*, 2021; ZEMOLIN *et al.*, 2014).

Esse herbicida foi desenvolvido pela Ciba-Geigy e comercializado sob o nome Dual Gold[®] pela Syngenta Agro SAS em 1997 (DEMAILLY *et al.*, 2019). No Brasil, o S-metolachlor (Dual Gold[®] 960 g a.i. L⁻¹) foi comercializado pela primeira vez em 1998 (ZEMOLIN *et al.*, 2014). O S-metolachlor é usado principalmente como herbicida pré-emergência e pós-emergência, no controle de várias gramíneas anuais e no controle parcial de algumas ervas daninhas de folhas largas com sementes pequenas, nas culturas de milho, soja, cana-de-açúcar, algodão e feijão (COPIN; PERRONET; CHÈVRE, 2016; RANGANI *et al.*, 2021; ZEMOLIN *et*

al., 2014). Sua ação é frequentemente concluída por herbicidas pós-emergência como o Nicosulfuron (JOLY *et al.*, 2013).

Figura 2 – Estrutura química do S-metolachlor.



Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2006).

É um herbicida com atividade tanto na raiz quanto na parte aérea (SIKKEMA; SHROPSHIRE; SOLTANI, 2009). Ele é absorvido pelas gramíneas durante a germinação principalmente através da parte aérea logo acima da semente, e pelas ervas daninhas de folha larga através da raiz e parte aérea (SIKKEMA *et al.*, 2007).

De acordo com a bula do herbicida Dual Gold (S-metolachlor), as espécies de monocotiledôneas controladas pelo herbicida são: *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria plantaginea*, *Cenchrus echinatus*, *Commelina benghalensis*, *Digitaria horizontalis*, *Digitaria insularis*, *Echinochloa crusgalli*, *Eleusine indica* e *Pennisetum setosum*. As eudicotiledôneas são: *Amaranthus deflexus*, *Amaranthus hybridus*, *Amaranthus viridis*, *Chamaecrista rotundifolia*, *Galinsoga parviflora*, *Nicandra physaloides*, *Richardia brasiliensis*, *Solanum americanum* e *Spermacoce latifolia*.

O modo de ação desse praguicida consiste em inibir vários processos biológicos nas zonas meristemáticas das plantas. Ele inibe a expressão do gene FAE1, que é responsável pelas elongases, que estão envolvidas no alongamento de ácidos graxos altamente insaturados (HUFA) e especialmente ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCFA) (com mais de 18 átomos de carbono) (VLCFA) em constituintes celulares vitais, especialmente membranas e compartimentos da parede celular, alterando sua integridade e função. A rigidez e a permeabilidade das células são reduzidas e, assim, a divisão celular é inibida prejudicando o desenvolvimento da parte aérea em plantas suscetíveis (COPIN; PERRONET; CHÈVRE, 2016; DEMAILLY *et al.*, 2019; MARONIC *et al.*, 2018; NEVES *et al.*, 2015).

O herbicida também pode inibir a biossíntese de proteínas, terpenóides e fenóis, e se liga a nucleófilos, como glutatona e cisteína, tendo, portanto, o potencial de alquilar (MARONIC *et al.*, 2018). Também afeta outras importantes vias responsáveis pela transformação do geranilgeranil pirofosfato em β -caroteno e α -caroteno, o que leva a plantas com maior predisposição ao estresse oxidativo (NEVES *et al.*, 2015).

Além disso, sua toxicidade está ligada à oxidação dos componentes das células, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como radicais ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxil ($\bullet OH$), alcoxil ($RO\bullet$) e peroxil ($ROO\bullet$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2). Em excesso, as espécies reativas de oxigênio podem alterar o metabolismo normal das células, danificando lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos fotossintéticos, levando à peroxidação lipídica, a danos à membrana e a inativação de enzimas, afetando muitos processos fisiológicos e a viabilidade celular (DEMAILLY *et al.*, 2019; MARONIC *et al.*, 2018).

O crescimento meristemático das plantas em germinação e na emergência de folhas também é inibido por esse herbicida (SIKKEMA; SHROPSHIRE; SOLTANI, 2009). Desse modo, pode-se dizer que o herbicida é inibidor do crescimento do meristema apical e da raiz. As plantas sensíveis são mortas antes da emergência, sem que haja inibição da germinação das

sementes, nem parada imediata do crescimento, porém o crescimento da raiz é menos sensível que o crescimento da parte aérea (KARAM *et al.*, 2003).

O efeito fitotóxico que pode ser observado em espécies de gramíneas suscetíveis em solos tratados com S-metolachlor são plantas que não emergem ou mostram-se malformadas e retorcidas, com folhas enroladas no verticilo, nas quais as folhas são enroladas firmemente na espiral e não podem se desenrolar adequadamente. Nas espécies de folhas largas suscetíveis, os sintomas são tipicamente folhas amassadas com aparência em forma de coração, folhas cloróticas e necróticas e, frequentemente, apresentam redução de crescimento (SIKKEMA *et al.*, 2007; ZEMOLIN *et al.*, 2014).

A tolerância das culturas ao S-metolachlor tem sido relacionada à taxa de metabolismo. Plantas tolerantes, comparadas a plantas suscetíveis, metabolizam rapidamente o herbicida através de reações de desintoxicação, em quantidades suficientes para impedir acúmulo e persistência em níveis fitotóxicos nas células vegetais. Isso ocorre pela clivagem do grupo éter metílico seguido pela conjugação com glicose ou conjugação do grupo cloroacetil com glutationa (GSH) ou homoglutationa em certas leguminosas. A absorção diferencial e a translocação também contribuem para a tolerância das plantas. Plantas susceptíveis translocam esse herbicida para o ponto de crescimento após a absorção pela raiz (KARAM *et al.*, 2003; ZEMOLIN *et al.*, 2014).

O S-metolachlor é uma molécula potencialmente perigosa para o meio ambiente. (DEMAILLY *et al.*, 2019). Ele pode facilmente contaminar as águas subterrâneas (MARÍN-BENITO *et al.*, 2021) e as águas superficiais pelo escoamento agrícola e, portanto, é frequentemente detectado em águas superficiais ou costeiras (ROZMÁNKOVÁ *et al.*, 2020), bem como em águas subterrâneas em muitos países (MARÍN-BENITO *et al.*, 2021). Também pode ser moderadamente tóxico para animais aquáticos (NEVES *et al.*, 2015).

O S-metolachlor é classificado como moderadamente tóxico (Classe III). Seus resíduos são classificados como persistentes (GUELFY *et al.*, 2018), devido a sua alta solubilidade em água (480 mg L⁻¹ a 20 °C) (GUELFY *et al.*, 2018; MARÍN-BENITO *et al.*, 2021), baixa pressão

de vapor ($1,73 \times 10^{-3}$ Pa a 20 °C) e grande meia-vida devido à sua lenta degradação por fotólise (70 dias de exposição à luz solar) ou hidrólise (30 dias em pH 5-9). No solo, ele é degradado pela ação microbiana em dois metabólitos principais: ácido metolacloro oxanílico (MOA) e ácido metolacloro etanossulfônico (MESA) (MARÍN-BENITO *et al.*, 2021 ROZMÁNKOVÁ *et al.*, 2020), que são móveis e persistentes no ambiente. Esses produtos de degradação são frequentemente detectados em concentrações mais altas do que o próprio composto original em amostras de água (ROZMÁNKOVÁ *et al.*, 2020). Seu grande uso e relativamente baixa adsorção no solo causam um considerável lançamento no lençol freático, comprometendo a qualidade da água (GUELFÍ *et al.*, 2018).

REFERÊNCIAS

- AGATHOKLEOUS, E.; CALABRESE, E. J. Environmental toxicology and ecotoxicology: How clean is clean? Rethinking dose-response analysis. **Science of The Total Environment**, p. 138769, 2020.
- AHMAD, T. *et al.* Removal of pesticides from water and wastewater by different adsorbents: a review. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 28, n. 4, p. 231-271, 2010.
- ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R. *et al.* Herbicide resistance in Brazil: Status, impacts, and future challenges. In: **Herbicides-Current Research and Case Studies in Use**. IntechOpen, 2020.
- ALENGEBAWY, A. *et al.* Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. **Toxics**, v. 9, n. 3, p. 42, 2021.
- ALI, I. *et al.* Modeling of fenuron pesticide adsorption on CNTs for mechanistic insight and removal in water. **Environmental research**, v. 170, p. 389-397, 2019.
- ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 71, n. 3, p. 706-710, 2008.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. *et al.* Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. *et al.* Evaluation of the antimutagenic potential of *Psidium guajava* L. extracts via plant bioassays. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 443-448, 2017.
- ARAGÃO, F. B. *et al.* Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, p. 111985, 2021.
- ASHBURN POPPELL, C.; HAYES, R. M.; MUELLER, T. C. Dissipation of nicosulfuron and rimsulfuron in surface soil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4581-4585, 2002.
- BANKS, J. E. *et al.* Time-varying vital rates in ecotoxicology: selective pesticides and aphid population dynamics. **Ecological Modelling**, v. 210, n. 1-2, p. 155-160, 2008.

- BATTAGLIN, W. A. *et al.* Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. **Science of the Total Environment**, v. 248, n. 2-3, p. 123-133, 2000.
- BHAT, S. A. *et al.* Biomonitoring of genotoxicity of industrial wastes using plant bioassays. **Bioresource Technology Reports**, v. 6, p. 207-216, 2019.
- CAREY, J. B.; PENNER, D.; KELLS, J. J. Physiological basis for nicosulfuron and primisulfuron selectivity in five plant species. **Weed Science**, v. 45, n. 1, p. 22-30, 1997.
- CARVALHO, M. S. S. *et al.* Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus spp.* in the plant model *Lactuca sativa*. **Scientia Horticulturae**, v. 245, p. 90-98, 2019.
- CAVALIERI, S. D. *et al.* Tolerância de híbridos de milho ao herbicida nicosulfuron. **Planta Daninha**, v. 26, n. 1, p. 203-214, 2008.
- CHAN-KEB, C. A. *et al.* Acute toxicity of water and aqueous extract of soils from Champotónriver in *Lactuca sativa* L. **Toxicology reports**, v. 5, p. 593-597, 2018.
- CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7-15, 2002.
- CHOE, E.; WILLIAMS, M. M. Expression and comparison of sweet corn CYP81A9s in relation to nicosulfuron sensitivity. **Pest management science**, v. 76, n. 9, p. 3012-3019, 2020.
- COPIN, P.-J.; PERRONET, L.; CHÈVRE, N. Modelling the effect of exposing algae to pulses of S-metolachlor: how to include a delay to the onset of the effect and in the recovery. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 257-267, 2016.
- DA SILVA, A. C. G. *et al.* Assessing Agricultural Toxicity in Brazil: Advances and Opportunities in the 21st Century. **Toxicological Sciences**, v. 177, n. 2, p. 316-324, 2020.
- DE LAFONTAINE, Y. *et al.* Sulfonylurea herbicides in an agricultural catchment basin and its adjacent wetland in the St. Lawrence River basin. **Science of the Total Environment**, v. 479, p. 1-10, 2014.
- DEMAILLY, F. *et al.* Impact of diuron and S-metolachlor on the freshwater diatom *Gomphonema gracile*: Complementarity between fatty acid profiles and different kinds of ecotoxicological impact-endpoints. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 960-969, 2019.

DE OLIVEIRA JR, R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. *Biologia e manejo de plantas daninhas*. Curitiba, Brasil: **Omnipax**, 2011.

DE QUEIROZ, V. T. *et al.* Environmental risk assessment for sustainable pesticide use in coffee production. **Journal of contaminant hydrology**, v. 219, p. 18-27, 2018.

DE SOUZA, R. M. *et al.* Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 135, p. 22-37, 2020.

DIAS, M. A. *et al.* Quantification and risk assessment of pesticides in southern Brazilian air samples using low-volume sampling and rapid ultrasound-assisted extraction. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 23, n. 3, p. 467-479, 2021.

DUGANDŽIĆ, A. M. *et al.* Effect of inorganic ions, photosensitisers and scavengers on the photocatalytic degradation of nicosulfuron. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 336, p. 146-155, 2017.

DURNER, J.; GAILUS, V.; BÖGER, P. New aspects on inhibition of plant acetolactate synthase by chlorsulfuron and imazaquin. **Plant physiology**, v. 95, n. 4, p. 1144-1149, 1991.

DIYANAT, M.; GHASEMKHAN-GHAJAR, F.. Integrated weed control in corn (*Zea mays* L.) through combinations of seed priming and reduced dosages of various commonly used herbicides. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research (IJABBR)**, v. 8, n. 3, p. 290-301, 2020.

EGUREFA, S. O.; ORJI, M. U.; UBA, B. O. Toxic effect of refinery industrial effluent using three toxicity bioassays. **South Asian Journal of Research in Microbiology**, p. 10-23, 2020.

FALLAH, Z. *et al.* Toxicity and remediation of pharmaceuticals and pesticides using metal oxides and carbon nanomaterials. **Chemosphere**, p. 130055, 2021.

FÜLL, C.; JUNG, S.; SCHULTE, C. Plant protection products: assessing the risk for terrestrial plants. **Chemosphere**, v. 41, n. 4, p. 625-629, 2000.

GARCÍA-MEDINA, S. *et al.* The relationship between cyto-genotoxic damage and oxidative stress produced by emerging pollutants on a bioindicator organism (*Allium cepa*): The carbamazepine case. **Chemosphere**, p. 126675, 2020.

GOMES, H. de O. *et al.* A socio-environmental perspective on pesticide use and food production. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 197, p. 110627, 2020.

- GUELFY, D. R. V. *et al.* Degradation of herbicide S-metolachlor by electrochemical AOPs using a boron-doped diamond anode. **Catalysis Today**, v. 313, p. 182-188, 2018.
- GOVEA, K. P. *et al.* Response of *LACTUCA SATIVA* L. 'baba de verao' exposed to different substrates for laboratory bioassays. **Pakistan Journal of Botany**, v. 52, n. 5, p. 1625-1629, 2020.
- GRAHOVAC, N. L. *et al.* Determination of residues of sulfonylurea herbicides in soil by using microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatographic method. _ **HEMIJSKA INDUSTRIJA**, v. 71, n. 4, p. 289-298, 2017.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. ISO 18763: **Soil quality -Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants**, 2016.
- JOLY, P. *et al.* Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2444-2450, 2013.
- KARAM, D. *et al.* Características do herbicida S-Metolachlor nas culturas de milho e sorgo. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2003.
- KUMAR, R. *et al.* Impact of Pesticide Toxicity in Aquatic Environment. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 10131-10140, 2021.
- KUVELJA, A. *et al.* Impact of nicosulfuron on biochemical markers of oxidative stress in maize leaves and roots. **Biljni lekar**, v. 49, n. 2, p. 201-217, 2021.
- LAUE, H. *et al.* PeBiToSens™: A Platform for PBT Screening of Fragrance Ingredients Without Animal Testing. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 168-175, 2020.
- LANZERSTORFER, P. *et al.* Acute, reproductive, and developmental toxicity of essential oils assessed with alternative *in vitro* and *in vivo* systems. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 2, p. 673-691, 2021.
- LEBLANC, G. A. Noções básicas de toxicologia ambiental. **Um livro de toxicologia moderna**, p. 463, 2004.
- LE BELLEC, F. *et al.* Helping farmers to reduce herbicide environmental impacts. **Ecological Indicators**, v. 54, p. 207-216, 2015.

LI, M. et al. Insight into the characteristics and new mechanism of nicosulfuron biodegradation by a *Pseudomonas* sp. LAM1902. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 3, p. 826-837, 2020.

LIU, H. et al. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 63, n. 3, p. 451-455, 2006.

LIU, W. et al. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. **Chemosphere**, v. 61, n. 2, p. 158-167, 2005.

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.

