

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GABRIELA EZEQUIEL COSTA MARTINS

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA CITOGENOTOXICIDADE DOS HERBICIDAS
PIROXASULFONA E FLUMIOXAZINA POR MEIO DO BIOENSAIO *Allium cepa* L.**

ALFENAS/MG

2025

GABRIELA EZEQUIEL COSTA MARTINS

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA CITOGENOTOXICIDADE DOS HERBICIDAS
PIROXASULFONA E FLUMIOXAZINA POR MEIO DO BIOENSAIO *Allium cepa* L.**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Ambientais, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Barbosa
Coorientadora: Dr^a. Laiane Rocha Corsini
Colaboradores: Prof. Dr. Eric Ferreira Batista, Dr. Antônio Rodrigues da Cunha Neto, Me. João Vitor Calvelli Barbosa, Anelise Vieira Rosa Fernandes da Silva, Thallys Duarte Esteves da Silva

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Martins, Gabriela Ezequiel Costa .

Avaliação comparativa da citogenotoxicidade dos herbicidas piroxasulfona e flumioxazina por meio do bioensaio *Allium cepa* L. / Gabriela Ezequiel Costa Martins. - Alfenas, MG, 2025.

57 f. : il. -

Orientador(a): Sandro Barbosa.

Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Mistura de herbicidas. 2. Índice mitótico. 3. Anormalidades cromossômicas. 4. Anormalidades nucleolares. I. Barbosa, Sandro, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

GABRIELA EZEQUIEL COSTA MARTINS

“ Avaliação comparativa da citogenotoxicidade dos herbicidas piroxasulfona e flumioxazina por meio do bioensaio *Allium cepa* L. ”

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Gestão e manejo de recursos naturais e biodiversidade.

Aprovada em: 25 de abril de 2025.

Prof. Dr. Sandro Barbosa

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Profa. Dra. Fernanda de Oliveira Bustamante

Instituição: Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)

Profa. Dra. Ana Luisa Arantes Chaves

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Prof. Dr. Gunther Brucha

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Profa. Dra. Isabella de Campos Moraes

Instituição: Universidade Federal de Lavras (UFLA)



Documento assinado eletronicamente por **Sandro Barbosa, Professor do Magistério Superior**, em 30/06/2025, às 14:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1550612** e o código CRC **E0B2FAE2**.

AGRADECIMENTOS

Meus colegas de pós-graduação que me desculpem, mas trabalhar ao mesmo tempo em que se propõe a continuar aprimorando seus conhecimentos, não é tarefa fácil. É claro que a terrível frase, “mas você só faz doutorado” jamais deve se aplicar! No entanto, unir a rotina de trabalho com a rotina de pesquisas e testes na bancada é ainda mais difícil. Exatamente por isso, tenho muitos a agradecer, afinal, uma tarefa dessa magnitude não se faz sozinha!

Primeiramente agradeço aos colegas da UNIFAL-MG, sobretudo do ICN, que sempre me incentivaram e compreenderam que, eventualmente a técnica de laboratório não estaria disponível para uma ou outra atividade. Agradeço aos professores responsáveis pelo Laboratório BIOGEN, que sempre incentivaram minha formação. Agradeço à CAPES e às agências de fomento, tão responsáveis para a estruturação do laboratório e das pesquisas desenvolvidas. Agradeço às auxiliares (atuais e egressas) no Laboratório BIOGEN, Clau, Célia, Larissa, Ana e Rose. Sem a ajuda de vocês esse trabalho nunca seria possível.

Aos queridos colegas de laboratório pelas risadas e por tornarem o ambiente mais leve, sobretudo aos que acompanharam mais de perto toda essa jornada: Antônio, João, Thainá, Arthur, Dani e, especialmente, Anelise e Thallys, pela ajuda na plotagem dos experimentos e por tolerarem meu alto nível de exigência e organização na bancada, fruto de um perfil aborrecidamente perfeccionista. Vocês são muito queridos e têm um futuro brilhante pela frente!

À minha querida amiga, Julieta, que me motiva a sempre seguir o caminho da educação ambiental por meio das nossas ações de extensão e que é sempre ombro amigo para as crises da vida adulta. Aos meus amigos e familiares que não ousei listar aqui porque, graças a Deus, vocês são muitos! Só tenho a agradecer pela torcida, pela compreensão das ausências e pelos bons momentos compartilhados.

Aos meus orientadores, Sandro e Laiane, pelo carinho, pelos ensinamentos, incentivo e por mostrar que ciência se faz com leveza, com respeito, com saúde. Vocês serão sempre inspiradores para mim!

Ao Bruno, que além de apoiador incondicional, cuidou de mim em vários momentos de cansaço e desânimo e, de quebra, ainda trouxe o Dudu para alegrar os dias com jogos e gargalhadas. Vocês fazem parte dessa história e eu sou muito grata por isso!

Mas, sem sombra de dúvidas, meu maior agradecimento e minha maior motivação para tanto esforço vai para Regina e Antônio, meus pais amados, que nunca hesitaram quem me incentivar, por mais difícil que a tarefa parecesse. Desistir nunca foi uma opção. Em cada gesto, pequeno ou grande, vocês me estimulam e me lembram do motivo de acordar e trabalhar todos os dias da minha vida. Cada pequena conquista sempre foi e sempre será por você e para vocês!

A todos vocês, minha sincera gratidão e o compartilhamento de missão cumprida! Nós conseguimos!

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

“Algum mau-olhado fora atirado àquela comunidade; enfermidades misteriosas varreram os bandos de galinhas; as vacas e os carneiros adoeciam e morriam. Por toda parte se via uma sombra de morte. Os lavradores passaram a falar de muita doença em pessoas de suas famílias. Na cidade, os médicos se tinham sentido cada vez mais intrigados por novas espécies de doenças que apareciam nos seus pacientes. Registravam-se várias mortes súbitas e inexplicadas, não somente entre os adultos, mas também entre as crianças; adultos e crianças sentiam males repentinos, enquanto caminhavam ou brincavam, e morriam ao cabo de poucas horas.

Havia, ali, um estranho silêncio. Os pássaros, por exemplo – para onde é que tinham ido? Muita gente falava deles, confusa e inquieta. Os postos de alimentação, nos quintais, estavam desertos. Os poucos pássaros que por qualquer lado se vissem estavam moribundos; tremiam violentamente, e não podiam voar. Aquela era uma primavera sem vozes.”

(Rachel Carson, 1969)

RESUMO

O crescente uso de agrotóxicos a fim de se garantir o suprimento de alimentos mundial é alvo de preocupação por parte da comunidade científica, uma vez que pode representar riscos à saúde humana e ambiental. Entre os agrotóxicos, os herbicidas têm destaque por serem os mais comercializados no Brasil. O trabalho objetivou verificar o potencial citogenotóxico de três herbicidas comerciais compostos por flumioxazina, piroxasulfona e a mistura 1:1 de flumioxazina e piroxasulfona, recomendados para grandes culturas de interesse mundial, como café, trigo, soja e cana-de-açúcar. Para tanto, utilizou-se bioensaio *Allium cepa*, amplamente aceito na literatura. Sementes de *Allium cepa* foram expostas à concentração de 5 mL.L⁻¹ de cada herbicida comercial. Água destilada foi utilizada como controle negativo e o metilmetanosulfonato (MMS) atuou como controle positivo. Avaliou-se o índice mitótico (IM), a frequência de anormalidades cromossômicas e nucleares (FACN), o número de nucléolos por núcleo e área média dos nucléolos. A partir da FACN, foi determinado, ainda, o Efeito Genotóxico Nuclear (EGN) e o Efeito Genotóxico Mitótico (EGM). Os três herbicidas testados levaram à redução do IM, aumento da FACN, aumento do número de nucléolos por núcleo e redução da área dos nucléolos, em comparação com o controle negativo, sendo, portanto, considerados citogenotóxicos. Nenhum dos herbicidas apresentou EGN, no entanto, todos apresentaram EGM, demonstrando que as alterações foram encontradas mais frequentemente em diferentes etapas da mitose. Não houve diferença estatística entre os três herbicidas, portanto, a junção da piroxasulfona + flumioxazina (1:1) não apresentou sinergia ou antagonismo no que tange à citogenotoxicidade.

Palavras-chave: Mistura de herbicidas. Índice mitótico. Anormalidades cromossômicas. Anormalidades nucleolares.

ABSTRACT

The increasing use of pesticides to ensure global food supply has raised significant concerns within the scientific community due to potential risks to both human and environmental health. Among these pesticides, herbicides stand out as the most widely marketed agrochemicals in Brazil. This study aimed to assess the cytogenotoxic potential of three commercial herbicides containing flumioxazin, pyroxasulfone, and a 1:1 mixture of flumioxazin and pyroxasulfone, all recommended for major global crops such as coffee, wheat, soybean, and sugarcane. The *Allium cepa* bioassay, widely recognized in the scientific literature, was employed. Onion seeds were exposed to 5 mL·L⁻¹ of each commercial herbicide. Distilled water served as the negative control, while methyl methanesulfonate (MMS) was used as the positive control. The parameters evaluated included the mitotic index (MI), frequency of chromosomal and nuclear abnormalities (FCNA), number of nucleoli per nucleus, and average nucleolar area. Additionally, the Nuclear Genotoxic Effect (NGE) and Mitotic Genotoxic Effect (MGE) were calculated based on FCNA. All tested herbicides resulted in MI reduction, increased FCNA, an elevated number of nucleoli per nucleus, and decreased nucleolar area compared to the negative control, indicating cytogenotoxicity. None of the herbicides induced NGE; however, all showed MGE, suggesting that the observed alterations occurred more frequently during mitotic stages. No statistically significant differences were found among the three herbicides, indicating that the 1:1 mixture of pyroxasulfone and flumioxazin did not produce synergistic or antagonistic cytogenotoxic effects.

Keywords: Herbicide mixture; Mitotic index; Chromosomal abnormalities; Nucleolar abnormalities.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	AGROTÓXICOS E HERBICIDAS.....	13
2.1.1	Cenário nacional.....	13
2.1.2	Herbicidas e suas classes.....	15
2.1.3	Mecanismo x modo de ação dos herbicidas.....	16
2.1.4	Uso conjugado de herbicidas.....	19
2.2	FLUMIOXAZINA E PIROXASULFONA: CARACTERIZAÇÃO E MODOS DE AÇÃO.....	21
2.2.1	Flumioxazina.....	21
2.2.2	Piroxasulfona.....	24
2.2.3	Uso combinado de flumioxazina e piroxasulfona.....	26
2.3	ANÁLISES DE CITOGENOTOXICIDADE.....	28
2.3.1	Bioensaios vegetais para análise de citogenotoxicidade.....	29
2.3.2	<i>Allium cepa</i> em análises de citogenotoxicidade de defensivos agrícolas.....	30
3	ARTIGO: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA CITOGENOTOXICIDADE DOS HERBICIDAS PIROXASULFONA E FLUMIOXAZINA POR MEIO DO BIOENSAIO <i>Allium cepa</i> L.	32
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO GERAL

Agrotóxicos, também chamados de defensivos agrícolas, vêm sendo utilizados na agricultura há vários anos e, cada vez mais, novos compostos são produzidos e registrados a fim de se garantir um bom controle de pragas e uma boa produção de alimentos (Das *et al.*, 2024). De acordo com dados do IBAMA, em 2022 (último relatório completo), foram comercializadas 800 mil toneladas de agrotóxicos no Brasil. Deste montante, mais de 492 mil toneladas foram defensivos voltados apenas para o combate às plantas daninhas, os herbicidas, que, por sua vez, são compostos bioativos com capacidade de impedir o desenvolvimento vegetal por provocar diferentes efeitos nas plantas (IBAMA, 2022).

Os herbicidas podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, classe química da substância ativa, forma de aplicação e, ainda, sua seletividade (Marchi; Marchi; Guimarães, 2008). De acordo com Das e Mondal (2014), é extremamente importante conhecer a classificação e a forma de atuação de um herbicida a fim de evitar o uso de agrotóxicos similares em uma mesma cultura, uma vez que esse quadro pode levar à seleção plantas resistentes. Atualmente, o *Herbicide Resistance Action Committee* catalogou 530 casos de resistência à diferentes tipos de herbicidas em mais de 100 diferentes culturas espalhadas por todo o mundo (Herbicide Resistance Action Committee, 2024). Dessa forma, torna-se importante investigar o modo de ação de diferentes herbicidas, de forma a prover informações acerca dos efeitos que tais defensivos podem gerar nas plantas alvos, na cultura, no ambiente e na saúde humana.

Nos últimos anos, uma ampla variedade de novos herbicidas foi registrada para uso no Brasil. Entre eles, encontram-se produtos comerciais com as substâncias ativas piroxasulfona e flumioxazina que, por sua vez, foram escolhidos para o presente trabalho por serem utilizados em culturas de grande interesse econômico, tais como café, trigo, soja e cana-de-açúcar (Brasil, 2023, 2024b). Os dois herbicidas supracitados apresentam como mecanismos de ação a inibição da síntese de ácidos graxos de cadeia longa e a inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase, respectivamente (Herbicide Resistance Action Committee, 2024). Estudos apontam para o uso combinado desses dois herbicidas, sobretudo em cultivos de soja, a fim de proporcionar melhor controle de plantas daninhas (Bordignon *et al.*, 2024; Ferrier *et al.*, 2022).