MACAGNO, J.; LESCANO, M. R.; BERLI, C. L. A. Milli-channel array for direct and quick reading of root elongation bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 178, p. 51-57, 2019.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. **Embrapa Cerrados - Documentos (INFOTECA-E)**, 2008.

MARÍN-BENITO, J. M. et al. The role of two organic amendments to modify the environmental fate of S-metolachlor in agricultural soils. **Environmental Research**, v. 195, p. 110871, 2021.

MARONIĆ, D. Š. et al. S-metolachlor promotes oxidative stress in green microalga *Parachlorella kessleri* - A potential environmental and health risk for higher organisms. **Science of the total environment**, v. 637, p. 41-49, 2018.

MENDES, K. F. et al. Sorption and desorption of mesotrione alone and mixed with S-metolachlor+ terbuthylazine in Brazilian soils. **Geoderma**, v. 280, p. 22-28, 2016.

MIKÓ, Z. et al. Choice of experimental venue matters in ecotoxicology studies: comparison of a laboratory-based and an outdoor mesocosm experiment. **Aquatic Toxicology**, v. 167, p. 20-30, 2015.

MOJIRI, A. et al. Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. **Chemosphere**, p. 126646, 2020.

MOORE, Michael N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology. **Aquatic toxicology**, v. 59, n. 1-2, p. 1-15, 2002.

NAKKA, S. *et al.* Herbicide resistance: Development of wheat production systems and current status of resistant weeds in wheat cropping systems. **The Crop Journal**, v. 7, n. 6, p. 750-760, 2019.

NEHRA, M. *et al.* Emerging nanobiotechnology in agriculture for the management of pesticide residues. **Journal of Hazardous Materials**, p. 123369, 2020.

OECD, Guidelines for the testing of chemicals Test No. 208: **Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test**, 2006.

PALMIERI, M. J. *et al.* Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 763, p. 30-35, 2014.

PALMIERI, M. J. *et al.* Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: a comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 133, p. 442-447, 2016.

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.

PEDLOWSKI, M. A. *et al.* Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. **Crop Protection**, v. 31, n. 1, p. 113-118, 2012.

PINHO, I. A. *et al.* Phytotoxicity assessment of olive mill solid wastes and the influence of phenolic compounds. **Chemosphere**, v. 185, p. 258-267, 2017.

PRIAC, A.; BADOT, P-M.; CRINI, G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, v. 340, n. 3, p. 188-194, 2017.

QU, Q. *et al.* Effects of S-metolachlor on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling root exudates and the rhizosphere microbiome. **Journal of Hazardous Materials**, v. 411, p. 125137, 2021.

QU, R. *et al.* Where are the new herbicides?. **Pest Management Science**, 2021.

RANGANI, G. *et al.* Mechanism of Resistance to S-metolachlor in *Palmer amaranth*. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 392, 2021.

REGITANO, J. B.; KOSKINEN, W. C. Characterization of nicosulfuron availability in aged soils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 14, p. 5801-5805, 2008.

REPETTO, G. *et al.* A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. 4-5, p. 503-509, 2001.

ROZMÁNKOVÁ, E. *et al.* Environmentally relevant mixture of S-metolachlor and its two metabolites affects thyroid metabolism in zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 221, p. 105444, 2020.

SANG, N. *et al.* Landfill leachate affects metabolic responses of *Zea mays* L. seedlings. **Waste management**, v. 30, n. 5, p. 856-862, 2010.

SANTIN-MONTANYA, I. *et al.* Bioassay for determining sensitivity to sulfosulfuron on seven plant species. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 41, n. 6, p. 781-793, 2006.

SHAHID, M.; ZAIDI, A.; KHAN, M. S. Modulations in growth, structure, cell viability and antioxidant enzyme of a nodule bacterium *Mesorhizobium ciceri* induced by pesticides. **Environment, Development and Sustainability**, v. 23, n. 3, p. 4103-4119, 2021.

SHANER, D. L.; SINGH, B. K. Phytotoxicity of acetohydroxyacid synthase inhibitors is not due to accumulation of 2-ketobutyrate and/or 2-aminobutyrate. **Plant Physiology**, v. 103, n. 4, p. 1221-1226, 1993.

SIKKEMA, P. H.; SHROPSHIRE, C.; SOLTANI, N. Response of dry bean to pre-plant incorporated and pre-emergence applications of S-metolachlor and fomesafen. **Crop Protection**, v. 28, n. 9, p. 744-748, 2009.

SIKKEMA, P. H. *et al.* Effect of s-metolachlor application timing on cabbage tolerance. **Crop Protection**, v. 26, n. 12, p. 1755-1758, 2007.

SILVEIRA, G. L. *et al.* Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

SONG, J. *et al.* Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1. **Bioresource technology**, v. 140, p. 243-248, 2013.

TARAZONA, J. V.; DOHMEN, G. P. Ecotoxicology of rice pesticides. In: **Pesticide Risk Assessment in Rice Paddies**. Elsevier, 2008. p. 69-90.

THIOUR-MAUPRIVEZ, C. *et al.* Effects of herbicide on non-target microorganisms: Towards a new class of biomarkers?. **Science of the Total Environment**, v. 684, p. 314-325, 2019.

TORRES RODRÍGUEZ, M. T. Empleo de los ensayos con plantas en el control de contaminantes tóxicos ambientales. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, v. 41, n. 2-3, p. 0-0, 2003.

VALERIO, M. E.; GARCÍA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of the Total Environment**, v. 378, n. 1-2, p. 63-66, 2007.

VERMA, S.; SRIVASTAVA, A. Cyto-genotoxic consequences of carbendazim treatment monitored by cytogenetical analysis using *Allium* root tip bioassay. **Environmental monitoring and assessment**, v. 190, n. 4, p. 238, 2018.

VIERA, M. S. *et al.* Multiresidue determination of pesticides in crop plants by the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry using a calibration based on a single level standard addition in the sample. **Journal of Chromatography A**, v. 1526, p. 119-127, 2017.

WANG, J. *et al.* Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activity, and gene expression patterns in a pair of nearly isogenic lines of nicosulfuron-exposed waxy maize (*Zea mays* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 19012-19027, 2018.

WANG, J. *et al.* Adaptation responses in C4 photosynthesis of sweet maize (*Zea mays* L.) exposed to nicosulfuron. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 214, p. 112096, 2021.

WILLIAMS, B. J.; HARVEY, R. G. Effect of Nicosulfuron Timing on Wild-Proso Millet (*Panicum miliaceum*) Control in Sweet Corn (*Zea mays*). **Weed technology**, v. 14, n. 2, p. 377-382, 2000.

WORTH, A. P. Types of toxicity and applications of toxicity testing. In: **The History of Alternative Test Methods in Toxicology**. Academic Press, 2019. p. 7-10.

ZHANG, H. *et al.* Biodegradation of nicosulfuron by the bacterium *Serratia marcescens* N80. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 47, n. 3, p. 153-160, 2012.

ZHANG, Y. *et al.* Protective efficacy of phenoxyacetyl oxazolidine derivatives as safeners against nicosulfuron toxicity in maize. **Pest Management Science**, v. 77, n. 1, p. 177-183, 2021.

ZHANG, Z. *et al.* Studies on the interactions between nicosulfuron and degradation enzymes. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 99-103, 2020.

ZHAO, W. *et al.* Biodegradation of nicosulfuron by a novel *Alcaligenes faecalis* strain ZWS11. **Journal of Environmental Sciences**, v. 35, p. 151-162, 2015.

ZHENG, W.; YATES, S. R.; PAPIERNIK, S. K. Transformation kinetics and mechanism of the sulfonyleurea herbicides pyrazosulfuron ethyl and halosulfuron methyl in aqueous solutions. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7367-7372, 2008.

ZHOU, Q. *et al.* Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 2, p. 89-96, 2007.

ARTIGO 1

**FITO-CITO-GENOTOXICIDADE DE UM HERBICIDA À BASE DE NICOSULFURON
NAS PLANTAS MODELO *Lactuca sativa* L. E *Zea mays* L.**

**PHY-CITO-GENOTOXICITY OF A NICOSULFURON-BASED HERBICIDE IN THE
MODEL PLANT *Lactuca sativa* L. AND *Zea mays* L.**

RESUMO

A toxicidade dos herbicidas é um fator preocupante, ainda mais quando levamos em consideração que o Brasil é o primeiro no ranking de consumo de agrotóxicos. Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de um herbicida à base de Nicosulfuron por meio de bioensaios com os modelos vegetais *Lactuca sativa* L. (alface) e *Zea mays* L. (milho). As soluções empregadas para os testes foram preparadas a partir de produtos comerciais contendo o princípio ativo Nicosulfuron. Foram realizadas análises macroscópicas para todas as espécies (germinação e crescimento) e microscópicas (alterações cromossômicas e nucleares) em *L. sativa*. Nas análises macroscópicas, foi avaliado o número de sementes germinadas a cada 8 h, até completar um total de 48 h para a alface, e 72 h para o milho. Após 96 h, o comprimento das raízes e da parte aérea das duas espécies foi aferido com um paquímetro digital. Nas análises microscópicas foram avaliados o ciclo celular, alterações cromossômicas, presença de micronúcleos e de núcleos condensados. Foi observado que o Nicosulfuron afetou negativamente a germinação das sementes da alface. Na velocidade da germinação, também houve interferência negativa. Houve redução no crescimento da raiz e da parte aérea da alface em todas as concentrações, quando comparado ao controle. O herbicida também afetou o índice mitótico da alface. Não provocou alterações cromossômicas, nem de núcleos condensados, mas induziu a formação de micronúcleos. No milho, o herbicida apresentou interferência negativa na germinação, na velocidade de germinação, no crescimento da raiz e da parte aérea, bem como afetou o desenvolvimento das plântulas estatisticamente. Os dados mostram que o herbicida Nicosulfuron possui potencial tóxico, uma vez que foi capaz de inibir o desenvolvimento dos modelos vegetais testados.

Palavras Chave: Agrotóxicos. Ecogenotoxicidade. Micronúcleo. Germinação. Desenvolvimento Inicial.

ABSTRACT

Considering the planted area, in hectares, corn is the second crop most cultivated in Brazil. Chemical control of weeds associated with their cultivation is performed with herbicides within pre and post emergence action, such as S-metolachlor. Brazil is the first country in the ranking of pesticide consumption, thus toxicity of herbicides is a task of great concern. . In this sense, this work aimed to evaluate the effects of an herbicide based on S-metolachlor through bioassays with the plant models *Lactuca sativa* L. (lettuce) and *Zea mays* L. (maize). The tested solutions were prepared from commercial product containing the active ingredient S-metolachlor, in the following concentrations: 7.5; 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600 and 720 mg / L⁻¹. Distilled water was used as a negative control and aluminum as a positive control. The seeds of each plant model were placed in petri dishes and submitted to tested solutions . Then, the petri dishes were kept in a B.O.D. (Biochemistry Oxigen Demand) at 24 °C, without photoperiod. The macroscopic analyzes (ge rmination and growth) were performed forwtwot species and the microscopic (chromosomal and nuclear changes) in *L. sativa*. It was observed a negative interference of S-metolachlor-based herbicide on lettuce in all macroscopic and microscopic parameters tested. In maize, there was no significant interference in germination, however, in germination speed index, root and shoot growth, as far as a seedling development there was negative interference. The data demonstrate that the herbicide based on S-metolachlor has toxic potential, as it showed phytotoxicity in the tested plant models.

Keywords: Pesticides. Ecogenotoxicity. Micronucleus. Germination. Initial Development.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo. Também é apontado como o país que mais utiliza agrotóxicos proibidos em países que tem ampla preocupação com o meio ambiente (ALVARENGA, 2017; DA SILVA *et al.*, 2020). Os agrotóxicos mais utilizados na agricultura brasileira são consumidos nas culturas de soja (52,2%), cana-de-açúcar (11,7%), milho (10,6%) e algodão (6,7%) (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ *et al.*, 2020).

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo (GALIANO-CARNEIRO *et al.*, 2021), sendo esta a segunda maior cultura do país (ALCÁNTARA-DE LA CRUZ *et al.*, 2020). Para o milho, o controle químico de ervas daninhas é geralmente realizado com herbicidas de pré e pós-emergência (PANNACCI COVARELLI, 2009).

Um dos herbicidas utilizados no cultivo do milho é o Nicosulfuron. Ele é um herbicida do grupo da sulfonilureia, usado no controle das ervas daninhas pós-emergência como gramíneas anuais e perenes e algumas ervas daninhas de folhas largas (LI *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020). É um herbicida sistêmico seletivo, absorvidos pelas folhas e raízes, com translocação rápida no xilema e floema para os tecidos meristemáticos (DUGANDŽIĆ, 2017; JOLY, 2013). O mecanismo de ação desse herbicida consiste no bloqueio da biosíntese de isoleucina, leucina e valina, pela inibição da aceto-lactato sintase, que leva a redução da taxa de divisão celular e do crescimento da planta alvo (KUVELJA *et al.*; 2021). Este composto não é volátil e é relativamente móvel e biodisponível no solo e na água (DUGANDŽIĆ, 2017; WANG *et al.*, 2020).

O Nicosulfuron é amplamente utilizado em todo o mundo devido à necessidade de baixa quantidade para a aplicação, alta atividade herbicida, amplo espectro de ação, boa seletividade e baixa toxicidade em mamíferos. No entanto, com a extensiva aplicação desse herbicida, já há relatos de resíduos deste princípio ativo no solo e nas águas superficiais. Os riscos potenciais de contaminação ambiental, bem como os problemas de fitotoxicidade do Nicosulfuron, tem recebido atenção considerável (ZHANG *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2015).

A toxicidade dos herbicidas pode ser acessada usando bioensaios vegetais em que a germinação de sementes e o crescimento radicular de espécies modelos são adotados como indicadores. Tal abordagem envolve a exposição das sementes da planta modelo a um agente potencialmente tóxico, estabelecendo subsequentemente o número de sementes germinadas, bem como a extensão do alongamento da raiz e da parte aérea (LIU *et al.*, 2012; PALMIERI *et al.*, 2014).

A germinação e o crescimento radicular são variáveis que podem ser associadas a ensaios citogenéticos. O índice mitótico é um parâmetro confiável para determinar a presença de compostos citotóxicos (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; ARAGÃO *et al.*, 2021), bem como a análise da frequência de diferentes tipos de alterações cromossômicas ampliam informações sobre a ação de elementos potencialmente genotóxicos (ARAGÃO *et al.*, 2021; KOTELNIKOVA *et al.*, 2019).

Esses ensaios com plantas vasculares são particularmente interessantes para a avaliação dos efeitos adversos de um composto tóxico, pois são testes considerados simples, rápidos, confiáveis e econômicos (ARAGÃO *et al.*, 2021; EGUREFA; ORJI; UBA, 2020; PALMIERI *et al.*, 2014), uma vez que a raiz é o primeiro órgão a entrar em contato com o substrato ou solução contendo a substância a ser analisada (ARAGÃO *et al.*, 2021; PALMIERI *et al.*, 2014) e há ainda relação com a toxicidade em modelos animais, incluindo humanos (DOS REIS *et al.*, 2017). Diante do exposto, esse trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos de um herbicida à base de Nicosulfuron no desenvolvimento inicial dos modelos vegetais *Lactuca sativa* L. e *Zea mays* L., através de bioensaios macroscópicos e microscópicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As espécies utilizadas como modelo vegetal foram *Lactuca sativa* L. var. Grandes Lagos (alface) e *Zea mays* L. (milho) (Cultivar UFLA JM100). A aquisição das sementes de alface foi feita em casas agrocomerciais locais e as de milho foram cedidas pela Universidade Federal de Lavras.

As sementes foram dispostas em placas de Petri de polietileno de 9 cm de diâmetro, revestidas com papel alumínio, contendo papel filtro embebido nas soluções testadas, sendo aplicado 3 mL para a alface e 5 mL para o milho. As placas foram armazenadas em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à temperatura de 24 °C, sem fotoperíodo (NARWAL; SAMPIETRO; CATALÁN, 2009).