Vários métodos (*in vitro* e *in situ*) podem ser utilizados com a proposta de se avaliar a toxicidade ambiental de diferentes contaminantes e poluentes, mensurando desde efeitos celulares até efeitos que afetam populações e comunidades biológicas por completo (Burgess *et al.*, 2013). Nesse contexto, os bioensaios vegetais são utilizados em investigações de toxicidade de diversos contaminantes ambientais, pois representam uma forma acessível e sensível de detecção de efeitos tóxicos (Cherednichenko; Pilyugina; Nuraliev, 2022). Análises de fitotoxicidade são conduzidas a fim de determinar interferências no crescimento vegetal, enquanto análises de citogenotoxicidade são realizadas para determinar alterações em diferentes etapas do ciclo celular, no DNA e nos cromossomos (Liman; Ciğerci; Öztürk, 2015). Dentre os bioensaios vegetais mais utilizados encontram-se *Allium cepa*, a cebola, uma vez que possui características como fácil manuseio, raízes com bons parâmetros morfológicos, características citogenéticas estáveis e bem definidas, alta sensibilidade e baixo custo de utilização (Chakrabarti; Mukherjee, 2021; Felisbino *et al.*, 2018).

Diante do exposto e, tendo em vista que os herbicidas compreendem um grupo de substâncias xenobióticas que podem se difundir para áreas não cultivadas e, assim, promover efeitos em plantas não alvos (Felisbino *et al.*, 2018), torna-se importante verificar a toxicidade de tais defensivos agrícolas em organismos não alvo, a fim de se obter maiores informações acerca do impacto do uso de tais defensivos para a saúde do meio ambiente. Para tanto, análises de fitotoxicidade e citogenotoxicidade em bioensaios vegetais podem prover informações que pautem o melhor uso possível dos herbicidas, garantindo sua eficiência e, ao mesmo tempo, a proteção ao meio ambiente (Maggi; Tang, 2021).

Apesar de diversos trabalhos se dedicarem a averiguação da toxicidade de agrotóxicos (Cherednichenko; Pilyugina; Nuraliev, 2022; Fernandes; Mazzeo; Marin-Morales, 2007; Liman; Ciğerci; Öztürk, 2015; Verma; Srivastava, 2018), novos produtos e moléculas são registradas a cada ano e, além disso, poucos trabalhos se dedicam a verificar o efeito sinérgico ou antagônico do uso de duas ou mais substâncias herbicidas. Esse cenário demonstra uma lacuna de investigação científica necessária, no que tange ao rastreio do potencial fitotóxico e citogenotóxico de novos herbicidas, além de verificar se o uso combinado de substâncias herbicidas exerce influência sobre tal potencial toxicológico.

Assim, o presente trabalho objetivou averiguar o potencial toxicológico dos

herbicidas testados, de forma a apurar se o uso conjunto das substâncias flumioxazina e piroxasulfona exerce algum impacto sobre tal potencial, em comparação ao seu uso individualizado, de forma a fornecer dados que possam fomentar a classificação toxicológica dos herbicidas testados no que se refere aos riscos ambientais desses produtos. Além disso, objetivou-se compreender se parâmetros citogenéticos são afetados pelo uso dos herbicidas selecionados para a condução experimental, a fim de compor dados sobre seu modo de ação de forma a auxiliar na escolha de substâncias mais seguras para o meio ambiente.

2 REVISÃO LITERATURA

2.1 AGROTÓXICOS E HERBICIDAS

2.1.1 Cenário nacional

A crescente utilização de agrotóxicos é, frequentemente, justificada para garantir a produtividade capaz de suprir a demanda alimentar e, ainda, assegurar o controle de pragas que podem colocar em risco a produção agrícola (Das *et al.*, 2024; Marchi; Marchi; Guimarães, 2008; Samota *et al.*, 2024). No entanto, tais defensivos agrícolas apresentam pontos negativos que demandam atenção: o risco de contaminação ambiental, o potencial de seleção de organismos resistentes e os efeitos de sua interação com outros compostos químicos (Cherednichenko; Pilyugina; Nuraliev, 2022).

De acordo com o Decreto Nº4074, de 4 de janeiro de 2022, entende-se por:

“agrotóxicos e afins - produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, 2002, Capítulo 1, Art 1º).

Os agrotóxicos mais comuns são herbicidas, inseticidas e fungicidas que se propõem a combater plantas daninhas, insetos e fungos, respectivamente. Podem, ainda, pertencer a diferentes grupos químicos e exibir diferentes mecanismos de ação (IBAMA, 2022).

De acordo com a Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, entre os anos 2000 e 2024 foram registrados 6484 agrotóxicos, dos quais 663 apenas no ano de 2024 – pico de registros no período supracitado (Brasil, 2025).

Dados do último Painel de Informações de Agrotóxicos do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, apontam que, em 2022, no Brasil, foram comercializados, cerca de 800 mil toneladas de agrotóxicos, dos quais 59,51% apresentam a classe III para o risco ambiental, indicando, assim, que são produtos perigosos ao meio ambiente. Ainda de acordo com o referido

relatório, de todo o montante de defensivos comercializados, mais de 492 mil toneladas são referentes ao grupo de herbicidas exclusivamente, superando intensamente a venda de outros grupos de agrotóxicos (o grupo dos fungicidas foi o segundo mais comercializado chegando à marca próxima de 181 mil toneladas em 2022). O herbicida mais comercializado foi o glifosato e o estado do Mato Grosso apresentou o maior número de vendas de agrotóxicos em 2022 (IBAMA, 2022).

Historicamente, o controle de plantas daninhas era realizado já pelos romanos por meio da aplicação de uma mistura contendo sal e cinzas. Soluções de sulfato de cobre, arsenito de sódio e clorato de sódio foram utilizadas para a mesma finalidade (Kumar Das; Mondal, 2014). Os primeiros herbicidas orgânicos começaram a ser utilizados desde os anos 1940 com a ascensão de moléculas como o ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Até então, os herbicidas inorgânicos eram utilizados em grandes quantidades por hectare, chegando na grandeza de 1-2 t.ha⁻¹ (Das *et al.*, 2024). Com o avanço da ciência e o desenvolvimento de alternativas de manejo, bem como o desenvolvimento de moléculas mais eficientes, houve uma mudança no padrão de utilização de herbicidas que passaram a ser utilizados em quantidades inferiores (Das *et al.*, 2024). Anualmente, o uso de defensivos agrícolas alcança a marca de, aproximadamente, 0,5 kg por pessoa e 1 kg.ha⁻¹ (Maggi; Tang, 2021).

A perda de faturamento anual em função da infestação de plantas daninhas que, por sua vez, são de difícil controle manual, requer a ação simultânea de outras diferentes formas de combate, tais como a remoção mecânica e o controle biológico e químico (Das *et al.*, 2024). Samota *et al* (2024), apontam para o impacto negativo de plantas daninhas na produção de trigo, uma das mais relevantes culturas mundiais.

Levando-se em consideração o grande número de herbicidas registrados nos últimos anos e, ainda, o fato de que muitas vezes agrotóxicos são armazenados de maneira inadequada ou, pior, são utilizados de forma incorreta (Cherednichenko; Pilyugina; Nuraliev, 2022) torna-se importante estudar continuamente o potencial inibidor dessas moléculas, bem como seus efeitos tóxicos nos organismos alvos e não alvos, a fim de se chegar nas melhores formas de utilização.

Diversos princípios ativos podem ser utilizados na ampla variedade de herbicidas disponíveis no mercado nacional. Para o presente estudo foram escolhidas as substâncias flumioxazina e piroxasulfona, em função de sua presença em produtos comerciais cujos registros foram concedidos em 2017 e 2020 e, ainda,

por sua utilização em culturas de grande interesse nacional e regional, como soja, trigo e café. Dados do IBAMA apontam que, em 2022, esses dois princípios ativos totalizaram aproximadamente 4 mil toneladas vendidas no Brasil (IBAMA, 2022).

2.1.2 Herbicidas e suas classes

Diversos critérios podem ser utilizados para classificar os herbicidas. De acordo com Marchi, Marchi e Guimarães (2008), as classificações mais utilizadas levam em consideração a capacidade (ou ausência) de seletividade do herbicida, o método e período de aplicação, grupo químico e mecanismo de ação.

No que tange à seletividade, tem-se que os herbicidas que eliminam determinadas plantas daninhas sem provocar prejuízos para outras plantas e, sobretudo, à cultura, são chamados de seletivos (Kumar Das; Mondal, 2014). Segundo Das *et al* (2024), herbicidas não seletivos mostram-se como uma boa estratégia para o controle de plantas daninhas antes do plantio da cultura de interesse, uma vez que apresentam um espectro maior de combate, além de menor custo. No entanto, para esses autores, é necessário realizar tal uso de forma adequada, a fim de se evitar o risco de resistência biológica por parte das plantas daninhas.

Quanto ao período de aplicação, Kumor Das e Montal (2014), relatam que os herbicidas podem ser considerados de pré-plantio, pré-emergência e pós-emergência. Herbicidas de pré-plantio são aplicados no solo antes do plantio e devem ser incorporados mecanicamente. Já os herbicidas de pré-emergência devem ser aplicados antes da emergência da cultura, enquanto os de pós-emergência devem ser aplicados após a germinação e desenvolvimento da cultura. De acordo com Das *et al* (2024), os herbicidas de pré-emergência devem ser aplicados em 1 a 2 dias após a semeadura, enquanto o prazo de aplicação para herbicidas de pós-emergência é de, no máximo, 30 a 35 dias após a semeadura.

O uso de herbicidas de pré-emergência é relatado como a maneira mais eficaz de controle de plantas daninhas, uma vez que atua sobre esses alvos desde a germinação (Das *et al.*, 2024). De acordo com Du *et al* (2021), é comum que produtores utilizem herbicidas de pré-emergência associado a herbicidas de pós-emergência a fim de garantir o controle de plantas invasoras que possam interferir na colheita.

De acordo com Marchi, Marchi e Guimarães (2008), os herbicidas podem ser classificados, ainda, de acordo com a forma de aplicação: I - herbicidas aplicados ao solo sendo, dessa forma, absorvidos pelas raízes e translocados pelo xilema até às demais partes da planta; II - herbicidas aplicados nas folhas de contato, ou seja, os compostos são aplicados nas folhas e atuam rapidamente no local de aplicação sem se mover para os demais sistemas da planta, ou seja, não são translocados; e III - herbicidas aplicados nas folhas sistêmicos, cujos produtos são aplicados nas folhas e passíveis de translocação via floema atingindo, assim, outros órgãos vegetais.

Segundo o *Herbicide Resistance Action Committee* (2024), atualmente os herbicidas são separados em mais de 50 categorias químicas, a depender de sua estrutura e origem molecular e, ainda, são classificados em 25 diferentes tipos de grupos de acordo com seu mecanismo de ação. Essa classificação será abordada de forma mais robusta no tópico seguinte do presente trabalho. Há, ainda, alguns herbicidas que não apresentam o mecanismo de ação elucidado.

2.1.3 Mecanismo x modo de ação de herbicidas

Apesar de, frequentemente, os termos mecanismo de ação e modo de ação serem usados como sinônimos, Kumar Das e Mondal (2014), apontam a importância de se fazer a correta distinção de tais conceitos. O mecanismo de ação de um herbicida diz respeito ao primeiro processo bioquímico a ser afetado pela presença do agrotóxico. Já o modo de ação compreende um conjunto de efeitos desencadeados nas plantas afetadas e, sendo assim, envolvem uma complexidade maior de processos celulares e teciduais. Dessa forma, tem-se que os herbicidas apresentam mecanismos de ação específicos e, no entanto, podem desencadear uma sequência de eventos que, em conjunto levam à morte da planta (Marchi; Marchi; Guimarães, 2008).

O *Herbicide Resistance Action Committee* atualizou, em 2024, a classificação dos herbicidas levando em consideração os mecanismos de ação e seus respectivos grupos químicos. Atualmente são separados em 3 grandes classes: herbicidas que promovem a ativação de espécies reativas de oxigênio; herbicidas que interferem no metabolismo celular e herbicidas que atuam na divisão celular e crescimento. Dentro de cada grupo existem diferentes mecanismos de ação e diferentes grupos químicos. Alguns herbicidas, no entanto, não tiveram seus mecanismos de ação

elucidados e, dessa forma, são isolados dos demais grupos (Herbicide Resistance Action Committee, 2024). O quadro 1 apresenta a classificação de herbicidas de acordo com seu mecanismo de ação.

Quadro 1 - Classificação de herbicidas de acordo com seu mecanismo de ação, segundo o *Herbicide Resistance Action Committee*.

(Continua)

Ativadores de Espécies Reativas de Oxigênio		
Grupo HRCA	Mecanismo de Ação	Exemplos de ingredientes ativos
C1 / C2	Inibidores de fotossistema II – acopladores de serina 264	Atrazina, Prometrina, Diuron, etc.
C3	Inibidores de fotossistema II – acopladores de histidina 215	Bromoxinil, Ioxinila, Bentazon, etc.
D	Inibidores de fotossistema I – Desvio de elétrons	Paraquat e Diquat
E	Inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX)	Flumioxazina, Oxifluoren, Sulfentazon, etc.
F1	Inibidores da Fotoeno Desaturase	Diflufenican, Fluridona, Flurocloridona, etc.
F2	Inibidores da Hidroxofenil Piruvato Dioxigenase	Mesotriona, Benzofenap, Pirazoxifen, etc.
F4	Inibidores da Deoxi-D-Xilulose Fosfato Sintase	Clomazona e Bixlozona.
H	Inibidores de glutamina sintetase	Glufosinato-amônio e Bialafos.
S	Inibidores da solanesil difosfato sintase	Aclonifen
T	Inibidores da homogentisato solanesiltransferase	Ciclopirimorato
Alteradores do Metabolismo Celular		
Grupo HRCA	Mecanismo de Ação	Exemplos de ingredientes ativos
A	Inibidores de Acetil CoA Carboxilase	Clethodim, Fluazifop-butil, Pinoxaden, etc.
B	Inibidores da Acetolactase Sintase	Imazetapir, Piroxsulam, Diclosulam, etc.
G	Inibidores da Enol Piruvil Shiquinato Fosfato sintase	Glifosato.
I	Inibidores da síntese de dihidropteroato	Asulam.
K3	Inibidores da síntese de ácidos graxos de cadeia muito longa	Piroxasulfona, Fentrazamida, Indanofan, etc.
_	Inibidores da diidroorotato desidrogenase	Tetflupirrolimet.
L	Inibidores da síntese de celulose	Triaziflam, Clortiamida, Flupoxam, etc.