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com cinco repetições, cada uma correspondente a uma placa de Petri com 25 sementes para a alface e 15 sementes para o milho.

2.2 Soluções para os testes

As soluções empregadas para os testes foram preparadas a partir de produtos comerciais, adquiridos em casas agrocomerciais locais, que continha o princípio ativo estudado. Foi utilizado o herbicida Nortox 40SC contendo 40,00 g/L de Nicosulfuron. Para os testes, a partir do Nortox, foram preparadas 10 concentrações diferentes (0,3; 0,6; 1,3; 2,3; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 mg/L) dissolvendo o herbicida em água destilada, sendo a concentração de 5,0 mg/L a indicada para uso pelo fabricante. A água destilada foi utilizada como controle negativo e o alumínio (10^{-3} M) (preparado a partir do sal $KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$), conhecido por ter efeito principal no crescimento da planta, como controle positivo.

2.3 Testes Macroscópicos

A germinação das duas espécies foi avaliada anotando o número de sementes germinadas (que apresentaram a protrusão da raiz), a cada 8 h, até completar um total de 48 h para a alface, e

72 h para o milho. Após 96 h, o comprimento das raízes e da parte aérea das duas espécies foi aferido com um paquímetro digital. Os parâmetros analisados (percentual de germinação e índice de velocidade de germinação) foram calculados segundo Aragão *et al.* (2021).

2.4 Testes Microscópicos

Os testes microscópicos foram realizados com *Lactuca sativa* L. As raízes foram coletadas após 96h de tratamento, fixadas em solução Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1), e armazenadas a -4 °C, por pelo menos 24 h. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento (BELLING, 1921). As raízes foram hidrolisadas em HCl 1mol L⁻¹ durante 9 - 10min, em banho maria a 60 °C. Em seguida, foram expostas ao Reativo de Shiff, no escuro, por 1h30min. Para a montagem das lâminas, foi utilizado carmim acético 2%. Para cada tratamento foram preparadas 5 lâminas, cada uma proveniente de uma Placa de Petri (repetição). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, na objetiva de 40X, onde foram contabilizadas 1000 células por lâmina. As diferentes fases da divisão mitótica, possíveis alterações cromossômicas e nucleares observadas foram anotadas. Com os dados obtidos foi calculado o índice mitótico (razão entre o número de células em divisão - prófase, metáfase, anáfase e telófase - e total de células avaliadas em cada tratamento), a frequência de alterações cromossômicas e de núcleos condensados e de micronúcleos.

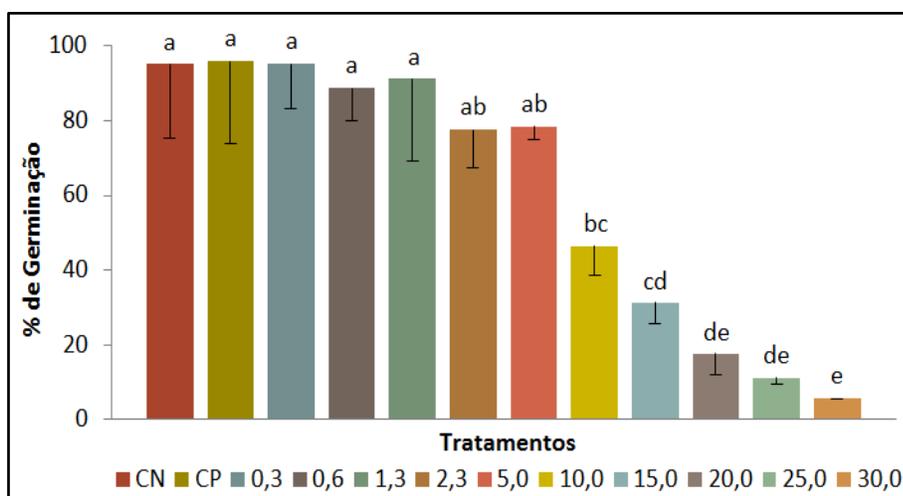
2.5 Análises Estatísticas

Para verificar a diferença entre os tratamentos, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($\alpha = 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

3 RESULTADOS

Foi observado que o herbicida Nicosulfuron afetou a germinação das sementes de alface, quando comparado ao controle negativo (água), a partir da concentração de 10,0 mg/L, visto que inibiu mais de 50% da germinação (FIGURA 1).

Figura 1 – Germinação de *Lactuca sativa*.



Legenda: germinação das sementes de *L. sativa* com 48 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

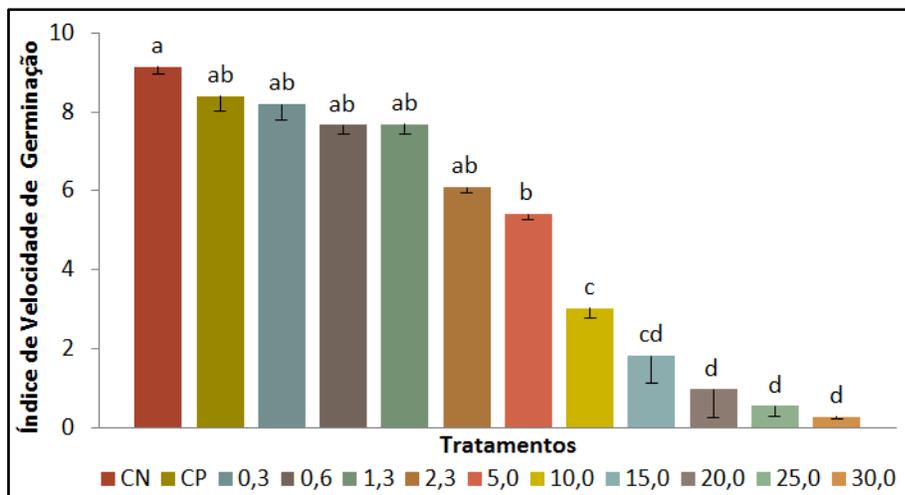
Fonte: Do autor (2021).

Também foi observado que o herbicida interferiu negativamente na velocidade da germinação, principalmente a partir da concentração de 5,0 mg/L (dosagem recomendada para uso pelo fabricante (FIGURA 2)).

Quanto ao crescimento da raiz da alface, houve redução em todas as concentrações testadas comparado ao controle negativo (FIGURA 3). Na dosagem de 5,0 mg/L (dosagem recomendada para uso pelo fabricante) houve cerca de 65% de redução. Nas dosagens de 15,0 a

25,0 mg/L houve mais de 80% de redução, e na dosagem de 30 mg/L houve mais de 90% de redução.

Figura 2 – Índice de velocidade de germinação de *Lactuca sativa*.

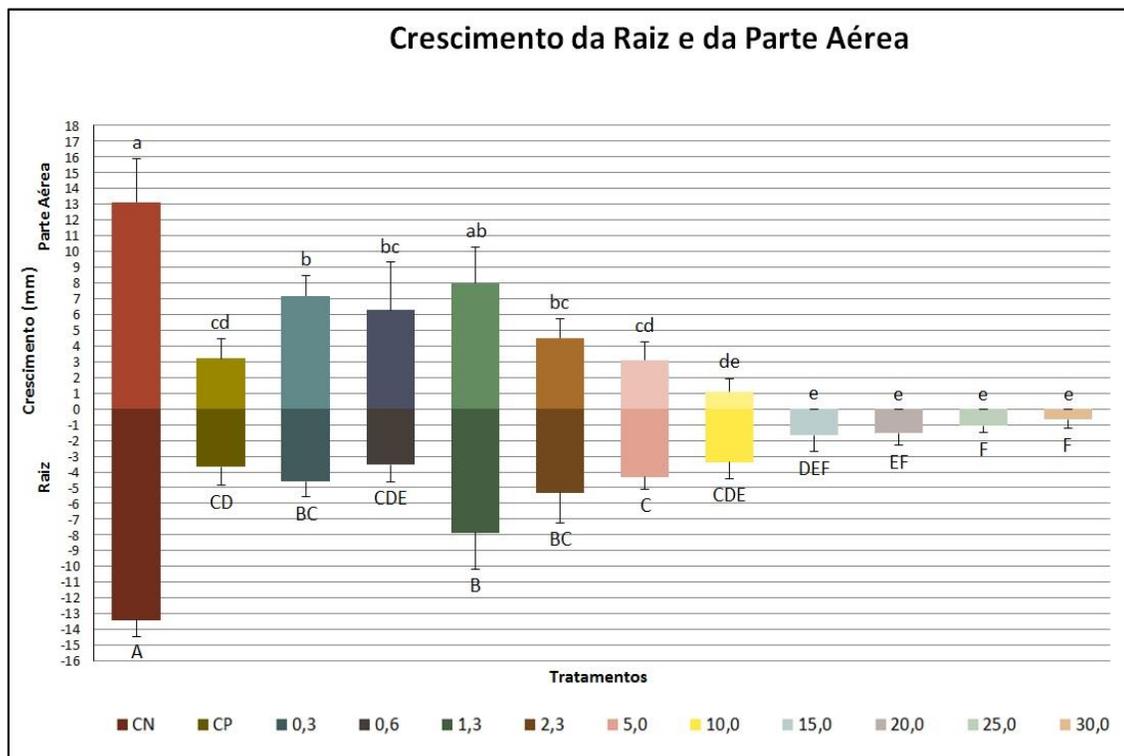


Legenda: índice de velocidade de germinação das sementes de *L. sativa* com 48 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2021).

O herbicida também interferiu no crescimento da parte aérea (FIGURA 3). Na dosagem de 5,0 mg/L (dosagem recomendada para uso pelo fabricante) houve mais de 75% de redução. Nas concentrações de 15 a 30 mg/L não houve desenvolvimento da parte aérea.

No desenvolvimento da plântula, o herbicida afetou seu desenvolvimento em todas as concentrações, principalmente nas concentrações de 15 a 30 mg/L, onde interferiu em mais de 90% (FIGURA 3). Na dosagem de 5,0 mg/L (dosagem recomendada para uso pelo fabricante) houve cerca de 70% de redução.

Figura 3 – Desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

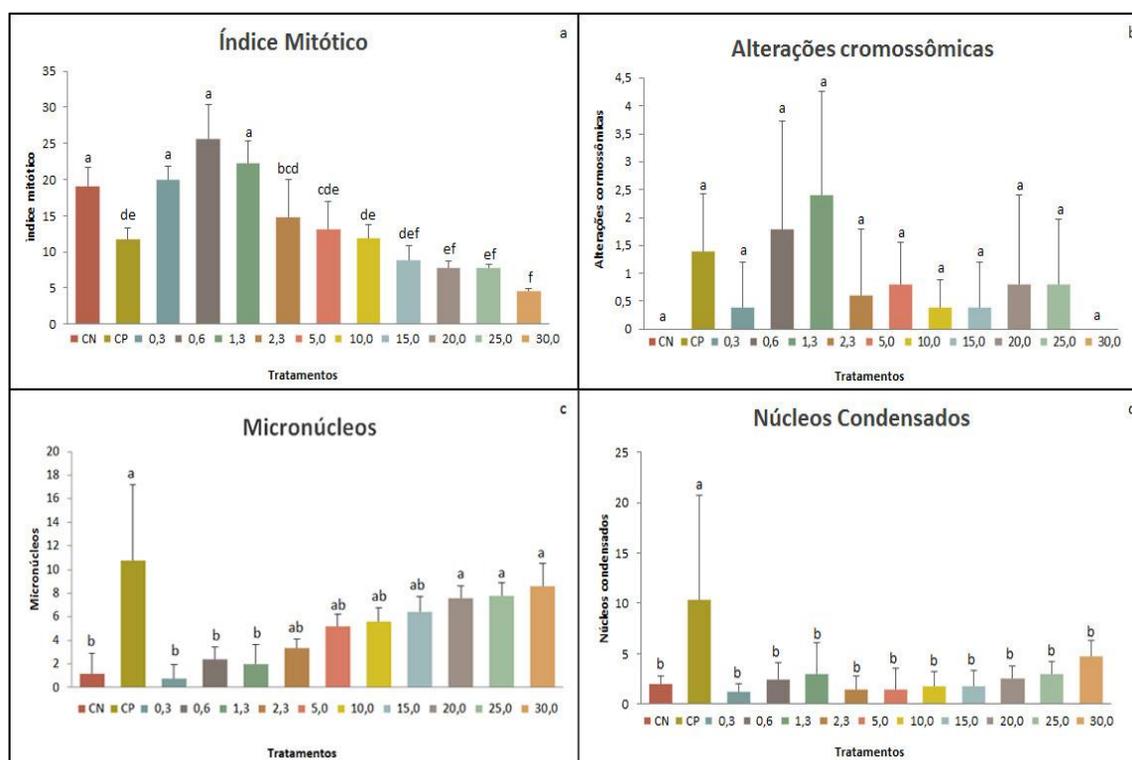
Legenda: crescimento da raiz e da parte aérea das plântulas mensuradas com 96 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2021).

Com relação às análises do ciclo celular da alface, foi observado que houve interferência do herbicida no índice mitótico, quando comparado ao controle negativo, a partir da concentração de 2,3 mg/L, onde houve redução de 25% no índice mitótico, e a medida que a concentração aumentava, o índice mitótico diminuía, mostrando efeito inibitório dose-dependente. Nas concentrações seguintes, de 5,0 e 10,0 mg/L, houve redução em mais de 30%. A partir da concentração de 15,0 mg/L, houve mais de 50% de redução, sendo que nas concentrações de 20,0

e 25,0 mg/L a redução foi de mais de 60% e na concentração de 30,0 a redução foi mais de 75% (FIGURA 4 – a).

Figura 4 – Índice mitótico, alterações cromossômicas, micronúcleos e núcleos condensados observados nas células meristemáticas de *L. sativa*.



Legenda: Legenda: (a) - frequência média do índice mitótico; (b) - frequência média de alterações cromossômicas; (c) - frequência média de micronúcleos; e (d) - frequência média de núcleos condensados. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2021).

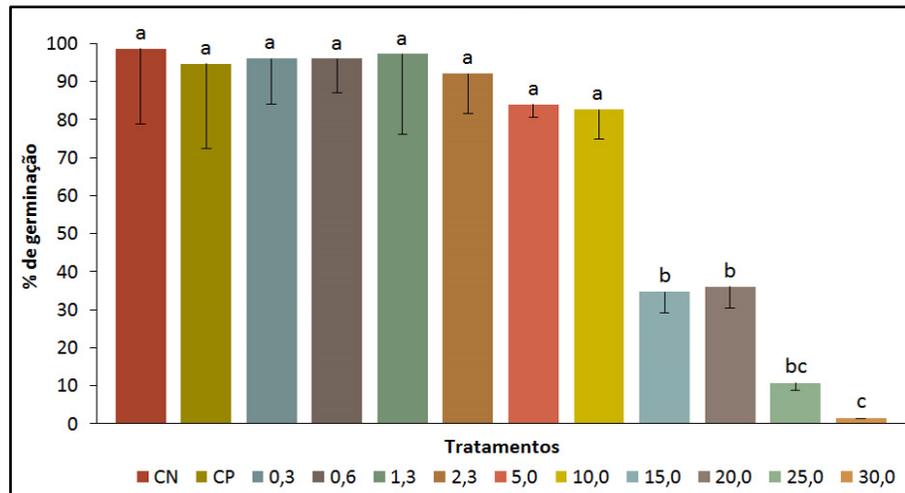
Quanto às alterações cromossômicas observadas, não houve diferença significativa estatisticamente entre os tratamentos e o controle negativo (FIGURA 4 – b). As alterações

cromossômicas encontradas durante a análise do ciclo celular foram: c-metáfases, cromossomos aderentes, cromossomos não orientados à placa e pontes.

Em relação aos micronúcleos encontrados em células de alface, foi observado que à medida que as concentrações aumentavam, a frequência de micronúcleos também aumentava, quando comparado ao controle negativo (FIGURA 4 – c).