Quadro 1 - Classificação de herbicidas de acordo com seu mecanismo de ação, segundo o *Herbicide Resistance Action Committee*.

(Conclusão)

Alteradores do Metabolismo Celular		
Grupo HRCA	Mecanismo de Ação	Exemplos de ingredientes ativos
Q	Inibidores da tioesterase de ácidos graxos	Metiozolina, Cinmetilina, Cumiluron, etc.
R	Inibidores da serina treonina proteína fosfatase	Endothall.
Inibidores da Divisão e Crescimento Celular		
Grupo HRCA	Mecanismo de Ação	Exemplos de ingredientes ativos
K1	Inibidores da montagem de microtúbulos	Trifluralina, Pendimetalina, Thiazopir, etc.
K2	Inibidores da organização de microtúbulos	Barban, Carbetamina e Clorprofame
M	Desacopladores	DNOC e Dinoseb
O	Mimetizadores de auxina	2,4D, Picloram, Dicamba, etc.
P	Inibidores do transporte de auxina	Diflufenzopir e Naptalam.

Fonte: HRCA, 2024.

Conhecer a forma como um herbicida funciona é importante pois, assim, é possível diagnosticar problemas em seu desempenho e em sintomas de injúria causados às plantas não alvos, como a própria cultura de interesse. Além disso, é fundamental conhecer os impactos dos herbicidas na fisiologia das plantas daninhas para, assim, amparar a escolha dos herbicidas mais adequados, de forma a impedir o uso constante daqueles que apresentam o mesmo mecanismo de ação para, dessa forma, impedir a seleção de plantas resistentes (Das *et al.*, 2024; Marchi; Marchi; Guimarães, 2008).

Para a condução do presente trabalho foram escolhidos produtos comerciais a base dos ingredientes ativos piroxasulfona e flumioxazina, classificados, de acordo com o *Herbicide Resistance Action Committee*, respectivamente, nos grupos K3 e E. Assim, a piroxasulfona é um ingrediente ativo que se enquadra no grupo de herbicidas que afetam o metabolismo celular por meio da inibição da síntese de ácidos graxos de cadeia longa (Brasil, 2024b). Já a flumioxazina atua na ativação de

espécies reativas de oxigênio por meio da inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Brasil, 2023). Maiores informações sobre o mecanismo de ação dos herbicidas utilizados no presente trabalho serão descritas, em seção posterior, de forma mais completa e detalhada.

2.1.4 Uso conjugado de herbicidas

O uso de herbicidas seletivos e altamente eficientes em áreas de alta diversidade de plantas daninhas, frequentemente, requer a aplicação conjunta de diferentes herbicidas. Isso porque herbicidas seletivos, em geral, combatem dois grupos de plantas daninhas: plantas de folhas largas ou plantas de folhas estreitas. Nesse cenário, produtores interessados em combater os dois tipos de plantas daninhas misturam dois herbicidas seletivos a fim de ampliar o espectro de ação de tais defensivos (Das *et al.*, 2024). De acordo com Felisbino *et al* (2018), essa prática gera preocupação ambiental, uma vez que pode levar a alterações nos padrões de toxicidade de tais defensivos, em função de possíveis interações químicas que, por sua vez, podem exibir ações sinérgicas ou antagônicas. Assim, estudos que enfocam na avaliação toxicológica de somente uma substância isolada levam a uma análise subdimensionada dos níveis de toxicidade em comparação à análise conjunta, uma vez que a condição de campo apresentará vários compostos residuais atuando em conjunto. Esse cenário pode levar a diferentes efeitos, agudos e crônicos, na microbiota do solo e demais organismos (Maggi; Tang, 2021).

Maggi e Tang (2021), verificaram um declínio nas populações de minhocas, importantes indicadores da biodiversidade de solos em 9 sistemas produtivos de culturas economicamente relevantes, como milho, algodão, arroz, soja, trigo, hortaliças e frutas diversas. Os autores identificaram, por meio de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) a presença de 87 ingredientes ativos na faixa superficial do solo (30cm de profundidade). Em áreas produtoras de algodão e milho, por exemplo, foram encontrados resíduos de agrotóxicos como o 2,4D, dicamba, glifosato, paraquat, pendimetalina e outros 15 ingredientes ativos. Já em áreas de cultivo de soja, os autores detectaram resíduos de 2,4D, acifluoren, cletodim, flumioxazina, glifosato, paraquat, pendimetalina, piroxasulfona, sulfentrazone, trifluralina e outros 10 ingredientes ativos. Dessa forma, esses autores demonstraram o uso concomitante de vários defensivos agrícolas que, por

sua vez, deixam resíduos no solo. Um trabalho semelhante, publicado por Rose *et al* (2022), detectou, por análises de HPLC, 23 ingredientes ativos na camada superficial (10cm) em 84 amostras de solos agrícolas. Entre esses ingredientes ativos, detectaram a presença de trifluralina, dicamba, 2,4D, atrazina, glifosato, piroxasulfona, entre outros.

O trabalho de Das *et al* (2024) aponta que o tempo médio de permanência dos herbicidas em solos depende de vários fatores como, por exemplo, a diversidade microbológica, umidade, ph, incidência de luz e condições climáticas, além, é claro, das propriedades físico-químicas do próprio herbicida. De acordo com os autores, em solos de regiões de clima tropical e sub-tropical, herbicidas como o glifosato, paraquat, clethodim, por exemplo, persistem no solo por menos de 1 mês; herbicidas dicamba, oxyfluoren, atrazina apresentam um período de persistência de 1 a 3 meses. No entanto, nessas mesmas regiões, alguns herbicidas apresentam um tempo maior de persistência: imazetapir, sulfentrazone, pendimetalina tendem a persistir por um período que varia de 3 a 9 meses, enquanto diuron, norflurazon, por exemplo, tendem a persistir no solo por períodos superiores a 9 meses. Tal cenário reforça a importância de se investigar qual é o impacto de ação concomitante de diversos herbicidas, uma vez que, levando em consideração tal tempo de permanência, diferentes herbicidas podem ser encontrados no mesmo solo.

Du *et al* (2021), estudaram o efeito da ação combinada dos herbicidas imazapic (18, 32, 52 e 72 g a.i..ha⁻¹) e prometrina (400, 550, 700 e 850 g a.i..ha⁻¹) em cultivo de amendoim. Imazapic é um herbicida de ação pré e/ou pós-emergente por meio da inibição da enzima acetolactase sintase, além de afetar a síntese de alguns aminoácidos. Já o herbicida prometrina apresenta um efeito inibitório da cadeia transportadora de elétrons do aparato fotossintético. O estudo em questão objetivou verificar a eficiência do controle de plantas daninhas por meio da ação combinada de tais defensivos e não o potencial toxicológico do uso conjunto dos dois herbicidas. De fato, no referido trabalho, o uso concomitante apresentou melhor controle das plantas daninhas em relação ao uso separado dos dois, sendo as concentrações 32 + 850 e 52 + 400 g a.i..ha⁻¹ as melhores combinações obtidas.

Samota *et al* (2024), estudaram o uso da piroxasulfona combinada com outros herbicidas com o intuito de averiguar a eficiência do combate às plantas daninhas. Os autores verificaram que tais misturas proporcionaram um maior combate às infestações, quando comparado ao uso isolado da piroxasulfona, tendo o melhor

resultado encontrado na mistura da piroxasulfona + metsulfurona na proporção 125:4 g.ha⁻¹ de cada ingrediente ativo, respectivamente.

Os estudos de Felisbino *et al* (2018) mostraram efeitos sinérgicos, em *Allium cepa*, da junção de mesotriona, um herbicida inibidor da síntese de carotenoides, e atrazina, inibidor do fotossistema II. Para tanto, os pesquisadores utilizaram as concentrações, definidas a partir de valores encontrados em ambientes de cultivo, variando entre 1,8; 7; 30; 115 e 460 µg.L⁻¹ de mesotriona e as concentrações 1,5; 6,25; 25; 100 e 400 µg.L⁻¹ de atrazina. Os resultados apontaram que, isoladamente, a mesotriona não exibiu efeitos citogenotóxicos e/ou mutagênicos, avaliado por meio de índice mitótico, frequência de anormalidades cromossômicas e frequência de micronúcleos, enquanto a atrazina, isoladamente, exibiu tais efeitos, quando comparada ao controle negativo, em todas as concentrações testadas. Os resultados obtidos apontaram que menores concentrações de mesotriona, quando combinada com atrazina (1,8 + 1,5; 7 + 6,25; 30 + 25 µg.L⁻¹, respectivamente) levou ao aumento da citogenotoxicidade e mutagenicidade desse último herbicida.

O levantamento bibliográfico realizado aponta que poucos estudos se propõem a averiguar a citogenotoxicidade do uso conjunto de herbicidas. No entanto, os trabalhos supracitados demonstram que há uma tendência de preocupação ambiental acerca do uso combinado de diferentes herbicidas. Dessa forma, a realização de estudos que visam investigar a ação, eficiência e toxicidade de herbicidas usados concomitantemente, torna-se interessante para garantir um bom manejo das plantas daninhas e, sobretudo, a segurança para o meio ambiente.

2.2 FLUMIOXAZINA E PIROXASULFONA: CARACTERIZAÇÃO E MODOS DE AÇÃO

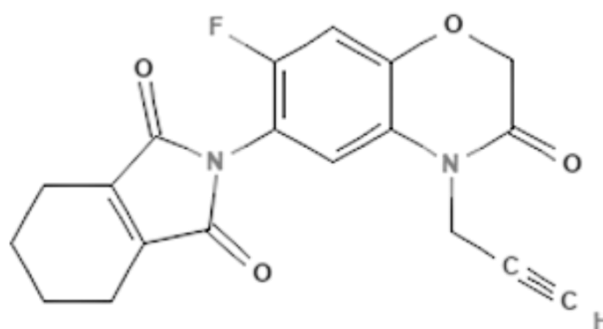
2.2.1 Flumioxazina

De acordo com o Ministério da Agricultura e Pecuária (2023), a flumioxazina é um herbicida que pode ser utilizado tanto em pré quanto em pós-emergência. Trata-se de um herbicida de ação não sistêmica e não seletivo, portanto, atende ao combate tanto de plantas daninhas de folhas largas, quanto de plantas daninhas de folhas estreitas (European Food Safety Authority, 2017).

De acordo com a *National Center for Biotechnology Information* (2024), a

flumioxazina apresenta fórmula molecular $C_{19}H_{15}FN_2O_4$ (Figura 1) e peso molecular de 354,3 $g \cdot mol^{-1}$, densidade 1,5136 $g \cdot mL^{-1}$ e pH 6,2 a 6,4 a 20°C e, além disso, é considerada estável sob condições normais de armazenamento.

Figura 1 – Fórmula estrutural da flumioxazina



Fonte: PubChem Compound Summary for CID 92425, Flumioxazin. *National Center for Biotechnology Information*, 2024.

De acordo com o *Herbicide Resistance Action Committee* (2024), a flumioxazina é um herbicida ativador de espécies reativas de oxigênio, pertencente ao grupo químico N-fenilimidazóis. A flumioxazina é um potente inibidor da enzima protoporfirinogênio oxidase que, por sua vez, catalisa a conversão do protoporfirinogênio IX à protoporfirina IX (precursora da clorofila) dentro dos cloroplastos. Tal inibição leva ao prejuízo da capacidade fotossintética e pode provocar danos irreversíveis em plantas susceptíveis (Dayan; Romagni; Duke, 2001). A inibição da protoporfirinogênio oxidase leva ao acúmulo de protoporfirinogênio IX que, por sua vez, ultrapassa a membrana externa do cloroplasto, alojando-se no citoplasma. No entanto, no citoplasma, o protoporfirinogênio IX é oxidado por ação da membrana celular, liberando protoporfirina IX fotodinâmica e espécies reativas de oxigênio que induzem a peroxidação lipídica dos componentes de membrana, levando a sua ruptura e, ainda, à necrose tecidual (Iwashita *et al.*, 2022).

De acordo com dados do Ministério da Agricultura e Pecuária (2023), o herbicida comercial Flumyazin 500 SC possui 500 $g \cdot L^{-1}$ do ingrediente ativo flumioxazina, único ingrediente ativo do produto comercial. A bula do produto não descreve, no entanto, quais são as moléculas adjuvantes presentes.

Atualmente, esse herbicida é utilizado em uma ampla variedade de culturas,

tais como café, cana de açúcar, milho, soja, trigo, algodão, batata, cebola, entre outras (Brasil, 2023). Seu uso é relatado, ainda, em sistemas não agrícolas como, por exemplo, áreas de lazer e paisagismo (Iwashita *et al.*, 2022). Segundo o registro comercial, para as culturas atendidas, o produto comercial deve apresentar um volume de calda de 150 a 200 L (Brasil, 2023).

A dose de aplicação varia a depender da cultura, do tipo de planta daninha infestante e do período de aplicação. Tomando-se como base uma importante cultura para o estado de Minas Gerais, o café, a recomendação de aplicação é de 50 mL do produto comercial diluído no volume de calda acima referenciado, por hectare, caso seja necessário o combate de plantas daninhas já emergidas. Ainda no café, caso a aplicação se dê antes da emergência das plantas daninhas e após a emergência da cultura, deve-se aplicar 150 a 180 mL do produto comercial diluído, por hectare (Brasil, 2023).