A respeito dos núcleos condensados, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos e o controle negativo (FIGURA 4 – d).

Figura 5 – Germinação de *Zea mays*.



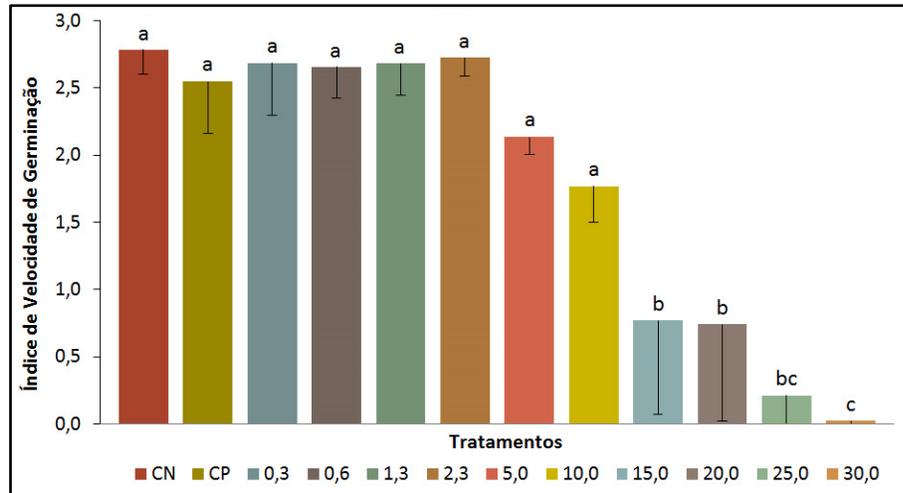
Legenda: germinação das sementes com 72 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2021).

No milho, o Nicosulfuron interferiu na germinação a partir da concentração de 15,0 mg/L (FIGURA 5). Houve interferência em mais de 60% na concentração de 15,0 e 20,0 mg/L. Nas concentrações de 25,0 mg/L⁻¹ e 30,0 houve mais de 90% de interferência.

Na velocidade de germinação, também foi observada interferência nas concentrações de 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 mg/L, quando comparado ao controle (FIGURA 6).

Figura 6 – Índice de velocidade de germinação de *Zea mays*.



Legenda: índice de velocidade de germinação das sementes com 72 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

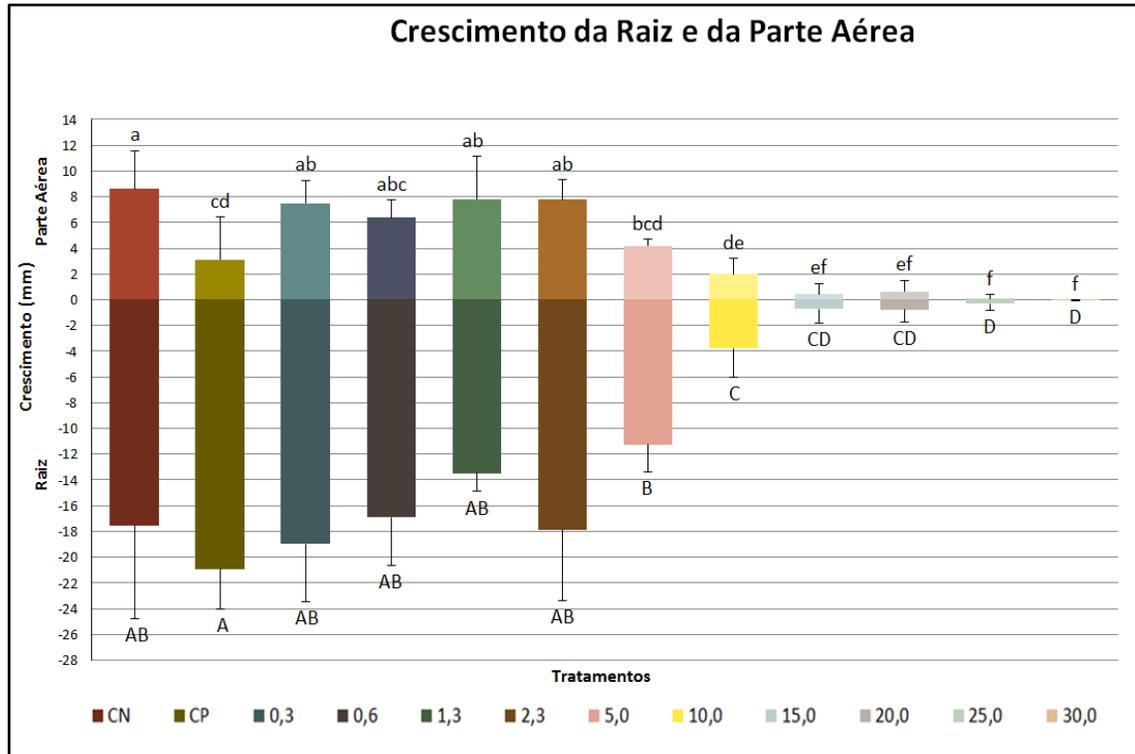
Fonte: Do autor (2021).

No crescimento da raiz houve interferência a partir da concentração de 5,0 mg/L (FIGURA 7), que é dosagem recomendada para uso pelo fabricante. Nas concentrações de 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0 mg/L houve mais de 90% de interferência no desenvolvimento.

O herbicida também interferiu no crescimento da parte aérea, principalmente nas maiores dosagens (10,0 a 30,0 mg/L), sendo que na dosagem de 30,0 mg/L⁻¹ não houve desenvolvimento da parte aérea (FIGURA 7).

O herbicida afetou o desenvolvimento das plântulas estatisticamente nas concentrações de 10,0 a 30,0 mg/L (FIGURA 7).

Figura 7 – Desenvolvimento inicial da raiz e da parte aérea de *Zea mays*.



Legenda: crescimento da raiz e parte aérea das plântulas mensuradas com 96 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2021).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a usar um bioensaio vegetal de germinação, crescimento radicular e aéreo com os modelos vegetais alface e milho, *in vivo* e *ex situ*, para testar a toxicidade de um herbicida à base de Nicosulfuron. Além disso, é o primeiro estudo que mostra o efeito cito-genotóxico em células de um modelo vegetal, neste caso, *L. sativa*. Com isso, não foram encontrados na literatura outros trabalhos que envolvam a mesma metodologia para a

comparação dos efeitos fitotóxicos como o realizado no presente trabalho sendo a discussão pautada em trabalhos com outras espécies e outras metodologias e com o mecanismo de ação conhecido.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o Nicosulfuron tem efeito no desenvolvimento inicial das plântulas. As sementes tanto do milho quanto da alface germinaram na presença do herbicida NORTOX[®] contendo Nicosulfuron, porém o crescimento da raiz e parte aérea foi inibido e as plântulas tratadas não se desenvolveram. Tal fato pode ser devido aos mecanismos de ação do Nicosulfuron que é um inibidor da ALS (enzima acetolactato sintase), levando a uma rápida interrupção da divisão celular e consequente inibição do crescimento das plantas (DUUS; KRUSE; STREIBIG, 2018). As espécies sensíveis ao herbicida têm seu crescimento e desenvolvimento alterados pela ação do produto, enquanto as tolerantes podem apresentar sensibilidade, dependendo do estágio de desenvolvimento da planta, do ambiente e da dose utilizada, mas têm capacidade de sobreviver e se reproduzir após o tratamento, mesmo sofrendo injúrias (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Os herbicidas a base de sulfonilureia como o utilizado no presente trabalho controlam muitas gramíneas (monocotiledôneas) e algumas ervas daninhas de folhas largas (eudicotiledôneas), mas controlam melhor as monocotiledôneas do que as eudicotiledôneas (DIYANAT; GHASEMKHAN-GHAJAR, 2020; DUUS; KRUSE; STREIBIG, 2018). Porém, nesse trabalho foi observado que a alface (eudicotiledônea) sofreu mais os efeitos do herbicida do que o milho (monocotiledônea) em todas as concentrações testadas. No entanto, como o milho é a cultura na qual o herbicida é aplicado, esses resultados são consistentes uma vez que ele não é a planta alvo para o herbicida, ademais os efeitos observados a nível macroscópico foram a partir da dosagem indicada para uso.

Em condições de campo, a maioria dos híbridos de milho tem uma tolerância mais acentuada nos estágios iniciais de desenvolvimento (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018). O milho tem a capacidade de metabolizar o produto em compostos não ativos, e alguns cultivares de milho podem variar nas respostas à aplicação do Nicosulfuron (DAMIÃO FILHO; MÔRO; TAVEIRA,

1996). A sensibilidade de certos híbridos de milho a herbicidas inibidores de ALS como o Nicosulfuron está ligado a um único gene CYP ou grupo de genes CYP intimamente ligados no braço curto do cromossomo 5, que afeta a resposta do milho e híbridos de milho a vários herbicidas. Os níveis de lesão diferem entre os híbridos de milho com diferentes genótipos de CYP, como resultado de taxas diferenciais do metabolismo de herbicidas (MEYER; PATAKY; WILLIAMS, 2010).

Resultados de toxicidade em um trabalho de campo com milho-pipoca (pertencente à mesma espécie botânica do milho comum *Zea mays*), causada pelo Nicosulfuron (na concentração de 16 g/ha⁻¹), são relatados por Jakelaitis e colaboradores (2005). Eles observaram que houve toxicidade nas plantas após a aplicação, e à medida que se elevaram as doses, essa toxidez ficava mais evidente, corroborando com o que foi observado no presente trabalho. Também no mesmo trabalho, os autores relatam que o herbicida foi altamente tóxico para *Brachiaria plantaginea* e *Brachiaria decumbens*, que são monocotiledôneas, controlando em mais de 80%, e que para espécies do gênero *Ipomoea* (eudicotiledônea) não houve controle significativo, o que difere dos presentes resultados, onde foi observado que o herbicida afetou mais a alface, que é uma eudicotiledônea, do que o milho (monocotiledônea).

No trabalho de campo conduzido por Sarabi e colaboradores (2018) utilizando o Nicosulfuron (Accent SC 4%; 80 g/ha⁻¹), o herbicida mostrou-se tóxico para *Amaranthus retroflexus* L. e *Chenopodium album* L., eudicotiledôneas, afetando o crescimento das mesmas, o que está de acordo com o observado no presente trabalho para a eudicotiledônea alface. No milho, os autores também relatam que o herbicida mostrou-se fitotóxico, no entanto, a fitotoxicidade foi transitória e desapareceu em 3 semanas, sem impacto no crescimento e desenvolvimento do milho, porém o rendimento de grãos do milho foi menor. Nos resultados com 96 h do presente trabalho, o crescimento, principalmente da parte aérea foi altamente comprometido, diferindo dos presentes resultados. Na presente metodologia, a avaliação do desenvolvimento do milho foi feita até 96 h.

Em outros trabalhos encontrados na literatura com monocotiledôneas em condições de campo, os resultados dos autores são semelhantes aos encontrados no presente estudo, quanto ao efeito negativo do Nicosulfuron no milho em relação ao crescimento da parte aérea e no desenvolvimento da planta. Martins e colaboradores (2007) relatam que o Nicosulfuron (50 g/ha⁻¹) proporcionou redução no crescimento de *Brachiaria brizantha* (cv. Marandu) e em *Brachiaria decumbens* (cv. Basilisk). Ceccon e colaboradores (2010) observaram que o Nicosulfuron (8 e 16 g ha⁻¹) provoca clorose foliar, com necrose e redução do crescimento na *Brachiaria ruziziensis*, enquanto Anesio e colaboradores (2017) (60 g/ha⁻¹) afirmam que em *Brachiaria decumbens* (cv. Basilisk) e *Brachiaria ruziziensis* o herbicida causa alta intoxicação, interferindo em seu crescimento.

Não foram encontrados relatos na literatura de outros estudos envolvendo a alface e o Nicosulfuron, em nenhuma metodologia. Em estudos com outras eudicotiledôneas, os autores também encontraram resultados que mostraram que o Nicosulfuron foi fitotóxico, assim como no presente estudo com eudicotiledônea *Lactuca sativa*. Em um estudo de campo, Sikkema e colaboradores (2006) relatam que o herbicida (nas dosagens de 25 e 50 g/ha⁻¹) foi tóxico para brócolis, couve e couve-flor, causando a morte completa na dose de uso proposta pelo fabricante para o herbicida, e que para o girassol (*Helianthus annuus* L.) o herbicida também foi danoso em seu desenvolvimento. Segundo Bozic e colaboradores (2016), em seu trabalho de campo, o herbicida (40 g/ha⁻¹) não apresentou efeito significativo que interferisse na germinação das sementes de girassol, mas interferiu no crescimento das plantas, bem como ocorreu com a alface no presente estudo.

O comprimento da raiz e a frequência das células em divisão são parâmetros que costumam estar relacionados nas plantas. O crescimento e o desenvolvimento de um órgão dependem do aumento do número de células e o índice mitótico revela a frequência das células em divisão (ANDRADE-VIEIRA; PALMIERI; DAVIDE, 2017). Nesse trabalho ficou clara a relação entre o crescimento radicular e o índice mitótico. Nos tratamentos em que houve a redução no crescimento radicular de alface, também houve a diminuição no índice mitótico. O

Nicosulfuron reduziu a porcentagem de células em divisão, resultando em uma redução no índice mitótico indicando um efeito mitodepressivo do Nicosulfuron. Tal fato está relacionado com o efeito do Nicosulfuron na inibição da enzima acetolactato sintase (ALS). Como comentado anteriormente, a ALS desempenha um papel importante na síntese de proteínas e essa interferência interrompe a divisão celular, como demonstrado no presente estudo reduzindo, conseqüentemente, o crescimento da planta (SILVA *et al.*, 2020). A redução do índice mitótico pode

A redução do índice mitótico em raízes tratadas pode ser relacionada a distúrbios no ciclo celular, bem como disfunção da cromatina (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010). No presente estudo, a frequência de alterações cromossômicas foi estatisticamente baixa. Esse fato pode estar relacionado à redução do índice mitótico (BERNARDES *et al.*, 2015). Tendo em vista que as alterações cromossômicas são vistas durante o processo de divisão celular, e o número de células que estavam em divisão caía à medida que as concentrações aumentavam, o resultado seria uma menor observação na frequência de alterações. As alterações cromossômicas que foram observadas durante a avaliação do ciclo celular foram c-metáfases, cromossomos aderentes, cromossomos não orientados e pontes.

Geralmente, tratamentos que reduzem o índice mitótico tendem a aumentar a frequência de núcleos condensados (ANDRADE-VIEIRA; PALMIERI; DAVIDE, 2017; FONSECA ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2018), porém, essa relação também não foi observada no presente estudo, apesar da diminuição significativa no índice mitótico nas maiores concentrações, a presença de núcleos condensados não foi substancial.

O herbicida a base de Nicosulfuron induziu de forma significativa micronúcleos em células meristemáticas de alface. Os micronúcleos são indicativos da citotoxicidade devido ao efeito de substâncias mutagênicas (MERCADO; CALEÑO; SUÁREZ, 2020). Os micronúcleos podem ser originados por um cromossomo inteiro ou por fragmentos, e estão associados a mecanismos clastogênicos ou aneugênicos. Os efeitos relacionados ao mau funcionamento do fuso mitótico ou da estrutura cromossômica, como as c-metáfases, cromossomos aderentes,

cromossomos não orientados a placa, são considerados aneugênicos. As alterações consideradas clastogênicas são as que refletem os efeitos no DNA, como as pontes (ANDRADE-VIEIRA; PALMIERI; DAVIDE, 2017). Considerando as alterações cromossômicas observadas, decorrentes de anormalidades associadas a problemas com o fuso mitótico, os micronúcleos são de origem clastogênica, evidenciando o efeito mitodepressivo desse herbicida. As alterações encontradas sugerem que houve uma ação indireta sobre o material genético, frente à inibição da formação das fibras de fuso mitótico e as quebras cromossômicas seriam decorrentes da força necessária para a separação das cromátides aderentes, produzindo os fragmentos, dando origem aos micronúcleos.