O relatório publicado pela *European Food Safety Authority* (2017) foi produzido em função da grande preocupação acerca do potencial toxicológico da flumioxazina em relação à reprodução de ratos. No entanto, o relatório mostrou que, apesar de tal potencial toxicológico existir

“em casos específicos, como usos menores (por exemplo, em ervilhas de vagem, cebolas de bulbos, cenouras e pastinacas, aveia de inverno (no Reino Unido)), ou para o controle de ervas daninhas em maçãs e peras (nos Países Baixos), citros (Espanha), sorgo (Hungria), girassol (Hungria e Eslováquia), soja (República Tcheca e Hungria), áreas e locais com crescimento de plantas lenhosas (Áustria), plantas ornamentais lenhosas (Áustria) e silvicultura (Hungria), há alternativas químicas insuficientes ao flumioxazim.” (European Food Safety Authority, 2017, p.22)

Na Áustria, por exemplo, alternativas como o glifosato não são possíveis, uma vez que não há autorização de uso de tal herbicida para o mesmo espectro de ervas daninhas e, ainda, para aplicação em pré-emergência. O trabalho de Dayan, Romagni e Duke (2001), já apontava para o potencial uso de herbicidas inibidores da protoporfirinogênio oxidase em culturas como a soja, em função da baixa propensão à resistência, já que há uma ampla gama de herbicidas que atuam nessa rota metabólica, possibilitando, assim, a rotação do uso de tais defensivos.

De acordo com o levantamento acerca do modo de ação e toxicidade em

ratos da flumioxazina, realizado por Iwashita *et al* (2022), tal herbicida mostrou-se hepatotóxica em testes com estes animais, uma vez que promoveu necrose do tecido hepático e degeneração celular, além de teratogênica, por provocar mal formações no septo ventricular e em algumas estruturas ósseas.

O registro do produto aponta que o mesmo não é mutagênico em testes de toxicidade aguda para animais de laboratório. No entanto, a referida bula não menciona quais testes foram desenvolvidos. Já para efeitos crônicos, a bula informa que, em ratos, observou-se insuficiência renal e anemia (Brasil, 2023). O trabalho de Parvan *et al* (2020) demonstrou efeito citotóxico da flumioxazina a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ por meio da redução do índice mitótico. Os referidos autores relataram, ainda, o aumento das anormalidades cromossômicas em bulbos de *Allium cepa* expostos à $0,5$ e 1 g.L^{-1} de flumioxazina. O registro do produto comercial aponta que o mesmo apresenta categoria 5 de classe toxicológica, o que significa que é improvável de causar dano agudo e, quanto à proteção ao meio ambiente, é classificado como "perigoso ao meio ambiente (classe III)" (Brasil, 2023).

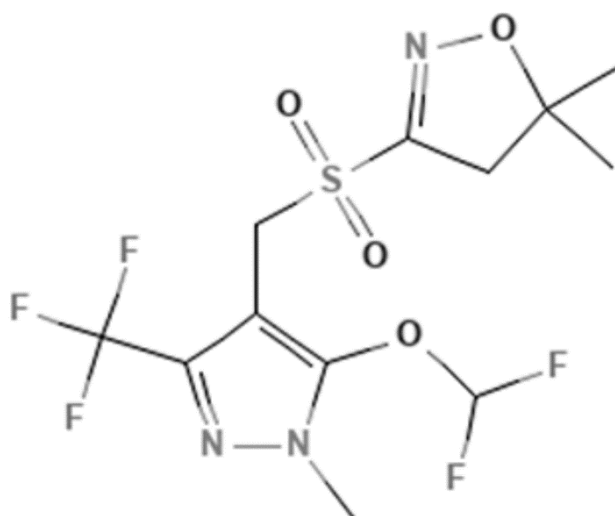
Dados do IBAMA apontam que, em 2022, último dado apresentado, foram comercializadas 3.574 toneladas de flumioxazina; já no intervalo de 2009 a 2022 tal comércio alcançou a média de 2,17 mil toneladas por ano (IBAMA, 2022).

2.2.2 Piroxasulfona

A piroxasulfona é um herbicida que atua em pré-emergência e/ou pós-emergência, de ação sistêmica e considerado seletivo (Brasil, 2024b). Segundo Samota *et al* (2024), a piroxasulfona mostra-se mais eficaz no combate às plantas daninhas de folhas largas e pouco eficaz para a eliminação de plantas daninhas de folhas estreitas (gramíneas); por esse motivo, seu uso é frequentemente associado a outros herbicidas com diferentes modos de ação.

De acordo com o *National Center for Biotechnology Information*, a fórmula molecular da piroxasulfona é $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{F}_5\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ (Figura 2) e tem peso molecular de $391,32 \text{ g.mol}^{-1}$ (National Center For Biotechnology Information, 2024a).

Figura 2 – Fórmula estrutural da piroxasulfona



Fonte: PubChem Compound Summary for CID 11556910, Pyroxasulfone. National Center for Biotechnology Information, 2024a.

A piroxasulfona é um herbicida classificado pelo *Herbicide Resistance Action Committee* como alterador do metabolismo celular e pertence ao grupo químico das isoxazolininas (Herbicide Resistance Action Committee, 2024). A piroxasulfona atua na inibição da biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa (ou seja, com mais de 18 carbonos em sua estrutura). O trabalho de Tanetani *et al* (2009), aponta que tal inibição leva ao acúmulo de ácidos graxos menores que, por sua vez, atuam como precursores de ácidos graxos de cadeia longa. Ao inibir tal síntese, a piroxasulfona leva à prejuízos à membrana plasmática das células vegetais, uma vez que estas apresentam, por exemplo, fosfolipídios e esfingolipídios em sua estrutura. Segundo Chhokar e Sharma (2023), existem relatos de resistência a outros herbicidas inibidores da biossíntese de ácidos graxos de cadeias longas que atuam em outros pontos de tal rota metabólica. Dessa forma, a piroxasulfona tem ganhado espaço na pesquisa e no campo, uma vez que pode se apresentar como uma boa estratégia em locais e culturas em que a resistência já foi verificada.

O herbicida comercial Yamato[®] SC tem como único princípio ativo a piroxasulfona na proporção de 500 g.L⁻¹ sem mencionar, no entanto, a composição de adjuvantes presentes. O mesmo registro aponta, ainda, que o herbicida é indicado para grandes culturas, tais como milho, trigo, soja, café, cana de açúcar, entre outras (Brasil, 2024b). A dose a ser aplicada pode variar em função da cultura, da época de aplicação e da variedade de plantas daninhas infestantes. Para a

cultura do café, por exemplo, recomenda-se a aplicação de 200 a 400 mL do produto comercial diluído em 150 a 200L de volume de calda, por hectare.

O trabalho de Bordignon *et al* (2024), se dedicou a testar diferentes concentrações de piroxasulfona associada a outros herbicidas para o controle de plantas daninhas em produção de bulbos de cebola. Tal trabalho não detectou fitotoxicidade da piroxasulfona para bulbos de cebola. Já o trabalho de Novais *et al* (2021), averiguou que a piroxasulfona levou à redução do comprimento de parte aérea e alongamento de raiz de plantas de alface em concentrações próximas de 10 g i.a.ha⁻¹. Tanetani *et al* (2009) realizaram testes com plantas de arroz e apontaram que o referido herbicida não inibiu a germinação, mas impediu a alongação do broto. Não foram encontrados trabalhos acerca da citogenotoxicidade da piroxasulfona.

De acordo com o registro do produto (Brasil, 2024b) a piroxasulfona apresenta categoria 5 de classe toxicológica e classe III quanto ao potencial de periculosidade ambiental, indicando, portanto, que se trata de um produto improvável de causar danos e perigoso ao meio ambiente, respectivamente. A bula aponta, ainda, que o produto não é mutagênico considerando-se efeitos agudos em animais, mas não aponta quais análises foram desenvolvidas para realizar tal rastreio. Com relação ao efeito crônico (90 dias de exposição), em camundongos, observou-se alterações no fígado e nos rins, mas sem potencial carcinogênico. Nos mesmos organismos, o teste de micronúcleos não detectou potencial genotóxico (Brasil, 2024b).

Dados do IBAMA apontam que, em 2022, último dado apresentado, foram comercializadas 355 toneladas de piroxasulfona; já no intervalo de 2009 a 2022 tal comércio alcançou a média de 0,35 mil toneladas por ano (IBAMA, 2022).

2.2.3 Uso combinado de flumioxazina e piroxasulfona

De acordo com Bordignon *et al* (2024), a mistura de piroxasulfona e flumioxazina foi testada, no início dos anos 2010, para o controle de plantas daninhas em cultivo de soja e, posteriormente difundida para outras culturas como, por exemplo, o cultivo de cebola. Ferrier *et al* (2022) testaram o desenvolvimento de plantas de soja submetidas à diferentes concentrações de piroxasulfona (45, 89, 134, 268 g i.a.ha⁻¹), diferentes concentrações de flumioxazina (35, 70, 106, 211 g i.a.ha⁻¹) e a diferentes concentrações de produto comercial composto pela junção desses dois herbicidas (45+35, 89+70, 134+106 e 268+211 g i.a.ha⁻¹ piroxasulfona +

flumioxazina, respectivamente). Os resultados obtidos apontaram que a junção de piroxasulfona e flumioxazina é mais eficiente no combate às plantas daninhas resistentes em cultivo de soja, porém, leva ao maior índice de injúrias na cultura, em comparação com plantas não tratadas.

Bordignon *et al* (2024) testaram a junção dos herbicidas diuron, piroxasulfona e flumioxazina em cultivos de cebolas sendo a concentração de diuron de todos os tratamentos igual a 500 g.ha⁻¹. Assim, nos demais tratamentos, os autores avaliaram a influência a piroxasulfona e da mistura de piroxasulfona e flumioxazina. Nesse estudo, os autores demonstraram que a união de piroxasulfona e flumioxazina apresentou melhor combate de plantas daninhas em cultivos de cebola.

Pesquisas que visam averiguar o efeito da mistura de piroxasulfona e flumioxazona ainda são escassas, uma vez que se trata de dois herbicidas relativamente novos no mercado mundial (anos 2010, aproximadamente) e registrados há poucos anos no Brasil (2017 e 2020, respectivamente) e, nesse contexto, novos estudos se tornam necessários e interessantes (Novais *et al.*, 2021).

De acordo com dados do Ministério da Agricultura e Pecuária (2024a), o herbicida comercial Falcon® apresenta a mistura de flumioxazina e piroxasulfona na proporção 1:1, sendo 200 g.L⁻¹ de cada um desses ingredientes ativos. De acordo com a bula do produto, trata-se de um herbicida pré-emergente, seletivo, de ação sistêmica e de contato. É recomendado para uso em culturas de café, cana-de-açúcar, citros, eucalipto, mandioca e pinus. Sua forma de aplicação varia em função da cultura, da época de aplicação e da variedade de plantas daninhas infestantes. Para a cultura do café, por exemplo, recomenda-se a aplicação de 300 a 1000 mL do produto comercial dissolvido em 150 a 200 L de volume de calda, por hectare. O mesmo volume de calda é recomendado para todas as demais culturas.

Ainda de acordo com o registro do produto, o mesmo é considerado improvável de causar dano agudo (categoria toxicológica 5) e perigoso ao meio ambiente (categoria III de periculosidade ambiental). Os dados sobre os efeitos crônicos do produto trazem informações separadas da toxicidade da piroxasulfona e da flumioxazina, não deixando claro seu potencial toxicológico na aplicação conjunta (Brasil, 2024a).

2.3 ANÁLISES DE CITOGENOTOXICIDADE

Os riscos à saúde das pessoas e do meio ambiente, associado aos contaminantes ambientais relaciona-se com o tempo de exposição, a frequência de contato e a concentração de tais produtos. No entanto, muitas vezes não é possível verificar todos os efeitos que esses poluentes provocam nos seres vivos. Assim, é preciso lançar mão de uma ampla variedade de testes e indicadores do potencial toxicológico, a fim de garantir a saúde ambiental e dos seres humanos.

De acordo com Chakrabarti e Mukherjee (2021), a detecção da viabilidade celular, o potencial de membrana mitocondrial, índice mitótico, frequência de anormalidades cromossômicas, teste de micronúcleo e detecção de danos ao DNA são biomarcadores relevantes para ensaios de citogenotoxicidade. Tais análises, *in vivo* e *in vitro* podem fornecer informações relevantes de monitoramento ambiental (Cherednichenko; Pilyugina; Nuraliev, 2022). Assim, análises citogenotóxicas são aquelas empregadas a fim de se verificar possíveis efeitos tóxicos à célula e ao DNA dos organismos expostos aos agentes toxicantes (Iqbal *et al.*, 2019).

Índices mitóticos abaixo dos valores obtidos em controles negativos, por exemplo, indicam efeito citotóxico de supressão do ciclo celular, enquanto índices mitóticos superiores àqueles encontrados no controle negativo indicam uma multiplicação desordenada das células expostas (Iqbal *et al.*, 2019). De acordo com Yadav *et al.* (2024), a avaliação de anormalidades cromossômicas e da presença de micronúcleos (MN) são importantes oportunidades de se verificar o potencial genotóxico de substâncias químicas ou poluentes ambientais. Tais anormalidades cromossômicas podem ser definidas como mudanças no número e na estrutura de cromossomos e incluem: aderência entre cromossomos, perdas e pontes cromossômicas, distribuição e separação irregular de cromossomos, cromossomos atrasados, c-metáfase e anáfase poliploide (Iqbal *et al.*, 2019).

De acordo com Souza, Guedes e Fontanetti (2016), as anormalidades cromossômicas podem ser clastogênicas que, por sua vez, envolvem quebras da molécula de DNA, e aneugênicas, ou seja, alterações que envolvem a incorreta cariocinese no processo de divisão celular, seja pela alteração da formação do fuso mitótico ou pela interação incorreta dos cromossomos com as fibras do fuso. Mais recentemente, alguns trabalhos têm apontado a avaliação de nucléolo, cuja principal função é determinar a formação das subunidades ribossômicas como outro parâmetro indicativo de toxicidade. A observação de estruturas nucleolares com a

finalidade de averiguação citogenotóxica deve se balizar pelo número de nucléolos verificados e, ainda, pelo tamanho dessas estruturas. A quantidade de nucléolos indica o número de Regiões Organizadores de Nucléolo - NORs ativas, enquanto o tamanho dos nucléolos informa a atividade transcricional das NORs (Lima *et al.*, 2019).