No trabalho de Eroz-Poyraz e colaboradores (2018) testando o Nicosulfuron em milho, relatam que o herbicida causou redução no índice mitótico, principalmente a medida que a dosagem subia, corroborando o presente trabalho, onde também pudemos ver essa relação. Os autores também relatam que o herbicida induziu a formação de micronúcleos e que a frequência dos mesmos aumentava conforme a dosagem subia, do mesmo modo que foi relatado no presente trabalho.

Esse tipo de abordagem, em que o efeito do herbicida a base de Nicosulfuron é estudado a nível celular, é pioneira na prospecção dos efeitos tóxicos do Nicosulfuron. A alfaca é um modelo para estudos em que se avalia as alterações macroscópicas e sua relação com as alterações microscópicas (SILVEIRA *et al.*; 2017), de forma que os resultados do presente trabalho são inéditos e essenciais para complementar o entendimento sobre o mecanismo de ação do Nicosulfuron. Dessa forma, não foram encontrados na literatura outros trabalhos que envolvam a mesma metodologia para a comparação dos efeitos fitotóxicos, como o realizado no presente estudo, bem como não foram encontrados nenhum trabalho que envolvesse o presente herbicida com outro modelo vegetal.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostra o potencial altamente tóxico deste herbicida, tendo em vista os danos nos modelos vegetais, evidenciando o perigo do seu uso para o meio ambiente, para a vegetação e para animais. Levando-se em consideração que já nas menores dosagens pôde causar danos, isso pode indicar, também, os perigos que seus resíduos podem oferecer.

Considerando que a alface (eudicotiledônea) foi mais sensível que o milho (monocotiledônea), isso pode ser um indicativo de que o herbicida possa ser tóxico para eudicotiledôneas nativas próximas às lavouras em que o herbicida for usado, podendo causar, também, uma seleção desequilibrada das espécies nativas.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho é o primeiro a usar o bioensaio macroscópico de germinação e de crescimento radicular e aéreo, em microplacas, e o bioensaio citogenético de avaliação do ciclo celular para testar os efeitos fitotóxicos de um herbicida a base de Nicosulfuron em alface e milho.

De acordo com as condições experimentais descritas, é possível concluir que o herbicida a base de Nicosulfuron possui potencial fitotóxico, tendo em vista que interferiu negativamente na germinação da alface, mesmo nas concentrações menores que as indicadas para uso, bem como afetou negativamente o desenvolvimento inicial da alface a partir da menor dosagem, e do milho a partir da dosagem recomendada para uso. Do mesmo modo, o herbicida também afetou o índice mitótico da alface e induziu a formação de micronúcleos mostrando potencial mutagênico.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Doutorado e para a Universidade Federal de Lavras pela bolsa de Iniciação Científica aos autores.

Ao Professor João Cândido de Souza, do Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), por ceder as sementes de milho que foram utilizadas na realização desta pesquisa. Ao professor Adriano Teodoro Bruzi, do Departamento de Agricultura (DAG) por ceder os herbicidas.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, L. B. *et al.* Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Ambiente e Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science**. Taubaté, v. 6, n. 12, p. 255–265, 2011.
- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 4, p. 626-631, 2010.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. *et al.* Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **An. Acad. Bras. Ciênc.** Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. Toxicity of Landfills Assessed by Plant Cytogenetic Approaches. In: CABRAL, G. B. C.; BOTELHO, B. A. E. (Org.). **Landfills: Waste Management, Regional Practices and Environmental Impact**. New York: Nova Publishers, v. 1, p. 319-330, 2012.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; PALMIERI, M. J.; DAVIDE, L. C. Effects of long exposure to spent potliner on seeds, root tips, and meristematic cells of *Allium cepa* L. **Environmental monitoring and assessment**, v. 189, n. 10, p. 1-7, 2017.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. *et al.* Toxicidade de Agrotóxicos: Uma abordagem Citogenética e Molecular. In: PRATISSOLI, D. *et al.* (Org.). **Tópicos Especiais em Produção Vegetal III**. 1. ed. Alegre: UFESv, 3, p. 39-79, 2012.
- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, n. 73, n. 4, p. 626-631, 2010.
- ARAGÃO, F. B. *et al.* Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa* L. **Allelopathy Journal**. Haryana, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.
- ARAGÃO, F. B. *et al.* Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, p. 111985, 2021.
- BADERNA, D. *et al.* A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. **Environ. Res.** San Diego, v. 111, n. 4, p. 603–613, 2011.

- BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J. C.; MELLO, M. L. S. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. **Ecotoxicology**. Berlin, v. 20, n. 4, p. 927-935, 2011.
- BELLING, J. On Counting Chromosomes in Pollen-Mother Cells. *The American Naturalist*. Chicago, v. 55, p. 573-574, 1921.
- BERNARDES, P. M. *et al.* Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 7, p. 1-11, 2015.
- BOZIC, D. *et al.* Effect of nicosulfuron on the populations of invasive weedy sunflower. **Julius-Kühn-Archiv**, n. 452, p. 225, 2016.
- BELLING, J. On Counting Chromosomes in Pollen-Mother Cells. **The American Naturalist**. Chicago, v. 55, p. 573-574, 1921.
- BERNARDES, P. M. *et al.* Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air and Soil Pollution**. Amsterdam, v. 226, n. 207, p. 1-11, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 399p., 2009.
- CAMPOS, J. M. S. *et al.* Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy Journal**. Haryana, v. 22, n.1, p. 143-152, 2008.
- CECCON, G. *et al.* Use of herbicides in off-season corn intercropped with *Brachiaria ruziziensis*. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 359-364, 2010.
- CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V. L. Sensibilidade de sementes de hortaliças na avaliação da qualidade da água em bioensaios. **Biotemas**. Florianópolis: UFSC, v. 25, n. 3, p. 19-27, 2012.
- DAMIÃO FILHO, C. F.; MÔRO, F. V.; TAVEIRA, L. R. Respostas de híbridos de milho ao nicosulfuron: I - aspectos biológicos e da produção. **Planta Daninha**, v. 14, n. 1, p. 3-13, 1996.
- DA SILVA, A. C. G. *et al.* Assessing Agricultural Toxicity in Brazil: Advances and Opportunities in the 21st Century. **Toxicological Sciences**, v. 177, n. 2, p. 316-324, 2020.
- DA ROSA, M. *et al.* Potencial citogenotóxico de efluente de indústria de bebidas não alcoólicas em cebola. **Disciplinarum Scientia – Naturais e Tecnológicas**. Santa Maria, v. 16, n. 3, p. 459-466, 2015.

DE OLIVEIRA, M. F. *et al.* Seletividade do Nicosulfuron em Linhagens e Híbridos de Milho. Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2018.

DIYANAT, M.; GHASEMKHAN-GHAJAR, F. Integrated weed control in corn (*Zea mays* L.) through combinations of seed priming and reduced dosages of various commonly used herbicides. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research (IJABBR)**, v. 8, n. 3, p. 290-301, 2020.

DOS REIS, G. B. *et al.* Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 142, p. 110 - 116, 2017.

DUUS, J.; KRUSE, N. D.; STREIBIG, J. C. Effect of Mesotrione and Nicosulfuron mixtures with or without adjuvants. **Planta Daninha**, v. 36, 2018.

EROZ-POYRAZ, İ. *et al.* Nicosulfuron Genotoxicity on Germinated Maize (*Zea mays* L.) Grains. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 27, n. 11, p. 7586-7594, 2018.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test: an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. Lund, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FREITAS, A. *et al.* Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 124, p. 426-434, 2016.

FONSECA ANDRADE-VIEIRA, L. *et al.* Cytogenetic bioassays as tools to distinguish between toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 66, n. 2, p. 495-502, 2018.

GALIANO-CARNEIRO, A. L. *et al.* Intercontinental trials reveal stable QTL for northern corn leaf blight resistance in Europe and in Brazil. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 134, n. 1, p. 63-79, 2021.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations - a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

- HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**. Saint Louis, v. 13, p. 66–74, 2010.
- JAKELAITIS, A. *et al.* Controle de plantas daninhas na cultura do milho-pipoca com herbicidas aplicados em pós-emergência. **Planta daninha**, v. 23, n. 3, p. 509-516, 2005.
- KUVELJA, A. *et al.* Impact of nicosulfuron on biochemical markers of oxidative stress in maize leaves and roots. **Biljni lekar**, v. 49, n. 2, p. 201-217, 2021.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.
- LI, M. *et al.* Insight into the characteristics and new mechanism of nicosulfuron biodegradation by a *Pseudomonas* sp. LAM1902. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 3, p. 826-837, 2020.
- LIU, D.; JIANG, W.; LI, M. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**. Lund, v. 117, n. 1, p. 23-29, 1992.
- MARTINS, D. *et al.* Seletividade de herbicidas aplicados em pós-emergência sobre capim-braquiária. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1969-1974, 2007.
- MATOBA, H. *et al.* Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. **Hereditas**. Lund, v. 144, p. 235-243, 2007.
- MAURO, M. O. *et al.* Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**. Ribeirão Preto, p. 4808-4819, 2014.
- MERCADO, S. A. S.; CALEÑO, J. D. Q.; SUÁREZ, J. P. R. Cytogenotoxic effect of propanil using the *Lens culinaris* Med and *Allium cepa* L test. **Chemosphere**, v. 249, p. 126193, 2020.
- MEYER, M. D.; PATAKY, J. K.; WILLIAMS, M. M. Genetic factors influencing adverse effects of mesotrione and nicosulfuron on sweet corn yield. **Agronomy journal**, v. 102, n. 4, p. 1138-1144, 2010.
- NARWAL, S. S.; SAMPIETRO, D. A.; CATALÁN, C. A. N. Chapter 1: Laboratory Bioassays in Allelopathy. In: NARWAL *et al.* (Org.). **Plant Bioassays**. Texas: Studium Press Houston, p. 3-20, 2009.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J. Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 20, n. 1, p. 103-106, 2002.

PALMIERI, M. J. *et al.* Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, Soil Pollut.** Amsterdam, v. 227, n. 5, p. 1-10, 2016.

PALMIERI, M. J. *et al.* Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 763, p. 30–35, 2014.

PEREIRA, M. P. *et al.* Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@mbiente On-line**. Boa Vista, v. 7, n. 1, p.36-43, 2013.

PINHEIRO, G. S. *et al.* Efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de cebola. **Scientia Plena**. Aracaju, v. 10, n. 11, 2014.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. Amsterdam, v. 390, n. 1, p. 121-127, 1997.

R Development Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2014.

SARABI, V. *et al.* Broadleaf weed control in corn (*Zea mays* L.) with sulfonylurea Herbicides tank-mixed with 2, 4-d+ McpA. **Agronomy Journal**, v. 110, n. 2, p. 638-645, 2018.

SIKKEMA, P. H. *et al.* Broccoli, cabbage and cauliflower tolerance to sulfonylurea herbicides. **Crop protection**, v. 25, n. 3, p. 225-229, 2006.

SILVA, W. C. *et al.* Effect of Post-Emergence Application of Nicosulfuron in Mixture with Atrazine for Weed Control in Sweet Sorghum. **Sugar Tech**, p. 1-10, 2020.

SILVEIRA, G. L. *et al.* Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

- SOUSA, S. M.; VICCINI, L. F. Cytotoxic and genotoxic activity of *Achillea millefolium* L., Asteraceae, aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, v. 21, n. 1, p. 98-104, 2011.
- SOUSA, S. M. *et al.* Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**. Florence, v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009.
- TIGRE, R. C. *et al.* Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 84, p. 125-132, 2012.
- VALERIO, M. E.; GARCIA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 378, p. 63-66, 2007.
- WANG, P. *et al.* Characterization of peanut-shell biochar and the mechanisms underlying its sorption for atrazine and nicosulfuron in aqueous solution. **Science of the Total Environment**, v. 702, p. 134767, 2020.
- ZHANG, Z. *et al.* Studies on the interactions between nicosulfuron and degradation enzymes. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 99-103, 2020.
- ZHAO, W. *et al.* Biodegradation of nicosulfuron by a novel *Alcaligenes faecalis* strain ZWS11. **Journal of Environmental Sciences**, v. 35, p. 151-162, 2015.

ARTIGO 2

EFEITOS DE UM HERBICIDA À BASE DE S-METOLACHLOR EM MODELOS VEGETAIS: FITOTOXICIDADE EM *Zea mays* L. E CITOGENOTOXICIDADE EM *Lactuca sativa* L.

EFFECTS OF S-METOLACHLOR-BASED HERBICIDES IN PLANT MODELS: PHYTOTOXICITY IN *Zea mays* L. AND CYTOGENOTOXICITY IN *Lactuca sativa* L.

RESUMO

O milho é a segunda cultura mais plantada no Brasil, em termos de hectares. Para o controle químico das ervas daninhas associadas ao seu cultivo, geralmente utiliza-se herbicidas com ação pós e pré emergência como o S-metolachlor. A toxicidade dos herbicidas é um fator preocupante, ainda mais quando levamos em consideração que o Brasil é o primeiro no ranking de consumo de agrotóxicos. Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de um herbicida à base de S-metolachlor por meio de bioensaios com os modelos vegetais *Lactuca sativa* L. (alface) e *Zea mays* L. (milho). Foram preparadas soluções a partir do produto comercial contendo o princípio ativo S-metolachlor, nas seguintes concentrações: 7,5; 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600 e 720 mg/L⁻¹. A água destilada foi usada como controle negativo e o alumínio como controle positivo. As sementes das espécies modelo foram dispostas em placas de petri e submetidas aos tratamentos. Em seguida, as placas de petri foram acondicionadas em estufa tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) a 24 °C, sem fotoperíodo. Foram realizadas análises macroscópicas (germinação e crescimento) para as duas espécies e microscópicas (alterações cromossômicas e nucleares) em *L. sativa*. Foi observado que houve interferência negativa do herbicida à base S-metolachlor na alface em todos os parâmetros macroscópicos e microscópicos testados. No milho, não houve interferência significativa na germinação, porém, na velocidade de germinação, no crescimento da raiz e da parte aérea, e no desenvolvimento da plântula houve interferência negativa. Os dados demonstram que o herbicida à base S-metolachlor possui potencial tóxico, pois apresentou fitotoxicidade nos modelos vegetais testados.

Palavras-chave: Fitotoxicidade. Desenvolvimento de plântulas. Germinação. Micronúcleos. Citotoxicidade. Genotoxicidade.

ABSTRACT

Considering the planted area, in hectares, corn is the second crop most cultivated in Brazil. Chemical control of weeds associated with their cultivation is performed with herbicides within pre and post emergence action, such as S-metolachlor. Brazil is the first country in the ranking of pesticide consumption, thus toxicity of herbicides is a task of great concern. . In this sense, this work aimed to evaluate the effects of an herbicide based on S-metolachlor through bioassays with the plant models *Lactuca sativa* L. (lettuce) and *Zea mays* L. (maize). The tested solutions were prepared from commercial product containing the active ingredient S-metolachlor, in the following concentrations: 7.5; 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600 and 720 mg / L⁻¹. Distilled water was used as a negative control and aluminum as a positive control. The seeds of each plant model were placed in petri dishes and submitted to tested solutions . Then, the petri dishes were kept in a B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) at 24 °C, without photoperiod. The macroscopic analyzes (germination and growth) were performed for two species and the microscopic (chromosomal and nuclear changes) in *L. sativa*. It was observed a negative interference of S-metolachlor-based herbicide on lettuce in all macroscopic and microscopic parameters tested. In maize, there was no significant interference in germination, however, in germination speed index, root and shoot growth, as far as a seedling development there was negative interference. The data demonstrate that the herbicide based on S-metolachlor has toxic potential, as it showed phytotoxicity in the tested plant models.