2.3.1 Bioensaios vegetais para análise de citogenotoxicidade

Os bioensaios utilizados com foco em análises de citogenotoxicidade podem ser divididos basicamente em dois grupos, de acordo com suas características biológicas e genéticas. Bioensaios em procariotos permitem detectar agentes que induzem mutações e danos ao DNA (Yadav *et al.*, 2024). Em contrapartida, bioensaios eucariotos permitem a verificação de danos diretos ao DNA por meio da detecção de alterações cromossômicas estruturais e numéricas, e, ainda, danos indiretos, como alterações no fuso mitótico, taxas de apoptose e necrose tecidual. Tais dados podem fornecer informações acerca de alterações que podem ocorrer em diferentes células e tecidos (Grant, 1994; Iqbal *et al.*, 2019).

Os bioensaios vegetais são, ainda, apresentados na literatura envolvendo a realização de ensaios fitotóxicos que, por sua vez, avaliam os aspectos como número e comprimento das raízes obtidas e sua estrutura e/ou características visuais (Parvan *et al.*, 2020). Frequentemente, dados obtidos em ensaios fitotóxicos relacionam-se com os dados obtidos em ensaios citogenotóxicos como, por exemplo, a redução do comprimento de raiz, frequentemente, indica redução também nos valores de índice mitótico (Iqbal *et al.*, 2019). Nesse contexto, os bioensaios vegetais são amplamente descritos na literatura como mecanismos de detecção e mensuração de toxicidade a fim de se averiguar a saúde ambiental (Cherednichenko; Pilyugina; Nuraliev, 2022; Lima *et al.*, 2019; Liman; Ciğerci; Öztürk, 2015).

Souza, Guedes e Fontanetti (2016), apontam uma série de vantagens pelo uso de bioensaios vegetais, tais como, a praticidade de conduções experimentais em diferentes condições ambientais; baixo custo dos testes; possibilidade de realização dos testes em organismos produtores, portanto essenciais em todas as cadeias alimentares, entre outras vantagens. Além disso, Iqbal *et al.* (2019) apontam que os bioensaios vegetais fornecem resultados facilmente correlacionados com os

resultados obtidos por outras metodologias que envolvem outros organismos.

Nesse cenário, os bioensaios vegetais figuram como uma excelente alternativa para testes de toxicidade de agentes contaminantes ambientais. De acordo com o levantamento realizado por Da Silva e Andrade-Vieira (2025), alguns exemplos de organismos frequentemente utilizados para análises de toxicidade ambiental são *Allium cepa* (cebola), *Vicia faba* (fava), *Lactuca sativa* (alface), *Tradescantia* (tradescância), *Pisum sativum* (ervilha), *Hordeum vulgare* (cevada), *Zea mays* (milho), *Crepis capillaries* (crepis) e *Nicotiana tabacum* (tabaco). Bonciu *et al.* (2018) destacam *Allium cepa* como um excelente bioensaio, utilizado desde os anos 1940 para estudos mitóticos.

Diversos autores apontam que *Allium cepa* representa um excelente bioensaio frente à outras opções vegetais em função de seus cromossomos grandes ($2n=2x=16$) que permitem clara visualização microscópica além de sua sensibilidade na detecção de mutações cromossômicas (Bianchi; Fernandes; Marin-Morales, 2016; Chakrabarti; Mukherjee, 2021; Felisbino *et al.*, 2018; Leme; Marin-Morales, 2009; Liman; Ciğerci; Öztürk, 2015). *Allium cepa* é, ainda, uma das recomendações da Organização Mundial da Saúde para rastreamento e monitoramento de agentes com potencial citogenotóxico (Chakrabarti; Mukherjee, 2021). De acordo com Souza, Guedes e Fontanetti (2016), entre os parâmetros avaliados na utilização de *Allium cepa* como bioensaio vegetal, a verificação do ciclo celular pelo cálculo do índice mitótico, bem como a presença de anormalidades cromossômicas são os aspectos mais aceitos e utilizados na literatura.

2.3.2 *Allium cepa* em análises de citogenotoxicidade de defensivos agrícolas

Há anos *Allium cepa* vem sendo utilizado como um bioensaio para determinação de citogenotoxicidade de defensivos agrícolas. O trabalho de Badr e Elkington, datado de 1982, por exemplo, demonstra sua utilização para análise citogenotóxica do herbicida isoproturon, por meio da exposição de bulbos à quatro diferentes concentrações do referido defensivo, com posterior avaliação do índice mitótico e frequência de anormalidades cromossômicas. Os autores detectaram que o isoproturon, à 2500 ppm, levou à redução do índice mitótico e ao aumento das anormalidades cromossômicas nas células meristemáticas de *Allium cepa* (Badr; Elkington, 1982).

Enfatizando-se trabalhos mais recentes, como o realizado por Liman, Ciğerci e Öztürk (2015), verificou-se que o herbicida imazetapir, nas concentrações de 20 e 40 ppm, é citogenotóxico para bulbos de *Allium cepa*, por reduziu o índice mitótico e aumentar o dano ao DNA, detectado por ensaio cometa. Bianchi, Fernandes e Marin-Morales (2016), testaram a citogenotoxicidade do herbicida sulfentrazone em conjunto com o inseticida imidacloprida em sementes de *Allium cepa*. Os resultados apontaram que a junção dos dois defensivos leva a citogenotoxicidade por induzir aumento na frequência de anormalidades cromossômicas e nucleares.

O trabalho de Felisbino *et al.* (2018) se propôs a investigar o potencial citogenotóxico, por meio da determinação do índice mitótico, frequência de anormalidades cromossômicas e frequência de micronúcleos, do herbicida mesotriona, de forma isolada e combinada com o herbicida atrazina, ambos inibidores da síntese de carotenoides. Para tanto, os pesquisadores utilizaram sementes de *Allium cepa* expostas por 5 dias à diferentes concentrações de mesotriona, atrazina e da combinação mesotriona + atrazina. Os resultados obtidos apontam que a mesotriona utilizada isoladamente não apresentou efeito citogenotóxico para *Allium cepa*. No entanto, a atrazina e a combinação de atrazina + mesotriona, levaram à redução do índice mitótico, aumento das anormalidades cromossômicas e da presença de micronúcleos.

Mercado e Caleño (2020), avaliaram o índice mitótico e a frequência de anormalidades cromossômicas em bulbos de *Allium cepa* expostos à 5, 10, 15, 25 e 30 mg.L⁻¹ do herbicida glifosato. Os referidos autores, verificaram redução dos valores de índice mitótico em todos os tratamentos, em comparação ao controle negativo. Todas as concentrações utilizadas levaram, ainda, à maior presença de anormalidades cromossômicas, sobretudo micronúcleo.

Nos estudos de Liman *et al.* (2022), verificou-se que a petoxamida, um herbicida com ação sobre a produção de ácidos graxos de cadeia longa, é capaz de produzir efeito citogenotóxico em células meristemáticas de bulbos de *Allium cepa* expostas à 25, 50 e 100 µg.mL⁻¹ do referido herbicida.

Corroborando com o exposto, o trabalho realizado por Camilo-Cotrim *et al.* (2022), aponta que *Allium cepa* representa um importante bioensaio para determinação da citogenotoxicidade de defensivos agrícolas podendo seus dados serem extrapolados para outros organismos, inclusive humanos.

3 ARTIGO: AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA CITOGENOTOXICIDADE DOS HERBICIDAS PIROXASULFONA E FLUMIOXAZINA POR MEIO DO BIOENSAIO *Allium cepa* L.

Título em inglês: Comparative evaluation of the cytogenotoxicity of the herbicides pyroxasulfone and flumioxazin using the *Allium cepa* L. Bioassay.

Trabalho submetido para a revista: Journal of Hazardous Materials

Fator de impacto: 12.2

Qualis: A1

Journal of Hazardous Materials

Comparative evaluation of the cytogenotoxicity of the herbicides pyroxasulfone and flumioxazin using the *Allium cepa* L. Bioassay. –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Herbicide mixture; Mitotic index; Chromosomal abnormalities. Nuclear abnormalities.
Corresponding Author:	Gabriela Ezequiel Costa Martins Universidade Federal de Alfenas BRAZIL
First Author:	Gabriela Ezequiel Costa Martins
Order of Authors:	Gabriela Ezequiel Costa Martins João Calvelli Barbosa Thallys Duarte Esteves da Silva Anelise Vieira Rosa Fernandes da Silva Antônio Rodrigues da Cunha Neto Eric Ferreira Batista Laiane Rocha Corsini Sandro Barbosa
Abstract:	The increasing use of pesticides to meet global food demand has raised concerns regarding their impacts on environmental health. This study aimed to evaluate the cytogenotoxic potential of three commercial herbicides, recommended for crops such as coffee, soybean, and sugarcane, containing: pyroxasulfone, flumioxazin, and a 1:1 combination of both. The <i>Allium cepa</i> bioassay, a widely validated method for cytogenotoxic analyses, was employed. Seeds were exposed to a concentration of 5 mL·L ⁻¹ of each herbicide. Distilled water was used as a negative control, and methyl methanesulfonate as a positive control. The mitotic index (MI), the frequency of chromosomal and nuclear abnormalities (FCNA), the number and mean area of nucleoli, were evaluated. Based on the FCNA, the Nuclear Genotoxic Effect (NGE) and the Mitotic Genotoxic Effect (MGE) were determined. All tested herbicides reduced the MI, increased the FCNA and the number of nucleoli, and decreased nucleolar area, demonstrating cytogenotoxic effects. NGE was not detected, but all treatments exhibited MGE, indicating that the alterations occurred more frequently during different mitotic phases. No significant differences were observed among the three treatments, suggesting that the herbicide combination did not result in either synergism or antagonism regarding cytogenotoxicity.

Comparative evaluation of the cytogenotoxicity of the herbicides pyroxasulfone and flumioxazin using the *Allium cepa* L. Bioassay.

ABSTRACT

The increasing use of pesticides to meet global food demand has raised concerns regarding their impacts on environmental health. This study aimed to evaluate the cytogenotoxic potential of three commercial herbicides, recommended for crops such as coffee, soybean, and sugarcane, containing: pyroxasulfone, flumioxazin, and a 1:1 combination of both. The *Allium cepa* bioassay, a widely validated method for cytogenotoxic analyses, was employed. Seeds were exposed to a concentration of 5 mL·L⁻¹ of each herbicide. Distilled water was used as a negative control, and methyl methanesulfonate as a positive control. The mitotic index (MI), the frequency of chromosomal and nuclear abnormalities (FCNA), the number and mean area of nucleoli, were evaluated. Based on the FCNA, the Nuclear Genotoxic Effect (NGE) and the Mitotic Genotoxic Effect (MGE) were determined. All tested herbicides reduced the MI, increased the FCNA and the number of nucleoli, and decreased nucleolar area, demonstrating cytogenotoxic effects. NGE was not detected, but all treatments exhibited MGE, indicating that the alterations occurred more frequently during different mitotic phases. No significant differences were observed among the three treatments, suggesting that the herbicide combination did not result in either synergism or antagonism regarding cytogenotoxicity.

Keywords: Herbicide mixture; Mitotic index; Chromosomal abnormalities. Nuclear abnormalities.

Environmental Implication

The study demonstrates that the herbicides flumioxazin, pyroxasulfone, and their 1:1 combination negatively affect meristematic cells of *Allium cepa*, indicating potential environmental risk. The observed cytogenotoxicity — including mitotic index reduction, increased chromosomal abnormalities, and nucleolar alterations — suggests that agricultural use of these compounds may harm non-target organisms and impact soil biodiversity. These findings highlight the importance of rigorous assessment of agrochemicals prior to approval and continued application, particularly given their environmental persistence and potential to disrupt key biological processes essential for ecological balance.

1. Introduction

Ensuring robust agricultural production capable of meeting the global demand for food is often the primary justification for the widespread use of pesticides (DAS *et al.*, 2024; SAMOTA *et al.*, 2024). However, such agrochemicals present several critical drawbacks that warrant attention, including the risk of environmental contamination, the potential for selecting resistant organisms, and the effects arising from their interaction with other chemical compounds (CHEREDNICHENKO; PILYUGINA; NURALIEV, 2022). Among the various classes of pesticides, herbicides rank among the most frequently registered and commercialized in Brazil (IBAMA, 2022; COORDENAÇÃO GERAL DE AGROTÓXICOS E AFINS, 2024).

A wide range of active ingredients is employed in the diverse array of herbicides available in the Brazilian market. For the present study, the substances flumioxazin and pyroxasulfone were selected due to their presence in commercial products registered by the *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento* (MAPA) in 2017 and 2020, respectively, and for their widespread use in crops of significant national and regional importance, such as soybean, wheat, and coffee. According to data from the *Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais* (IBAMA), in 2022 (the most recent data available), these two active ingredients accounted for approximately 4,000 tons sold in Brazil (IBAMA, 2022).

According to MAPA (2023), flumioxazin is a herbicide that can be applied both pre- and post-emergence. It is a non-systemic and non-selective compound, effectively targeting both broadleaf and narrowleaf weed species (European Food Safety Authority, 2017). The commercial formulation contains 500 g·L⁻¹ of active ingredient, and the recommended application rate ranges from 40 to 800 mL, diluted in 150 to 200 L of spray solution, depending on the crop, timing of application, and the diversity of weed species present (Ministério da Agricultura e Pecuária, 2023).