Keywords: Phytotoxicity. Seedling development. Germination. Micronuclei. Cytotoxicity. Genotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

A aplicação de agrotóxicos é uma prática comum na agricultura para a produção de grandes quantidades de safras (ALI *et al.*, 2020), e os herbicidas são uma das classes de praguicidas mais utilizadas em todo o mundo para o controle do crescimento de plantas daninhas em campos agrícolas (PÉREZ-LUCAS; GAMBÍN; NAVARRO, 2020). O Brasil é apontado como o maior consumidor de agrotóxicos no mundo e como o país que mais utiliza agrotóxicos proibidos em países que tem ampla preocupação com o meio ambiente (ALVARENGA, 2017; DA SILVA *et al.*, 2020). O uso indevido desses agrotóxicos afeta negativamente o meio ambiente (ALI *et al.*, 2020).

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo (DOS SANTOS *et al.*, 2020), e a cultura é a segunda maior cultivada no país, em hectares (ALCÁNTARA-DE LACRUZ *et al.*, 2020). Dentre os herbicidas utilizados na cultura do milho está o S-metolachlor (OTERO *et al.*, 2019).

O S-metolachlor é um membro da família de herbicidas cloroacetamidas (OTERO *et al.*, 2019; RANGANI *et al.*, 2021). É comumente utilizado como herbicida seletivo pré e pós-emergência no controle de gramíneas anuais (RANGANI *et al.*, 2021) e de ervas daninhas de folhas largas em diferentes culturas, como milho, girassol, soja, cana-de-açúcar, algodão, feijão, dentre outras (RANGANI *et al.*, 2021; OTERO *et al.*, 2019). O modo de ação desse herbicida consiste em inibir vários processos biológicos nas zonas meristemáticas das plantas. O herbicida é absorvido pelas raízes e partes aéreas das plantas em germinação, e translocado via xilema para áreas em desenvolvimento (CARA *et al.*, 2021; COPIN; PERRONET; CHÈVRE, 2016), onde inibe a síntese de clorofila, de proteínas, de ácidos graxos e de lipídios, impedindo o aumento e a divisão celular, e, conseqüentemente, bloqueando o crescimento das ervas daninhas logo após a germinação (CARA *et al.*, 2021).

S-metolachlor é relativamente solúvel em água e moderadamente absorvido pelas partículas do solo. Pode ser transportado na água superficial e na subterrânea quando está

dissolvido. É potencialmente capaz de contaminar as águas subterrâneas devido à sua persistência moderada no solo e na água (MARÍN-BENITO *et al.*, 2021).

Neste sentido, estudos que esclareçam os efeitos de poluentes ambientais em organismos vivos são de grande importância, e o mecanismo de toxicidade desses compostos deve ser levado em consideração. Para atingir este objetivo, estão disponíveis testes com diferentes modelos vegetais, permitindo o acesso a uma série de endpoints dos agentes tóxicos (DOS REIS *et al.*, 2017).

Ensaio com plantas superiores são eficientes para a identificação de toxicidade de poluentes ambientais (ARAGÃO *et al.*, 2021, DOS REIS *et al.*, 2017; GOVEA *et al.*, 2020; PALMIERI *et al.*, 2014). Os testes macroscópicos de fitotoxicidade são realizados através de bioensaios envolvendo a germinação de sementes de espécies modelo além do crescimento das raízes e parte aérea dessas plantas. Esses testes são simples, rápidos, confiáveis e econômicos, uma vez que a raiz é o primeiro órgão a entrar em contato com o substrato ou solução contendo a substância a ser analisada (PALMIERI *et al.*, 2014). Bioensaios citogenéticos de toxicidade são testes que podem ser associados aos testes macroscópicos (SILVEIRA *et al.*, 2017). Eles são baseados na avaliação do ciclo celular, permitindo a observação de alterações ao longo da mitose (ARAGÃO *et al.*, 2021; BARROSO ARAGÃO *et al.*, 2017), podendo identificar mudanças no ciclo celular por meio da detecção de anormalidades na taxa de divisão celular e também a presença de alterações cromossômicas e nucleares (PALMIERI *et al.*, 2014).

Dessa forma, esse trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos de um herbicida à base de S-metolachlor no desenvolvimento inicial dos modelos vegetais *Lactuca sativa* L. e *Zea mays* L. por meio de bioensaios macroscópicos e microscópicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As espécies utilizadas como modelo vegetal foram *Lactuca sativa* L. (var. Grandes Lagos) (alface) e *Zea mays* (milho) (Cultivar UFLA JM100). A aquisição das sementes de alface foi feita em casas agrocomerciais locais e as de milho foram cedidas pela Universidade Federal de Lavras.

As sementes foram dispostas em placas de Petri de polietileno de 9 cm de diâmetro, revestidas com papel alumínio, contendo papel filtro embebido em cada solução testada, sendo 3 mL para a alface e 5mL para o milho. As placas foram armazenadas em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à temperatura de 24 °C, sem fotoperíodo (NARWAL; SAMPIETRO; CATALÁN, 2009). O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com cinco repetições, cada uma correspondente a uma placa de Petri com 25 sementes para a alface e 15 sementes para o milho.

2.2 Soluções para os testes

As soluções empregadas para os testes foram preparadas a partir do produto comercial, adquiridos em casas agrocomerciais locais. Foi utilizado o herbicida Dual Gold contendo 960,00 g/L de S-metolachlor. Para os testes, a partir do Dual Gold, foram preparadas 10 concentrações diferentes (7,5; 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600 e 720 mg/L) dissolvendo o herbicida em água destilada, sendo a concentração de 120,0 mg/L a indicada para uso pelo fabricante. A água destilada foi utilizada como controle negativo e o alumínio (10^{-3} M) (preparado a partir de $KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$), conhecido por ter efeito principal no crescimento da planta, como controle positivo.

2.3 Testes Macroscópicos

A germinação das duas espécies foi avaliada anotando o número de sementes germinadas (que apresentaram a protrusão da raiz), a cada 8 h, até completar um total de 48 h para a alface, e 72 h para o milho. Após 96 h, o comprimento das raízes e da parte aérea das duas espécies foi

aferido com um paquímetro digital. Os parâmetros analisados (percentual de germinação e índice de velocidade de germinação) foram calculados segundo Aragão *et al.* (2021).

2.4 Testes Microscópicos

O teste microscópico foi realizado com *Lactuca sativa* L. nas concentrações de 7,5; 15, 30, e 60 mg/L. As raízes foram coletadas e fixadas em solução Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1) após 96h de tratamento, e foram armazenadas a -4 °C, por pelo menos 24 h. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento (BELLING, 1921). As raízes foram hidrolisadas em HCl 1mol L⁻¹ durante 9-10 min, em banho maria a 60 °C. Posteriormente foram expostas ao Reativo de Shiff, no escuro, por 1h30min. Para a montagem das lâminas, foi utilizado carmim acético 2%. Para cada tratamento foram preparadas 5 lâminas, cada uma proveniente de uma Placa de Petri (repetição). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, na objetiva de 40X, onde 1000 células foram contabilizadas por lâmina. As diferentes fases da divisão mitótica, possíveis alterações cromossômicas e nucleares observadas foram anotadas. Foi realizado o registro do número de células em cada fase do ciclo celular (intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) para a obtenção do Índice Mitótico-IM (razão entre número total de células em divisão pelo número total de células observadas). Também foi realizada a avaliação das alterações cromossômicas das células meristemáticas no ciclo celular, frequência de micronúcleos (determinado pela frequência de células com micronúcleos em qualquer fase mitótica ou intérfase) e a frequência de núcleos condensados.

2.5 Análise Estatística

Para verificar a diferença entre os tratamentos, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($\alpha = 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5%

de significância. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

3 RESULTADOS

O herbicida S-metolachlor afetou a germinação das sementes de alface, em todos os tratamentos, quando comparado ao controle negativo (água), sendo mais pronunciada a partir da concentração de 120 mg/L, que é a dosagem recomendada para uso pelo fabricante, onde inibiu a germinação em mais de 60% (FIGURA 1 - a). Nas dosagens de 360, 480 e 600 mg/L houve redução de mais de 90%. A dose de 720 mg/L inibiu completamente a germinação.

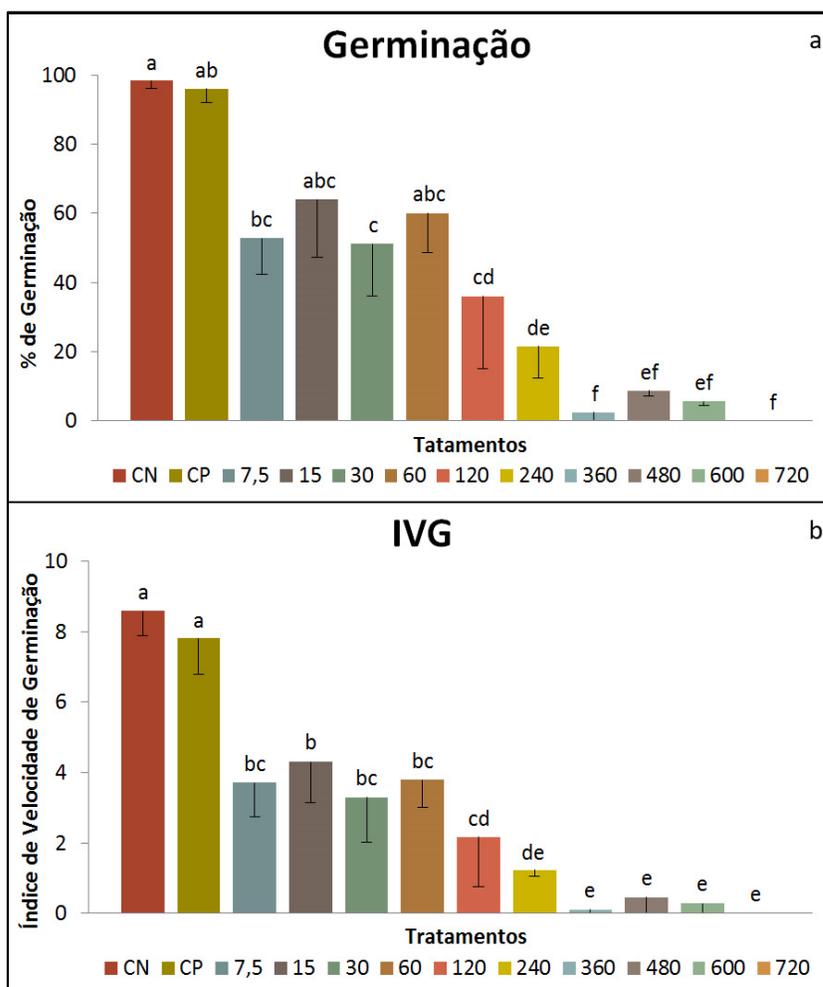
Também foi observado que o herbicida interferiu negativamente na velocidade da germinação da alface, onde houve cerca de 50% de redução na velocidade de germinação. Nas concentrações de 360, 480 e 600 mg/L houve cerca de 90% de redução na velocidade de germinação (FIGURA 1 - b).

No crescimento da raiz, houve interferência do herbicida em todas as concentrações, apresentando mais de 75% de redução a partir da dosagem de 7,5 mg/L, que é a mais baixa. A partir da dosagem de 120 mg/L (dosagem recomendada para uso) houve mais de 90% de redução, sendo que na dosagem de 720 mg/L não houve crescimento (FIGURA 2).

O herbicida também interferiu no crescimento da parte aérea em todas as concentrações, com mais de 90% de redução. Não houve crescimento da parte aérea a partir da concentração de 120 mg/L, que é a dosagem recomendada para uso pelo fabricante (FIGURA 2).

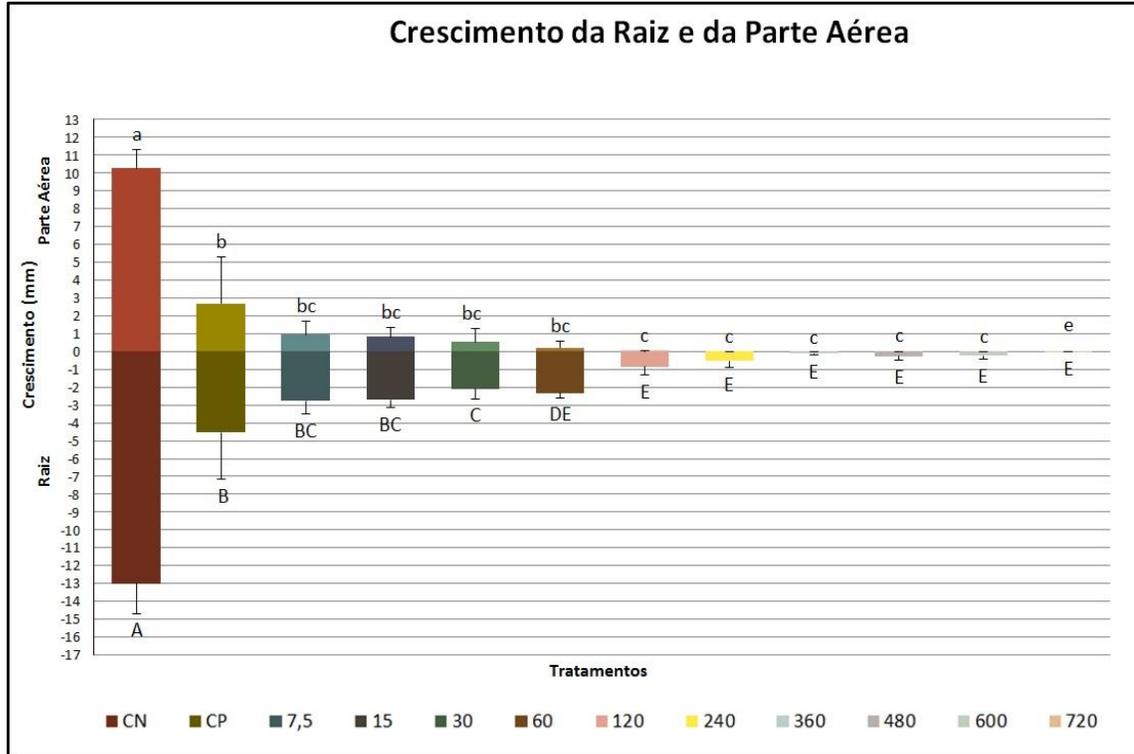
No desenvolvimento da plântula, o herbicida afetou todas as concentrações em mais de 80%. Houve mais de 95% de redução a partir da dosagem de 120 mg/L (dosagem recomendada para uso pelo fabricante). Na dosagem de 720 mg/L não houve desenvolvimento da plântula (FIGURA 2). É importante ressaltar que todas as doses aplicadas apresentaram efeito mais pronunciado que o alumínio utilizado como controle negativo e com efeito principal sobre o desenvolvimento da plântula.

Figura 1 – Germinação e índice de velocidade de germinação de *Lactuca sativa*.



Legenda: (a) – germinação das sementes de *L. sativa* com 48 h; (b) – índice de velocidade de germinação das sementes de *L. sativa* com 48 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.
 Fonte: Do autor (2021).

Figura 3 – Desenvolvimento inicial da raiz e da parte aérea de *Lactuca sativa*.