According to the Herbicide Resistance Action Committee (HRAC, 2024), flumioxazin belongs to the chemical class of N-phenylimides and acts as a potent inhibitor of the enzyme protoporphyrinogen oxidase, which catalyzes the conversion of protoporphyrinogen IX into protoporphyrin IX – a precursor of chlorophyll – within chloroplasts. Inhibition of this enzyme impairs the plant's photosynthetic capacity and can lead to irreversible damage in susceptible species (Dayan; Romagni; Duke, 2001).

The registration data for the commercial product containing flumioxazin indicates that it is not mutagenic based on acute toxicity tests in laboratory animals. However, the product label does not specify the types of tests conducted (Ministério da Agricultura e Pecuária, 2023). The study by Parvan *et al.* (2020) – the only one found that specifically assessed the cytogenotoxicity of flumioxazin – reported a reduction in the mitotic index and an increase in chromosomal abnormalities in *Allium cepa* root meristems exposed to concentrations of 0.5 and 1 g·L⁻¹.

Pyroxasulfone is a selective herbicide that acts in pre-emergence and/or post-emergence stages and exhibits systemic action (Ministério da Agricultura e Pecuária, 2024b). According to Samota *et al.* (2024), pyroxasulfone is more effective in controlling broadleaf weed species and less effective against narrowleaf (grass) weeds. For this reason, it is often used in combination with other herbicides that have different modes of action. The Herbicide Resistance Action

Committee (HRAC, 2024) classifies pyroxasulfone as belonging to the chemical group of isoxazolines and indicates that it inhibits the biosynthesis of very long-chain fatty acids (VLCFAs). The study by Tanetani *et al.* (2009) reports that such inhibition leads to the accumulation of shorter-chain fatty acids, which are precursors of VLCFAs. By disrupting this biosynthetic pathway, pyroxasulfone compromises the integrity of the plant cell plasma membrane.

The commercial product containing pyroxasulfone as the sole active ingredient (500 g·L⁻¹) recommends an application rate ranging from 150 to 600 mL diluted in 150 to 200 L of spray solution, depending on the crop, timing of application, and weed spectrum. The product label also indicates the absence of mutagenic effects in acute toxicity tests conducted on exposed animals; however, no details regarding the specific tests performed are provided. Bordignon *et al.* (2024) conducted experiments using different concentrations of pyroxasulfone to assess its effects on onion bulb production. However, the study did not aim to investigate the cytogenotoxic potential of pyroxasulfone. The literature review conducted for the present study did not identify any research explicitly focused on evaluating this endpoint.

In order to achieve more effective weed control, producers often apply herbicides in combination, thereby broadening the spectrum of action of these agrochemicals (Das *et al.*, 2024). However, this practice raises environmental concerns, as it may lead to changes in toxicity profiles due to possible chemical interactions, which can result in synergistic or antagonistic effects (Felisbino *et al.*, 2018). Therefore, studies that focus exclusively on the toxicological assessment of individual substances may underestimate actual toxicity levels when compared to studies assessing mixtures, since real-world agricultural conditions typically involve the combined action of multiple residual compounds. This scenario can lead to various acute and chronic effects on soil microbiota and other organisms (Maggi & Tang, 2021).

According to Bordignon *et al.* (2024), the mixture of pyroxasulfone and flumioxazin was initially tested in the early 2010s for weed control in soybean cultivation and later extended to other crops, such as onion. Research investigating the effects of pyroxasulfone and flumioxazin combinations remains limited, as these are relatively new herbicides on the global market (introduced around the 2010s) and were only recently registered in Brazil (in 2017 and 2020, respectively). In this context, new studies are both necessary and of great relevance (Novais *et al.*, 2021).

Plant bioassays have emerged as important tools for assessing the cytogenotoxicity of environmental contaminants. Among the main endpoints evaluated are the mitotic index, frequency of chromosomal abnormalities, and nucleolar alterations (da Silva & Andrade-Vieira, 2025). Several authors have pointed out that *Allium cepa* is an excellent model organism for plant-based bioassays, due to its large chromosomes ($2n = 2x = 16$), which allow clear microscopic visualization, as well as its high sensitivity to chromosomal mutations (Bianchi, Fernandes & Marin-Morales, 2016; Chakrabarti & Mukherjee, 2021; Felisbino *et al.*, 2018; Leme & Marin-Morales, 2009; Liman, Ciğerci & Öztürk, 2015). *Allium cepa* is also one of the species recommended by the World Health Organization for screening and monitoring agents with potential cytogenotoxic effects (Chakrabarti & Mukherjee, 2021).

Thus, the present study aimed to investigate the cytogenotoxic potential of pyroxasulfone and flumioxazin, both individually and in combination, using recently registered commercial products in Brazil. The analysis focused on mitotic index, frequency of chromosomal and nuclear abnormalities, and nucleolar patterns—endpoints widely accepted in the literature for meristematic *Allium cepa* cells.

2. Materials and Methods

2.1 Treatments

Commercial herbicides were obtained from the local agricultural supply market, containing the following active ingredients: pyroxasulfone (500 g·L⁻¹), flumioxazin (500 g·L⁻¹), and a 1:1 mixture of pyroxasulfone and flumioxazin (200 g·L⁻¹ of each active ingredient).

Initially, seven field-equivalent concentrations of each herbicide were selected for the development of the assays: 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, and 40 mL·L⁻¹. Distilled water was used as the negative control, while methyl methanesulfonate (MMS; Sigma-Aldrich, CAS No. 66-27-3) served as the positive control, as recommended by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2023). The MMS was applied at a concentration of 0.01 mL·L⁻¹, in accordance with values reported in the literature for cytogenotoxicity testing (Bianchi, Fernandes & Marin-Morales, 2016; Felisbino *et al.*, 2018).

2.2 Plant Material

Seeds of *Allium cepa*, cultivar Baia Periforme (Feltrin Sementes LTDA, batch 0091702035030043), with a germination rate of 98%, were used in this study.

The assays were conducted in Petri dishes (Ø 15 cm) containing two sheets of germination paper moistened with 5 mL of the respective treatments and controls. Each treatment included four replicates, with each replicate represented by one Petri dish containing 50 seeds. The dishes were incubated in a BOD growth chamber (Ethick Technology, model F411) at 21°C under a 12-hour photoperiod, as established by the *Regras para Análise de Sementes – RAS* (BRASIL, 2009), for 96 hours. This period was sufficient for the root tips to reach an approximate length of 0.5 cm (Guerra & Souza, 2002). After the incubation period, root tips were collected and fixed in Carnoy's solution (25% acetic acid : 75% absolute ethanol). The fixed roots were then stored at -18°C ± 1°C until cytogenetic slide preparation.

2.3 Mitotic Index (MI) and Frequency of Chromosomal and Nuclear Abnormalities (FCNA) Assessment

To determine the mitotic index (MI) and the frequency of chromosomal and nuclear abnormalities (FCNA), the root tips stored in Carnoy's fixative were processed using the

squashing and spreading technique described by Cunha Neto *et al.* (2023; 2025). The classification of abnormalities followed the criteria established by Bianchi, Fernandes, and Marin-Morales (2016).

The slides were analyzed under an Axio Scope A1 optical microscope at 640x magnification for both MI and FCNA evaluations. A total of 8,000 cells per treatment were examined. The MI was calculated using the formula: $MI = (NCM / TNC) \times 100$, where NCM is the number of cells in mitosis and TNC is the total number of cells analyzed. The FCNA was calculated using the expression: $FCNA = (NCNA / TNC) \times 100$, where NCNA is the number of chromosomal and nuclear abnormalities observed and TNC is the total number of cells analyzed per treatment.

According to Andrade-Vieira *et al.* (2019), abnormalities may be chromosomal –occurring during mitotic phases – or nuclear, observed in interphase cells. Therefore, to better understand the effects of the treatments on the chromosomal integrity of the bioassay, the Mitotic Genotoxic Effect (MGE) and Nuclear Genotoxic Effect (NGE) were also determined. The MGE was calculated using the formula: $MGE = (\Sigma CA / NMC) \times 100$, where ΣCA is the total number of chromosomal abnormalities (e.g., chromosomal bridges, c-metaphases, stickiness, lagging chromosomes, and chromosome loss), and NMC is the total number of mitotic cells. The NGE was calculated using the formula: $NGE = (\Sigma NA / NIC) \times 100$, where ΣNA represents the total number of nuclear abnormalities (e.g., micronuclei, nuclear buds, and lobed nuclei), and NIC is the number of interphase cells analyzed.

2.4 Nucleolar Analysis

For the nucleolar analysis, the *Allium cepa* root tips stored in Carnoy's solution were subjected to the crushing and spreading method described in section 2.3. The slides were then covered with nylon fiber, to which 2 drops of a 0.02 g.mL⁻¹ gelatin solution, diluted in 1% formic acid, and 2 drops of silver nitrate at 0.5 g.mL⁻¹ were added. After this procedure, the slides were heated in a humid chamber until they achieved a brownish color. The number of nucleoli per nucleus was determined by analyzing 1,200 nuclei per treatment. The normal number of nucleoli per nucleus in *Allium cepa* is considered to be between 1 and 2. Thus, the total number of cells with up to 2 nucleoli per nucleus was divided by the total number of cells evaluated to determine the percentage of normal cells, as outlined in the protocol by Lima *et al.* (2019).

The cytogenetic preparations were examined using an Axio Scope A1 optical microscope at 640x magnification, with images captured and later analyzed and measured using the AxioVision SE64 Rel 4.8 software.

2.5 Statistical Analyses

The experimental design adopted was a completely randomized design, consisting of seven concentrations for each herbicide, along with two controls (negative control – distilled water

– and positive control – Methyl methanesulfonate, MMS). Orthogonal contrast analysis was performed, followed by ANOVA for mean comparisons ($p \leq 0.05$). All statistical analyses were conducted using R software (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016).

3. Results

From the range of seven tested concentrations for each herbicide, preliminary analyses led to the exclusion of the $0.625 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration, as it exhibited equivalent results to the $1.25 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ treatment. The $40 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration was also excluded, as it did not allow for the development of the bioassay and proper collection of biological material required for subsequent analyses. Therefore, the mitotic index, frequency of chromosomal and nuclear abnormalities, and nucleolar analysis were carried out using the remaining five concentrations ($1.25, 2.5, 5, 10,$ and $20 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$). However, statistical analysis indicated no significant differences among concentrations of the same herbicide (data not shown). Consequently, the results presented here correspond to the intermediate concentration ($5 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$) of each herbicide.

3.1 Mitotic Index (MI) and Frequency of Chromosomal and Nuclear Abnormalities (FCNA)

All three herbicides tested induced a significant ($p < 0.05$) reduction in mitotic index (MI) values (Table 1). For flumioxazin and the flumioxazin + pyroxasulfone combination, this reduction exceeded 50% compared to the negative control (NC).

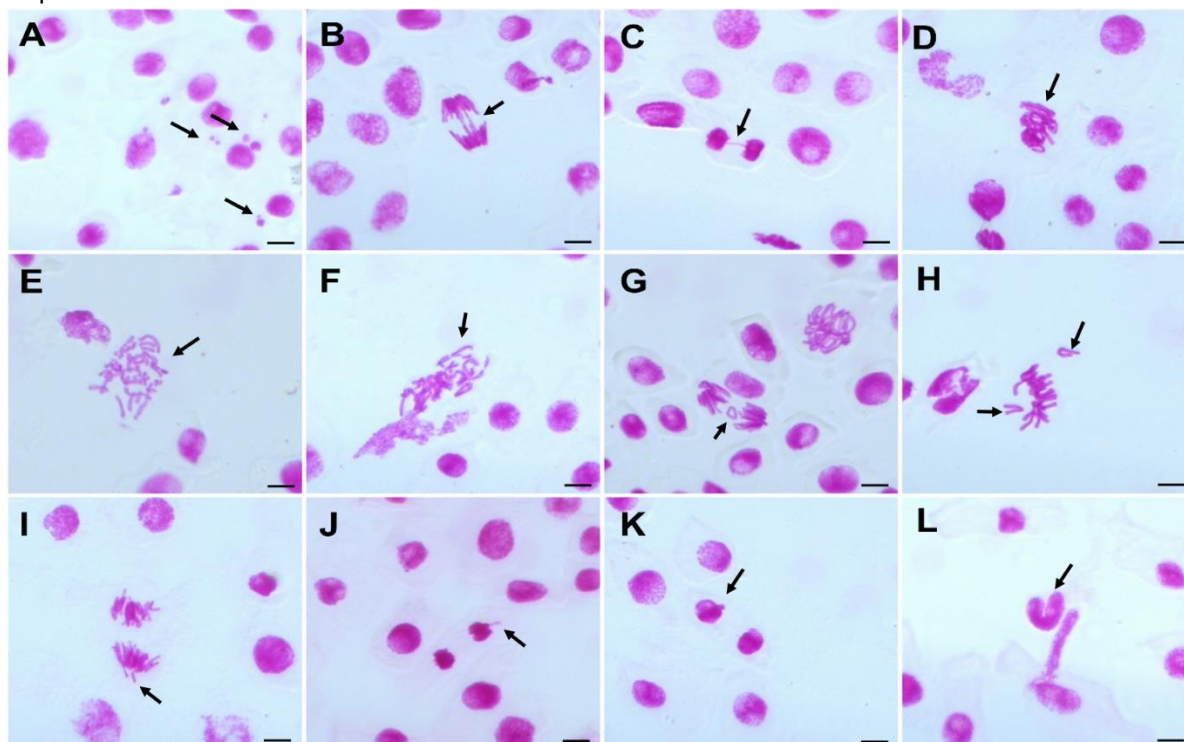
Table 1. Mitotic index (MI) values and frequency of chromosomal and nuclear abnormalities (FCNA) observed in *Allium cepa* meristematic cells exposed to different herbicide treatments.