Legenda: crescimento da raiz e da parte aérea das plântulas mensuradas com 96 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

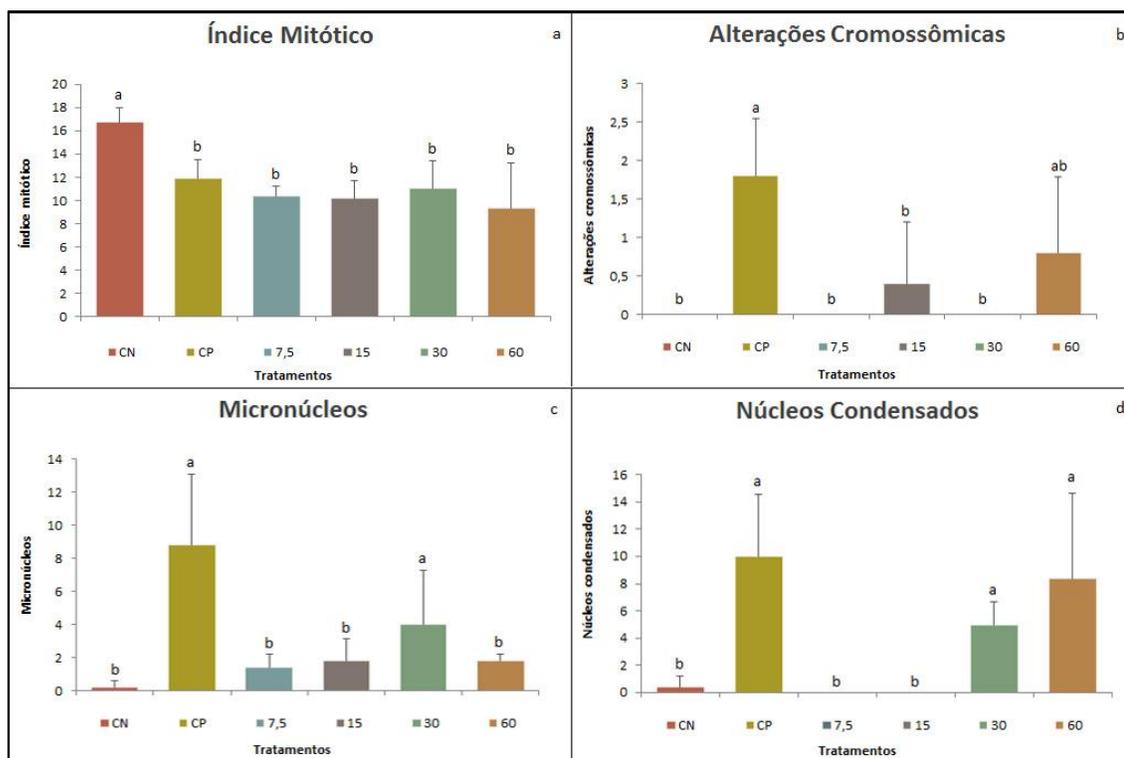
Fonte: Do autor (2021).

As análises do ciclo celular da alface foram realizadas nos tratamentos de 7,5 a 60 mg/L. Foi observado que houve interferência do herbicida no índice mitótico em todos os tratamentos, quando comparado ao controle negativo, indicando que houve uma redução no índice mitótico. A redução foi em cerca de 35%. Porém, os tratamentos não diferiram entre si estatisticamente (FIGURA 3 – a).

Quanto a frequência de alterações cromossômicas, o tratamento de 60 mg/L apresentou uma frequência maior de alterações que os outros tratamentos e o controle negativo. Os

tratamentos de 7,5, 15,00 e 30 mg/L não diferiram estatisticamente do controle negativo (FIGURA 3 – b). As alterações cromossômicas encontradas durante a análise do ciclo celular foram: c-metáfases, cromossomos aderentes e fragmentos.

Figura 3 – Índice mitótico, alterações cromossômicas, micronúcleos e núcleos condensados observados nas células meristemáticas de *L. sativa*.



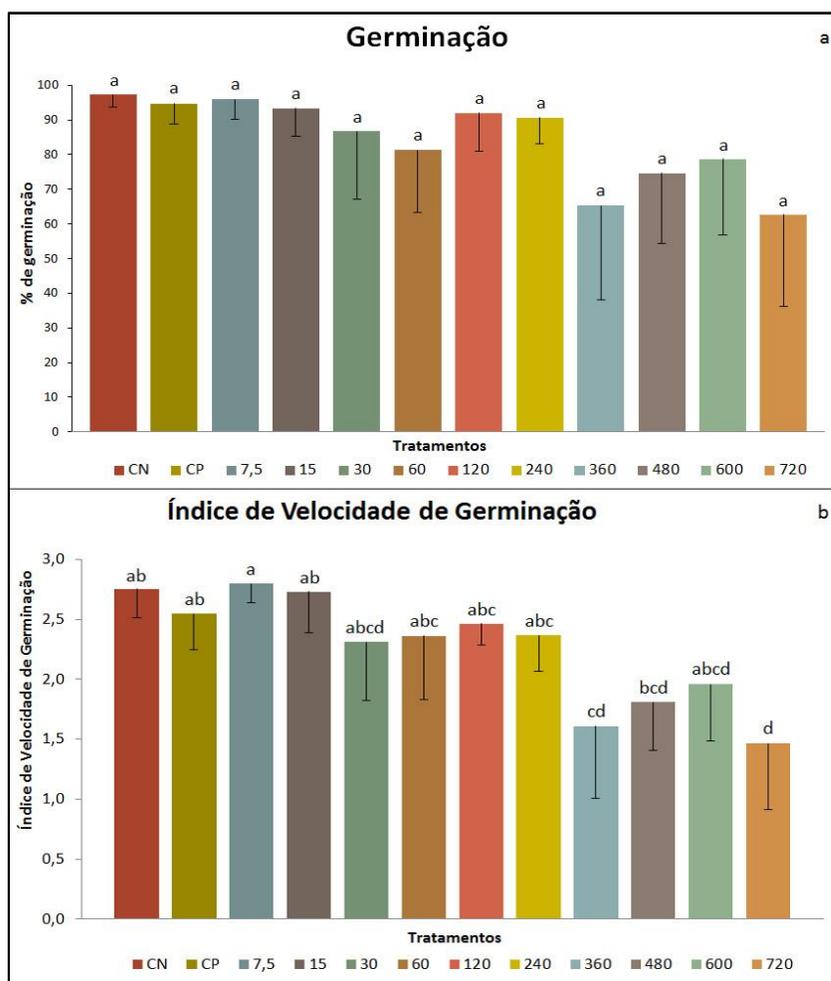
Legenda: (a) - frequência média do índice mitótico; (b) - frequência média de alterações cromossômicas; (c) - frequência média de micronúcleos; e (d) - frequência média de núcleos condensados. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2021).

Na frequência de micronúcleos, o tratamento de 30 mg/L diferiu do controle negativo. Já os outros tratamentos (7,5 15,0 e 60 mg/L) não diferiram do controle negativo (FIGURA 3 – c).

Em relação à frequência de núcleos condensados, os tratamentos de 30 e 60 mg/L apresentaram uma frequência maior, em comparação ao controle negativo. Os tratamentos de 7,5 e 15 mg/L não diferiram estatisticamente do controle negativo (FIGURA 3 – d).

Figura 4 – Germinação e índice de velocidade de germinação de *Zea mays*.



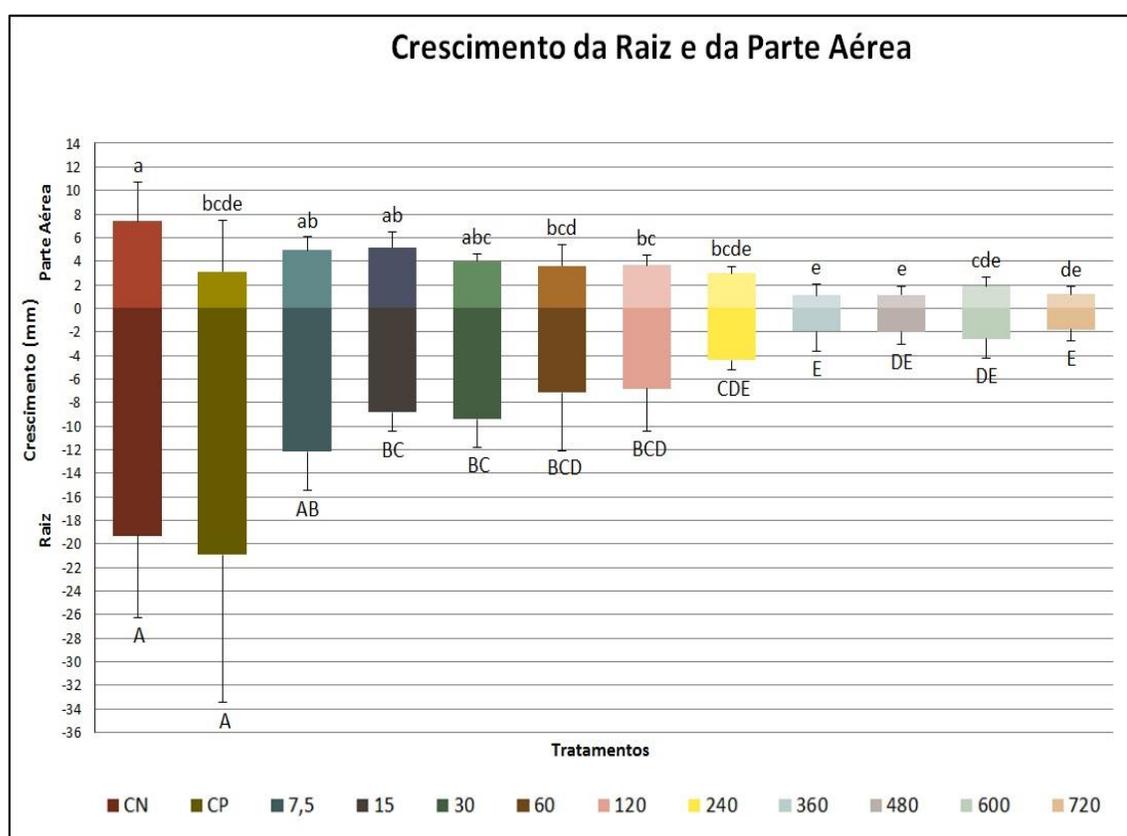
Legenda: (a) – germinação das sementes de *Z. mays* monitoradas de 8 em 8 h, durante 72 h; (b) – índice de velocidade de germinação das sementes de *Z. mays* com 72 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2021).

Quanto ao milho, o S-metolachlor não apresentou interferência significativa estatisticamente na germinação, quando comparado ao controle negativo (FIGURA 4 – a).

Na velocidade de germinação, houve interferência negativa estatisticamente, quando comparado ao controle, a partir da concentração de 30 mg/L (FIGURA 4 – b). Na concentração de 720 mg/L houve redução na velocidade de germinação em mais de 50%.

Figura 5 – Desenvolvimento inicial da raiz e da parte aérea de *Zea mays*.



Legenda: Crescimento da raiz e da parte aérea das plântulas mensuradas com 96 h. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos em relação ao controle negativo (água). As barras representam o erro padrão da média.

Fonte: Do autor (2020).

No crescimento da raiz houve interferência em todas as concentrações (FIGURA 5). Na concentração de 7,5 mg/L houve redução em cerca de 40%. Nas concentrações de 360 a 720 mg/L houve cerca de 90% de redução no crescimento. Na dosagem recomendada para uso pelo fabricante (120 mg/L) houve redução no crescimento da raiz em mais de 60%.

O herbicida também interferiu no crescimento da parte aérea (Figura 5). Na dosagem de 7,5 mg/L houve redução em cerca de 30% do crescimento. Nas dosagens maiores (360 a 720 mg/L) houve mais de 70% de redução do crescimento. Na dosagem 120mg/L (recomendada para uso pelo fabricante) houve redução no crescimento da parte aérea em cerca de 50%.

O S-metolachlor afetou o desenvolvimento da plântula em todas as concentrações, principalmente nas concentrações de 360 a 720 mg/L (FIGURA 5).

4 DISCUSSÃO

Com os resultados obtidos no presente estudo pode-se observar que o S-metolachlor não interfere diretamente na germinação das plântulas, uma vez que as sementes germinam, porém de forma mais lenta, influenciando a velocidade da germinação. Como consequência o herbicida interfere no crescimento da plântula, tendo efeito fitotóxico por não deixar as plântulas crescerem, comprometendo principalmente o crescimento da parte aérea.

Os herbicidas da família das cloroacetamidas, como o princípio ativo S-metolachlor estudado no presente trabalho, são inibidores do crescimento do meristema apical e meristema radicular. Segundo Karam e colaboradores (2003), as plantas sensíveis são mortas antes da emergência, sem que haja inibição da germinação das sementes, nem parada imediata do crescimento, o que foi observado no presente estudo para as duas espécies. Karam e colaboradores (2003) afirmam ainda que o crescimento da raiz é menos sensível que o crescimento da parte aérea, corroborando com o observado nesse trabalho tanto para alface, quanto para milho.

A alface se mostrou mais sensível ao herbicida que o milho. Na alface, à medida que dosagem de herbicida aumentava, havia uma diminuição significativa em seu desenvolvimento. Porém, mesmo o milho não sendo uma planta alvo, devido ao fato do herbicida ser utilizado em seu cultivo, e sendo considerado uma planta tolerante ao herbicida (KARAM *et al.*, 2003), mostrou-se ser afetado pelo mesmo, mesmo nas dosagens inferiores a dosagem recomendada para uso.

A seletividade desse herbicida é relacionada à taxa de metabolismo. As plantas tolerantes metabolizam rapidamente esse herbicida, quando comparadas com plantas suscetíveis. Plantas tolerantes, como o milho e soja (e que também não são plantas alvo), são capazes de metabolizar o herbicida em quantidades suficientes para impedir o acúmulo e a persistência em níveis fitotóxicos. A absorção e a translocação parecem contribuir para a tolerância das plantas. As plantas suscetíveis translocam esse herbicida para o ponto de crescimento após a absorção pela raiz (KARAM *et al.*, 2003).

Esse trabalho é o primeiro a usar um bioensaio vegetal de germinação e crescimento radicular e aéreo, com os modelos vegetais alface e milho, para testar a toxicidade de um herbicida à base de S-metolachlor. Dessa forma, não foram encontrados na literatura outros trabalhos que envolvam a mesma metodologia de aplicação da solução teste diretamente nas sementes em placa de petri para a comparação dos efeitos fitotóxicos, como o realizado no presente estudo.

Em um trabalho conduzido por Liu e colaboradores (2012), foi estudado os efeitos do S-metolachlor sobre o crescimento radicular de milho (nas dosagens de 6,2, 18,6,37,2, 74,4, 93) e do arroz (nas dosagens de 0, 1,55, 3,1, 6,2, 12,4, 24,8 e 31 μM para o arroz), hidroponial. Os autores relatam que o S-metolachlor também mostrou-se tóxico para milho e arroz, inibindo o crescimento das raízes e o desenvolvimento das plantas, semelhante ao que foi apresentado no presente trabalho. Os autores ainda dizem que o milho foi menos sensível que o arroz, conforme o presente trabalho, em que o milho apresentou menos sensibilidade que a alface.

Também não foram encontrados na literatura relatos, com nenhuma metodologia, de estudos realizados com o S-metolachlor na alface. Em estudos com outras eudicotiledôneas, os autores também encontraram resultados que mostraram que o S-metolachlor foi fitotóxico, assim como no presente estudo com a eudicotiledônea *Lactuca sativa*.

Em um experimento de campo com o feijão (*Phaseolus vulgaris*) conduzido por Sikkema, Shropshire e Soltani (2009) com S-metolachlor (nas doses de 1373 e 2746 g/ha), eles relatam que o herbicida causa lesões mínimas em condições de aplicação em campo (clorose e necrose das folhas, dobras nas folhas e redução do crescimento das folhas), mas não houve efeito adverso na altura da planta, peso seco da parte aérea, teor de umidade das sementes e rendimento, diferindo do presente trabalho, onde o herbicida provocou interferência no crescimento da planta.

Kalsing e Vidal (2013), em um estudo em casa de vegetação com o S-metolachlor (com o Dual Gold 915 g/L, nas dosagens de 1.200, 1.800, 2.400 e 3.600 g/ha), relatam que não foi verificado efeito significativo sobre a emergência do feijão, independentemente da dose utilizada, e constataram efeito na massa seca das raízes, e a maior dose utilizada afetou a massa seca da parte aérea, de acordo com o que foi observado aqui, onde o herbicida também não impediu que as sementes de alface germinassem, mas interferiu na velocidade da germinação e no desenvolvimento da raiz e principalmente da parte aérea.

De acordo com o trabalho de campo de Santos e colaboradores (2012), o S-metolachlor (1,14 kg/ha) causa redução na altura e lesões no feijão e reduz os níveis de matéria seca. No mesmo trabalho, com a soja, outra eudicotiledônea, o S-metolachlor causou redução do crescimento, da quantidade de matéria seca produzida e causou fitotoxicidade moderada. Os resultados do trabalho desses autores para essa duas eudicotiledôneas são similares aos resultados encontrados nesse trabalho com a eudicotiledônea alface, em que a espécie também apresentou redução no crescimento da plântula. Já para o milho, no mesmo trabalho, os autores relatam que o herbicida não afetou o desenvolvimento das plantas, diferente aos resultados desse trabalho, em que o milho apresentou redução no desenvolvimento em todas as dosagens testadas, principiante nas maiores doses, e inclusive na dosagem recomendada para uso (SANTOS *et al.*, 2012).

Os resultados de um experimento em ambiente controlado do trabalho com outra eudicotiledônea, a batata doce, conduzido por Abukari, Shankle, Reddy (2015), para investigar a resposta da batata-doce ao S-metolachlor (0,00, 0,86, 1,72, 2,58 e 3,44 kg/ha), estão de acordo com os resultados do presente estudo, onde os autores, relatam que o herbicida causa diminuição do comprimento da planta linearmente com o aumento da dose, e que o número de raízes também diminuiu com o aumento da dosagem, bem como houve redução no número de folhas e na área foliar, e redução na biomassa foliar, caulinar e radicular, conforme o observado no presente estudo com os parâmetros testados na eudicotiledônea alface.

Santos e colaboradores (2008), com ensaios de campo, relatam que, em seu trabalho testando o herbicida (na dose de 1,14 kg/ha) em ervas daninhas da cultura de tomate, o S-metolachlor foi mais eficaz contra ervas daninhas de folhas largas (eudicotiledôneas), afetando a densidade das mesmas (*Portulaca oleracea*, *Trianthema* spp., *Cleome viscosa*, *Boerhavia erecta*, *Amaranthus dubius*, *Echinochloa colona*, *Digitaria* spp. e *Echinochloa indica*) do que para ervas daninhas de folha fina (gramas e *Cyperus*) (monocotiledôneas), onde também reduziu a densidade, porém foi menos significativo do que nas ervas de folha larga. Essa observação esta de acordo com os resultados presentes nesse trabalho, em que a alface (eudicotiledônea) sofreu mais danos no crescimento do que o milho (monocotiledônea).

Gonçalves Netto e colaboradores (2019) em um experimento em casa de vegetação com a eudicotiledônea *Amaranthus palmeri* em dois tipos de solo, e o herbicida (960,0 e 1440,0 g/ha⁻¹) relatam que o herbicida foi altamente tóxico para a planta, reduzindo em mais de 90% o crescimento, causando em seguida a morte das mesmas. Os resultados do estudo são próximos do que foi visto aqui, no qual a eudicotiledônea alface também teve o crescimento da raiz e parte aérea severamente reduzido.

As análises citogenéticas foram realizadas apenas nos tratamentos 7,5, 15, 30 e 60 mg/L porque não houve material suficiente para preparo das lâminas nas outras concentrações. Como apresentado anteriormente, a partir da concentração de 120 mg/L (recomendada para uso), houve uma queda significativa da germinação, inviabilizando a coleta de meristemas suficientes para o

preparo das laminas. E, durante a avaliação do crescimento radicular, algumas sementes germinadas morreram, devido a toxicidade do herbicida.

O comprimento da raiz é um parâmetro que se relaciona com a frequência das células em divisão, e o índice mitótico revela essa frequência de células que encontram-se dividindo (ANDRADE-VIEIRA; PALMIERI; DAVIDE, 2017). No presente estudo essa relação ficou bem clara durante as análises do ciclo celular, onde pôde-se observar que o herbicida interferiu no índice mitótico, e essa interferência ficou evidente no crescimento da raiz e da parte aérea, bem como no desenvolvimento da plântula como um todo. Para o crescimento e o desenvolvimento de um órgão é necessário o aumento do número de células, e o índice mitótico revela a frequência das células em divisão (ANDRADE-VIEIRA; PALMIERI; DAVIDE, 2017).

Tratamentos que reduzem o índice mitótico tendem a aumentar a frequência de núcleos condensados (ANDRADE-VIEIRA; PALMIERI; DAVIDE, 2017; FONSECA ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2018). Essa relação também foi observada nesse trabalho, onde a presença de núcleos condensados nas concentrações de 30 e 60 mg/L ficou evidente. A presença dos núcleos condensados refletem citotoxicidade do agente estudado, pois a condensação do núcleo é uma das primeiras etapas do processo de morte celular, que é um mecanismo de defesa do organismo para impedir a disseminação de danos genéticos causados pelo agente tóxico (ANDRADE; DAVIDE; FONSECA ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2018; GEDRAITE, 2010; PALMIERI *et al.*, 2016). Acredita-se que a planta pode ativar um mecanismo de morte celular quando ela não consegue reparar os danos, e isso é refletido no aumento do número de núcleos condensados (PALMIERI *et al.*, 2016), como foi observado no presente trabalho, em que o herbicida induziu a formação de núcleos condensados já nas menores concentrações testadas no estudo, de forma que a planta não conseguiu reparar os danos e desencadeou a formação de núcleos condensados.

As alterações cromossômicas também são uma consequência comum da atividade tóxica de uma substância. A instabilidade genética e os danos ao DNA que as células sofrem com a ação de substâncias tóxicas podem estimular uma variedade de alterações cromossômicas (PALMIERI *et al.*, 2016). As alterações cromossômicas que foram observadas durante a avaliação do ciclo

celular foram como c-metáfases, cromossomos aderentes e pontes, e foram significativas apenas no maior tratamento em que foi possível a confecção de lamínas (60 mg/L).

Os danos ao DNA também podem ser avaliados com a presença de micronúcleos, que podem ser o resultado de toxicidade. Há diferentes mecanismos de reparo do DNA, mas se não funcionarem adequadamente, podem surgir alterações mitóticas, que podem levar à formação de micronúcleos durante a divisão celular (PALMIERI *et al.*, 2016). Também foi observado a presença de células com micronúcleos no maior tratamento durante as avaliações. Os micronúcleos estão relacionados a mecanismos aneugênicos (efeitos relacionados ao mau funcionamento do fuso mitótico ou da estrutura cromossômica) e clastogênicos (efeitos no DNA), e podem ser originados por um cromossomo inteiro ou por fragmentos (ANDRADE-VIEIRA; PALMIERI; DAVIDE, 2017). Dessa forma, a formação dos micronúcleos encontrados no tratamento de 60 mg/L pode se relacionar as alterações cromossômicas também encontradas no tratamento 60 mg/L, principalmente em relação a formação de pontes, que frequentemente está associada a formação de fragmentos (VIEIRA; SILVEIRA, 2018).

O presente trabalho também é o primeiro a usar um bioensaio vegetal citogenéticos de toxicidade, com a alface como modelo vegetal, para testar a toxicidade de um herbicida à base de S-metolachlor. Dessa forma, não foram encontrados na literatura outros trabalhos que envolvam a mesma metodologia para a comparação dos efeitos fitotóxicos, como o realizado no presente estudo, bem como não foram encontrados nenhum trabalho que envolvesse o presente herbicida com outro modelo vegetal.

Em um trabalho com a alga o *Chlorella pyrenoidosa* e o S-metolachlor (LIU; XIONG, 2009), os autores relataram que o herbicida interferiu na divisão das algas, e à medida que a concentração aumentava, maior era a inibição. Também observaram que o herbicida causou diminuição do tamanho da célula, rompimento da membrana celular e alterações, como aumento do número dos grãos de amido e de gotículas de lipídios. Esses achados podem ser comparados aos encontrados no presente trabalho, onde também foi observado que o herbicida causou a diminuição do índice mitótico e alterações celulares. Do mesmo modo, Maronić e colaboradores

(2018) também relatam achados semelhantes com a alga *Parachlorella kessleri*, como a redução da divisão das células, principalmente nas maiores concentrações, bem como alterações estruturais e intracelulares, corroborando ao presente trabalho.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo pode ficar evidente o potencial altamente tóxico deste herbicida, visto que causou danos nos modelos vegetais, evidenciando o perigo do seu uso para o meio ambiente, para a vegetação e para animais, ainda mais que, já nas menores dosagens pôde causar danos, levando a morte das plantas estudadas, isso pode se um indicativo dos perigos que seus resíduos podem oferecer.

Tendo em considerando que a alface (eudicotiledônea) foi mais sensível que o milho (monocotiledônea), esse fato pode ser um indicativo de que o herbicida possa ser tóxico para eudicotiledôneas nativas próximas as culturas em que o herbicida for usado, causando também uma seleção desequilibrada das espécies nativas.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho é o primeiro a usar o bioensaio macroscópico de germinação e de crescimento radicular e aéreo, em microplacas, e o bioensaio citogenético de avaliação do ciclo celular para testar os efeitos fitotóxicos de um herbicida a base S-metolachlor em alface e milho.

De acordo com as condições experimentais descritas, é possível concluir que o herbicida a base de S-metolachlor possui potencial fitotóxico, tendo em vista que o herbicida afetou a geminação das sementes de alface em todas as dosagens e impediu a germinação na maior dosagem. Também interferiu negativamente na velocidade da germinação da alface e do milho.

Além disso, afetou o crescimento tanto da raiz quanto da parte aérea da alface e do milho, sendo que para a alface na maior dosagem não houve crescimento da raiz, e a parte aérea não

creceu a partir da concentração que é a equivalente a dosagem recomendada para uso pelo fabricante.

Ele também afetou o índice mitótico da alface em todas as concentrações. O herbicida também induziu a formação de alterações cromossômicas, micronúcleos e núcleos condensados.

AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de Doutorado e para a Universidade Federal de Lavras pela bolsa de Iniciação Científica aos autores.

Ao Professor João Cândido de Souza, do Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), por ceder as sementes de milho que foram utilizadas na realização desta pesquisa. Ao professor Adriano Teodoro Brusi, do Departamento de Agricultura (DAG) por ceder os herbicidas.

REFERÊNCIAS

- ABUKARI, I. A.; SHANKLE, M. W.; REDDY, K. R. S-metolachlor and rainfall effects on sweetpotato (*Ipomoea batatas* L. [Lam]) growth and development. **Scientia Horticulturae**, v. 185, p. 98 - 104, 2015.
- ALCÁNTARA-DE LA CRUZ, R. *et al.* Herbicide resistance in Brazil: Status, impacts, and future challenges. In: **Herbicides-Current Research and Case Studies in Use**. IntechOpen, 2020.
- ALI, A. *et al.* Herbicides act as restrictive factors in rice-watermelon rotation. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 108974, 2020.
- ARAGÃO, F. B. *et al.* Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, p. 111985, 2021.
- BARROSO ARAGÃO, F. *et al.* Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Revista de Biología Tropical**, v. 65, n. 2, p. 435-443, 2017.
- CARA, I. G. *et al.* Selective and Sensitive Quantification of Acetochlor and S-Metolachlor in Maize and Soybean Plant Samples by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Agriculture**, v. 11, n. 4, p. 283, 2021.
- COPIN, P-J.; PERRONET, L.; CHÈVRE, N. Modelling the effect of exposing algae to pulses of S-metolachlor: how to include a delay to the onset of the effect and in the recovery. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 257 - 267, 2016.
- DA SILVA, A. C. G. *et al.* Assessing Agricultural Toxicity in Brazil: Advances and Opportunities in the 21st Century. **Toxicological Sciences**, v. 177, n. 2, p. 316-324, 2020.
- DEMAILLY, F. *et al.* Impact of diuron and S-metolachlor on the freshwater diatom *Gomphonema gracile*: Complementarity between fatty acid profiles and different kinds of ecotoxicological impact-endpoints. **Science of the Total Environment**, v. 688, p. 960-969, 2019.
- DOS REIS, G. B. *et al.* Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 142, p. 110 - 116, 2017.

- DOS SANTOS, M. P. *et al.* Performance of Corn Cultivars in the Fertilization Function in the Alagoas State, Brazil. **Journal of Experimental Agriculture International**, p. 60-66, 2020.
- GONÇALVES NETTO, A. *et al.* Control of ALS-and EPSPS-Resistant *Amaranthus palmeri* by Alternative Herbicides Applied in PRE-and POST-Emergence. **Planta Daninha**, v. 37, 2019.
- GOVEA, K. P. *et al.* Response of *LACTUCA SATIVA* L. 'baba de verao' exposed to different substrates for laboratory bioassays. **Pakistan Journal of Botany**, v. 52, n. 5, p. 1625-1629, 2020.
- KALSING, A.; VIDAL, R. A. Seletividade de herbicidas residuais ao feijão-comum durante o período inicial da fase vegetativa. **Planta daninha. Viçosa, MG. Vol. 31, n. 2, (out. / dez. 2013), p. 411 - 417**, 2013.
- KARAM, D. *et al.* Características do herbicida S-Metolachlor nas culturas de milho e sorgo. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2003.
- LIU, H. *et al.* Enantioselective phytotoxicity of metolachlor against maize and rice roots. **Journal of hazardous materials**, v. 217, p. 330 - 337, 2012.
- LIU, H.; XIONG, M. Comparative toxicity of racemic metolachlor and S-metolachlor to *Chlorella pyrenoidosa*. **Aquatic Toxicology**, v. 93, n. 2-3, p. 100-106, 2009.
- LOPES OVEJERO, R. F. *et al.* Residual herbicides in weed management for glyphosate-resistant soybean in Brazil. **Planta Daninha**, v. 31, n. 4, p. 947 - 959, 2013.
- MARÍN-BENITO, J. M. *et al.* The role of two organic amendments to modify the environmental fate of S-metolachlor in agricultural soils. **Environmental Research**, v. 195, p. 110871, 2021.
- MARONIĆ, D. Š. *et al.* S-metolachlor promotes oxidative stress in green microalga *Parachlorella kessleri* - A potential environmental and health risk for higher organisms. **Science of the total environment**, v. 637, p. 41 - 49, 2018.
- OTERO, R. *et al.* Removal of S-metolachlor herbicide from aqueous solutions by meso and microporous organosilica materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 278, p. 35 - 43, 2019.
- PALMIERI, M. J. *et al.* Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: a comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 133, p. 442-447, 2016.

- RANGANI, G. *et al.* Mechanism of Resistance to S-metolachlor in *Palmer amaranth*. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 392, 2021.
- SANTOS, B. M. *et al.* Managing weeds with drip-applied herbicides in tomato. **Crop protection**, v. 27, n. 1, p. 101-103, 2008.
- SANTOS, G. *et al.* Carry-over effect of S-metolachlor and trifluralin on bean, corn and soybean crops. **Planta Daninha**, v. 30, n. 4, p. 827 - 834, 2012.
- SIKKEMA, P. H.; SHROPSHIRE, C.; SOLTANI, N. Response of dry bean to pre-plant incorporated and pre-emergence applications of S-metolachlor and fomesafen. **Crop Protection**, v. 28, n. 9, p. 744 - 748, 2009.
- VIEIRA, L. F. A.; SILVEIRA, G. L. Cyto (Geno) Toxic Endpoints Assessed via Cell Cycle Bioassays in Plant Models. **Cytotoxicity. Rijeka: InTech**, p. 117-129, 2018.
- ZEMOLIN, C. R. *et al.* Environmental fate of S-metolachlor: a review. **Planta daninha**, v. 32, n. 3, p. 655 - 664, 2014.
- ZHOU, Q. *et al.* Action mechanisms of acetolactatesynthase-inhibiting herbicides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 89, n. 2, p. 89 - 96, 2007.