Treatments	MI		FCNA	
NC	$18,96\% \pm 0,035$	a	$0,31\% \pm 0,001$	b
Flumioxazin	$7,73\% \pm 0,032$	b	$1,65\% \pm 0,004$	a
Pyroxasulfone	$11,57\% \pm 0,026$	b	$1,68\% \pm 0,003$	a
Flumioxazin + Pyroxasulfone	$7,05\% \pm 0,026$	b	$1,25\% \pm 0,003$	a
MMS	$15\% \pm 0,009$	a	$2,07\% \pm 0,001$	a

MI: mitotic index. FCNA: frequency of chromosomal and nuclear abnormalities. NC: negative control. MMS: methyl methanesulfonate. Different letters indicate statistically significant differences at $p < 0.05$.

The following abnormalities were observed: anaphase bridges, telophase bridges, stickiness, c-metaphase, lost chromosomes, lagging chromosomes in anaphase, lagging chromosomes in telophase, micronuclei, nuclear buds, and lobed nuclei (Figure 1).

Figure 1. Chromosomal and nuclear abnormalities observed in meristematic cells of *Allium cepa* exposed to the treatments.



A: micronucleus. B: anaphase bridge. C: telophase bridge. D: stickiness. E and F: c-metaphase. G and H: lost chromosome. I: lagging chromosome in anaphase. J: lagging chromosome in telophase. K: nuclear bud. L: lobed nucleus. The scale bar represents 10 μ m.

All three herbicides induced a statistically significant increase ($p < 0.05$) in the frequency of chromosomal and nuclear abnormalities compared to the negative control (Table 1). However, no significant differences were observed among the herbicide treatments or between them and the positive control, methyl methanesulfonate – a compound with well-established cytogenotoxic activity (OECD, 2023). The percentage distribution of each type of abnormality observed is presented in Table 2.

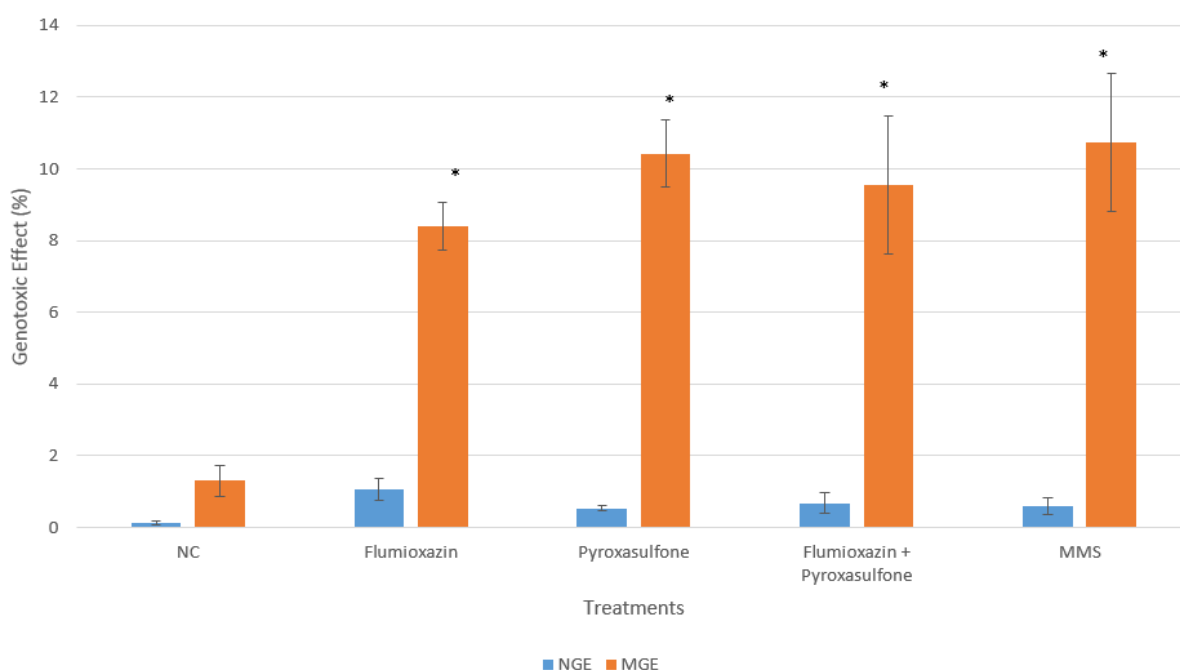
Table 2: Percentage frequency of each chromosomal and nuclear abnormality.

Treatments	MN	NB	LN	AB	TB	CMet	Stick	LC	LCA	LCT
NC	0,075 \pm 0,043	0,013 \pm 0,043	0,013 \pm 0,013	,025 \pm 0,014	0 \pm 0	0,038 \pm 0,038	0,088 \pm 0,013	0,013 \pm 0,013	0,025 \pm \pm 0,014	0,025 \pm 0,014
Flumioxazin	0,375 \pm 0,148	0,275 \pm 0,149	0,325 \pm 0,097	,050 \pm 0,035	0,063 \pm 0,031	0 \pm 0	0,225 \pm 0,192	0,025 \pm 0,014	0,188 \pm 0,088	0,125 \pm 0,078
Pyroxasulfone	0,150 \pm 0,106	0,213 \pm 0,085	0,113 \pm 0,066	,088 \pm 0,038	0 \pm 0	,050 \pm 0,050	0,388 \pm 0,109	0,038 \pm 0,024	0,313 \pm 0,083	0,338 \pm 0,099
Flumioxazin + Pyroxasulfone	0,213 \pm 0,142	0,2 \pm 0,1	0,225 \pm 0,078	,013 \pm 0,013	0 \pm 0	,038 \pm 0,024	0,2 \pm 0,151	0,038 \pm 0,024	0,163 \pm 0,083	0,163 \pm 0,075
MMS	0,138 \pm 0,077	0,250 \pm 0,074	0,113 \pm 0,066	0,025 \pm 0,014	0,075 \pm 0,014	0,800 \pm 0,048	0,1 \pm 0,292	0,288 \pm 0,035	0,238 \pm 0,097	1,550 \pm 0,038

MN: micronucleus. NB: nuclear bud. LN: lobed nucleus. AB: Anaphase bridge. TB: telophase bridge. Cmet: c-metaphase. Stick: stickiness. LC: lost chromosome. LCA: lagging chromosome in anaphase. LCT: lagging chromosome in telophase. NC: negative control. MMS: methyl methanesulfonate.

The combination of nuclear abnormalities enabled the determination of the Nuclear Genotoxic Effect (NGE), since micronuclei, nuclear buds, and lobed nuclei are abnormalities observed during interphase. On the other hand, chromosomal bridges, c-metaphases, stickiness, lost chromosomes, and delayed chromosomes are detected during different stages of mitosis and were therefore used to determine the Mitotic Genotoxic Effect (MGE) (Figure 2).

Figure 2: Nuclear Genotoxic Effect (NGE) and Mitotic Genotoxic Effect (MGE) in meristematic cells of *Allium cepa* exposed to controls and treatments.



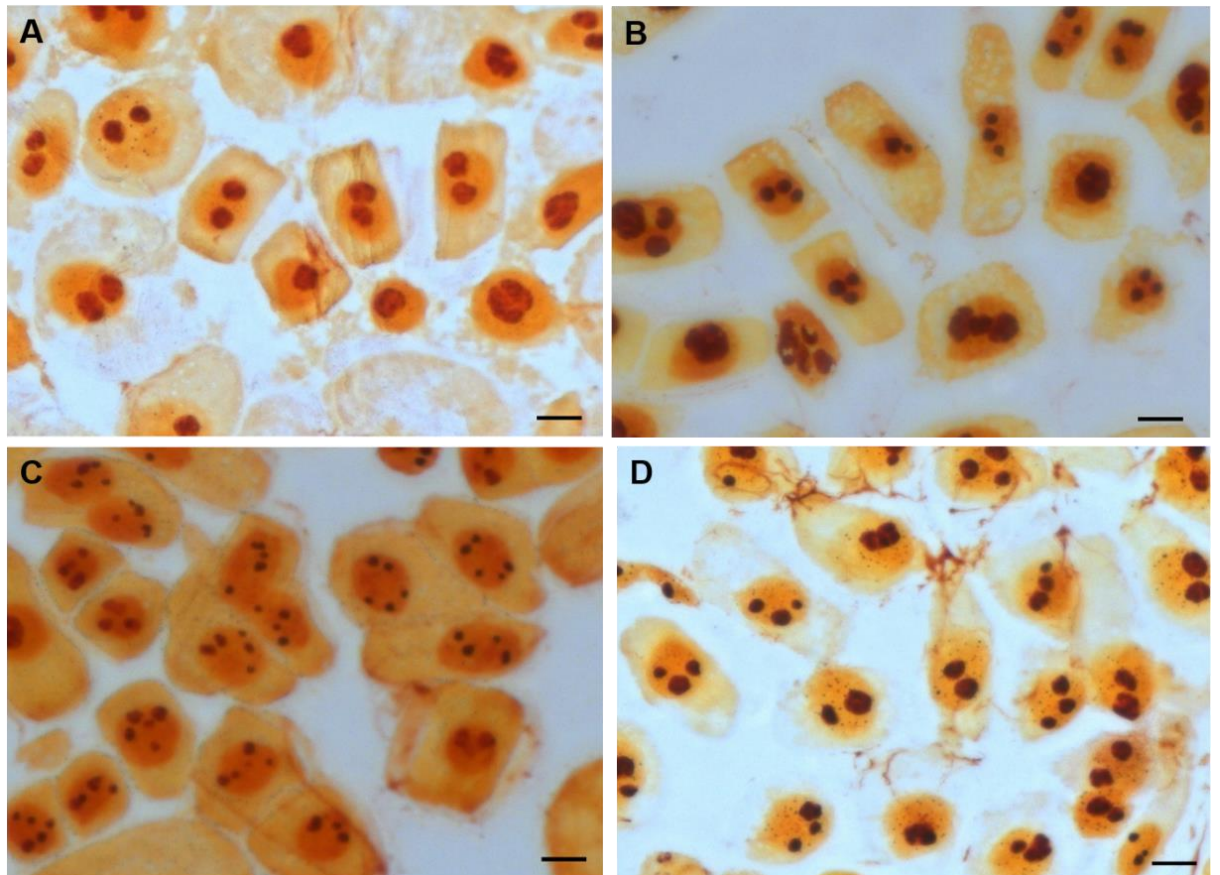
CN: negative control. MMS: methyl methanesulfonate. * indicates a statistically significant difference for MGE ($p < 0.05$).

It was observed that although treatments with herbicides led to higher values of nuclear genotoxic effect (NGE), this difference was not statistically significant ($p > 0.05$). However, for the mitotic genotoxic effect (MGE), the herbicides caused a statistically significant increase ($p < 0.05$) in abnormalities detected during mitosis. While the negative control showed an MGE of 1.31%, the herbicides flumioxazin, pyroxasulfone, and the combination flumioxazin + pyroxasulfone resulted in MGEs of 8.41%, 10.42%, and 9.55%, respectively. Methyl methanesulfonate (MMS), in turn, induced an MGE of 10.75%.

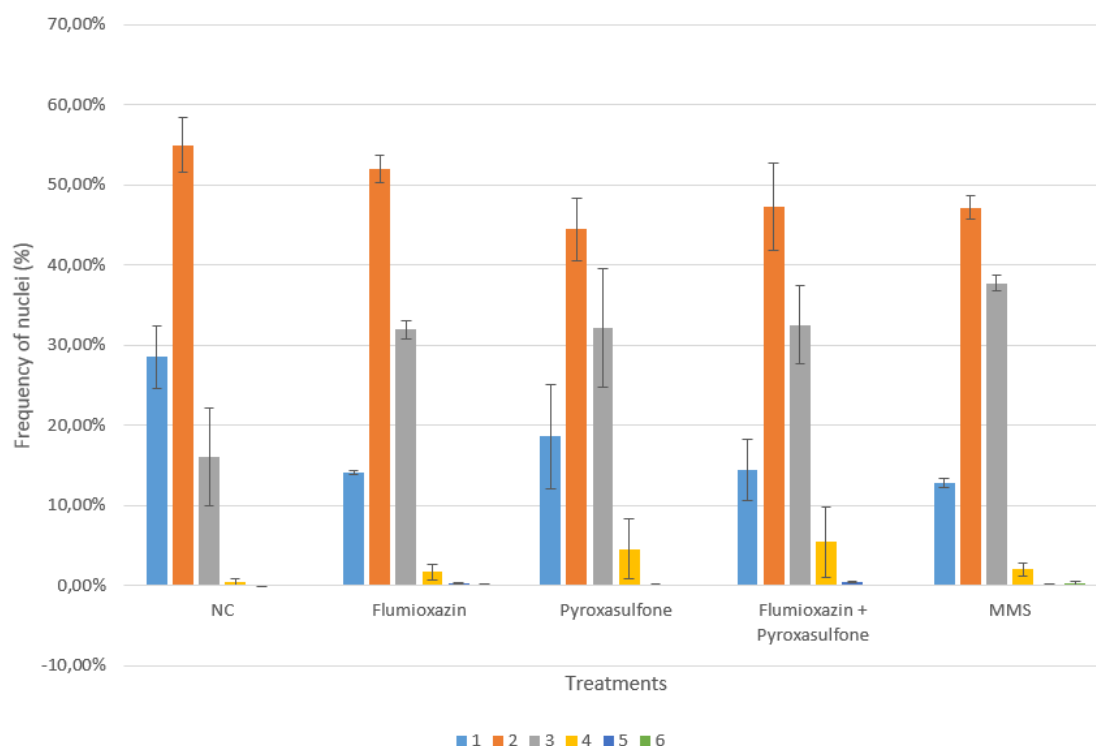
3.2 Nucleolar Analysis

The methodology proposed by Lima *et al.* (2019) enabled the identification of nucleoli within the nuclei of meristematic cells of *Allium cepa* (Figure 3), the percentage distribution of cells containing 1 to 6 nucleoli (Figure 4), the frequency of normal cells, and the nucleolar measurements (Table 3).

Figure 3: Nucleoli highlighted by silver nitrate staining in meristematic cells of *Allium cepa*.



A: Negative control. B: Flumioxazin. C: Pyroxasulfone. D: Flumioxazin + Pyroxasulfone.
The scale bar represents 10 μm .

Figure 4: Frequency of nuclei containing between 1 and 6 nucleoli.

CN: negative control. MMS: methyl methanesulfonate.

Table 3: Frequency of normal cells for AgNOR and nucleolar measurements obtained from meristematic cells of *Allium cepa* exposed to controls and treatments.

Treatments	AgNOR Normal		Average area (μm^2)		Nucleolus area / nucleus area (%)	
NC	83,5% \pm 0,064	a	58,56 \pm 4,79	a	31,57 \pm 0,02	a
Flumioxazin	66,08% \pm 0,017	b	34,19 \pm 5,76	b	25,62 \pm 0,02	b
Pyroxasulfone	63,08% \pm 0,098	b	34,44 \pm 4,55	b	24,17 \pm 0,02	b
Flumioxazin + Pyroxasulfone	61,66% \pm 0,091	b	34,84 \pm 4,31	b	24,87 \pm 0,03	b
MMS	59,91% \pm 0,011	b	34,70 \pm 3,09	b	26,97 \pm 0,02	b

AgNOR Normal: frequency of cells with a normal number of nucleoli. CN: negative control. MMS: methyl methanesulfonate.

Thus, a reduction in the average nucleolus area was observed in the treatments, showing no significant difference ($p > 0.05$) compared to the positive control, but being significantly different ($p < 0.05$) from the negative control. It is also evident that, in the treatments and the positive control, the nucleoli represented a smaller portion of the nucleus.

4. Discussion

A significant reduction in the mitotic index (Table 1) in treatments using the field

concentration of the commercial herbicides was evident when compared to the negative control. The mitotic index (MI) is one of the most commonly used parameters for detecting cytotoxicity in *Allium cepa*, indicating alterations in the cell cycle. An increase in MI suggests disordered cell proliferation, while a reduction indicates inhibition or delay of division, which can compromise organism development and growth (Camilo-Cotrim *et al.*, 2022; Liman; Ciğerci; Öztürk, 2015). A reduction of about 40% for pyroxasulfone and 60% for the other herbicides compared to the negative control (CN) was observed. The work of Prajitha and Thoppil (2016) suggests that changes in MI indicate cellular toxicity, with a reduction close to 50% reflecting borderline cytotoxic effects, that is, effects nearing cellular lethality. Although the reduction in MI was more intense in treatments involving flumioxazin, it cannot be stated that it acted synergistically with pyroxasulfone to cause a greater reduction in MI, since the values were considered statistically similar. Thus, the commercial herbicide mixture of pyroxasulfone + flumioxazin did not prove to be more cytotoxic for the MI parameter compared to the other tested herbicides.

The three herbicides tested increased the frequency of chromosomal and nuclear abnormalities (FCNA) about four times compared to the NC and behaved similarly ($p > 0.05$) to the positive control (MMS), reinforcing the cytogenotoxic profile of these substances (Table 1). According to the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2023), the use of a positive control is recommended to assess the ability to detect aneugenic and clastogenic events in the employed methodology.

Majewska *et al.* (2003) suggest that the reduction in the mitotic index (IM) can be explained by interference with the cell cycle, causing the cell to remain in the G2 phase or even experience abnormal mitoses. In their study, the authors observed that the mitoses were incomplete, cells regressed to the interphase stage, and started to exhibit duplicated DNA content.

Following the approach proposed by Andrade-Vieira *et al.* (2019), abnormalities were divided into chromosomal abnormalities (bridges, c-metaphases, stickiness, lost chromosomes, and lagging chromosomes) and nuclear abnormalities (micronuclei, lobed nuclei, and nuclear buds). Thus, the analysis of Nuclear Genotoxic Effect (NGE) and Mitotic Genotoxic Effect (MGE) supports the theory raised by Majewska *et al.* (2019), as the most significant chromosomal alterations were detected during mitosis (Figure 2). For the NGE parameter, the treatments were statistically similar to the negative control (NC), while for the MGE, the treatments were more relevant in terms of abnormalities found during mitosis.

According to Felisbino *et al.* (2018), the presence of chromosomal bridges indicates clastogenic and aneugenic effects, which may result from chromosomal breaks leading to exchanges between chromatids or even between different chromosomes. Bianchi, Fernandes, and Marin-Morales (2016) point out that when these breaks occur at the end of anaphase, they can lead to the formation of chromosomal fragments, thus creating lost chromosomes, which then form micronuclei observed in the next cell division cycle. Liman, Ciğerci, and Öztürk (2015) further suggest that chromosomal bridges may form due to alterations in the activation pathways of enzymes involved in the DNA replication machinery. According to Verma and Srivastava (2018), c-metaphases indicate interference of the toxic agent with mitotic spindle-forming proteins, such as

tubulins, preventing proper chromosomal organization during mitosis.

The significant decrease in the MI resulted in a higher frequency of cells in interphase. Consequently, although nuclear abnormalities were present, when calculated as a function of the total number of interphase cells (NGE), they did not produce a statistically significant effect, due to the large number of cells in this phase. However, the MGE indicates that mitotic cells displayed abnormalities more frequently in the treatments compared to the negative control. The distribution of chromosomal abnormalities listed in Table 2 shows that the most prominent anomalies contributing to the MGE were stickiness and lagging chromosomes.

According to Felisbino *et al.* (2018), the presence of chromosomal stickiness results from disturbances in the mitotic spindle that impair proper chromosome migration to the opposite poles of the cell. This is considered an aneugenic effect, as cell division is arrested in metaphase. The difficulty in chromatid separation may be explained by changes in non-histone proteins associated with DNA (BIANCHI; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2016). Lagging chromosomes, on the other hand, are observed as a result of chromosomal breaks that produce acentric fragments, which fail to migrate with the rest of the chromosomes to the poles (LIMAN; CIĞERCI; ÖZTÜRK, 2015).

In this context, it can be inferred that the occurrence of chromosomal abnormalities during mitosis led to a cell cycle arrest in interphase, as supported by the reduction in the MI. The evaluation of FCNA, as well as NGE and MGE, demonstrated that all three herbicides tested acted similarly. Therefore, no synergistic or antagonistic effects could be inferred in the product composed of a 1:1 mixture of pyroxasulfone and flumioxazin.

For MMS, the MI and FCNA values obtained in the present study are consistent with those reported in the literature, which used MMS at $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and found MI values similar to those of the NC, along with high frequencies of chromosomal abnormalities, far above those detected in water (BIANCHI; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2016; FELISBINO *et al.*, 2018; LIMAN; CIĞERCI; ÖZTÜRK, 2015).

The reduction in the MI and the increase in FCNA observed in the treatments are consistent with findings from other studies in the literature. Verma and Srivastava (2018), for example, reported the cytogenotoxic effects of pendimethalin, a dinitroaniline herbicide, evidenced by a reduction in MI and an increase in abnormalities during both mitosis and interphase. The same study also found that increasing the herbicide dose resulted in lower MI values. However, longer exposure times led to an increase in the MI, which, according to the authors, may suggest that herbicide persistence in the soil is a relevant factor for assessing field toxicity. Fernandes, Mazzeo, and Marin-Morales (2007) conducted a similar study using the herbicide trifluralin, also from the dinitroaniline group, and observed a reduction in MI and the presence of chromosomal abnormalities of both aneugenic and clastogenic nature.

Liman, Ciğerci, and Öztürk (2015) tested the herbicide imazethapyr in *Allium cepa* bioassays and reported a reduction in MI even at low concentrations (10, 20, and 40 ppm), indicating that this herbicide influences the cell cycle in the test system. Moreover, they reported a higher frequency of chromosomal abnormalities in roots treated with imazethapyr compared to the

negative control.

Complete suppression of the cell cycle in meristematic cells from *Allium cepa* seeds exposed to the field concentration ($6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) of the herbicide sulfentrazone – whose mode of action, like that of flumioxazin, is inhibition of the enzyme protoporphyrinogen oxidase – was observed by Bianchi, Fernandes, and Marin-Morales (2016). However, lower concentrations (0.06 and $0.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) led to a significant increase in chromosomal abnormalities when compared to the NC. The study also reported a higher frequency of micronuclei in meristematic cells of *Allium cepa* exposed to 0.006 , 0.6 , and $1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of sulfentrazone. Additionally, chromosomal breaks and bridges were observed.

As with other cytogenotoxicity parameters, the field concentration of the commercial herbicides tested was statistically different from the NC in terms of the normal number of nucleoli per nucleus (AgNOR). Thus, it is evident that cells treated with herbicides exhibited three or more nucleoli per nucleus more frequently than those in the NC group. The herbicides were statistically similar to MMS for this parameter. It is worth noting that, for all three herbicides tested, the percentage of cells with a normal AgNOR count was around 60%, whereas the negative control group showed values exceeding 80%.

The nucleolus is a nuclear structure formed at the end of mitosis from repetitive sequences of ribosomal DNA (rDNA) genes, and its main function is ribosome biosynthesis (Alberts *et al.*, 2017; Boisvert *et al.*, 2007). According to Lima *et al.* (2019), meristematic cells of *Allium cepa* predominantly exhibit two nucleoli which, by the end of telophase, may fuse to form a single large nucleolus; however, cytotoxic compounds can inhibit this fusion, leading to the presence of multiple nucleoli. These findings are supported by the work of Mazzeo and Marin-Morales (2015), who noted that *Allium cepa* possesses nucleolar organizer regions (NORs) on chromosome pair 6 (with a satellite) and on pair 8 (without a secondary constriction). Additionally, according to the authors, organisms with a reduced number of nucleoli are considered good bioassays for evaluating nucleolar alterations.

The observation of nucleolar structures for cytogenotoxic evaluation should be based not only on the number of nucleoli but also on their size. The number of nucleoli reflects the number of active NORs, while their size indicates the transcriptional activity of these regions (Lima *et al.*, 2019). According to Mazzeo and Marin-Morales (2015), the nucleolus is one of the primary structures affected under cellular stress and has been used as a key biomarker of cytogenotoxic effects.

According to Boisvert *et al.* (2007), approximately 30% of nucleolar proteins are related to the function of ribosomal subunits, while the remaining proteins perform diverse roles, including cell cycle regulation, DNA replication, and DNA repair. Thus, alterations in nucleolar characteristics may indicate disruptions in cellular metabolism, which, in turn, can affect plant development patterns and, when analyzed alongside other parameters, demonstrate cytogenotoxic effects (Lima *et al.*, 2019; Ohbayashi & Sugiyama, 2018). Such nucleolar alterations in response to metabolic changes suggest that nucleoli receive and respond to cellular regulatory signals to ensure adequate ribosomal output for proper cell function (Boisvert *et al.*, 2007).

In this context, the higher frequency of cells with three or more nucleoli, along with the reduction in the average nucleolar area, suggests that the tested treatments interfered with the transcriptional machinery and activity of nucleolar organizer regions (NORs), which may ultimately affect ribosomal activity within the cell. This analysis supports the conclusion that the treatments (pyroxasulfone, flumioxazin, and the 1:1 pyroxasulfone + flumioxazin mixture) exerted cytogenotoxic effects on *Allium cepa* meristematic cells.

Mazzeo and Marin-Morales (2015) also observed an increase in the number of nucleoli in *Allium cepa* meristematic cells exposed to the herbicide trifluralin and suggested that this increase may indicate a polyploidization potential of the toxic agent tested, considering that *Allium cepa* naturally presents only two NORs sites. This information is further supported by the FCNA data reported here (Table 1), since the treatments led to an increased frequency of abnormalities detected during cell division (Table 2).

As observed for the MI and FCNA, the nucleolar analyses demonstrated that all three commercial herbicides acted in a statistically similar manner. Therefore, it can be concluded that the combination of active ingredients in the 1:1 pyroxasulfone + flumioxazin commercial product did not induce a synergistic cytogenotoxic effect compared to the individual active ingredients found in the other commercial formulations.

5. Conclusion

For *Allium cepa*, the herbicides flumioxazin and pyroxasulfone, as well as the combination of these two active ingredients in a 1:1 ratio at a concentration of 5 mL·L⁻¹, exhibited equivalent cytogenotoxic effects. These were evidenced by a reduction in the MI, an increase in the FCNA, changes in the normal number of nucleoli per nucleus, and a decrease in average nucleolar area. For all evaluated parameters, the three herbicides behaved in a statistically similar manner to the MMS.

Considering the tested concentration derived from commercial formulations, it can be concluded that the combination of flumioxazin + pyroxasulfone in a 1:1 ratio did not result in synergistic or antagonistic cytogenotoxic effects. However, when taking into account the same dilution and weed control efficiency, the use of the commercial product containing both active ingredients should be favored by producers, since the required amount of each herbicide in the mixture is lower. This reduction leads to decreased environmental contamination.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for their financial support and research scholarships.

6. References

ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6aed ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ANDRADE-VIEIRA, Larissa Fonseca *et al.* Acute toxicity of jatropha curcas oil on plant cell cycle. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 5, p. 1544–1551, 2019.

BIANCHI, Jaqueline; FERNANDES, Thais Cristina Casimiro; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475–483, 1 fev. 2016.

BOISVERT, François Michel *et al.* The multifunctional nucleolus. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 574–585, jul. 2007.

BORDIGNON, Laura *et al.* Are pyroxasulfone and pyroxasulfone plus flumioxazin options for application in transplanted onions? **Comunicata Scientiae**, v. 15, p. e4266, 30 abr. 2024. Disponível em: <<https://www.comunicatascientiae.com.br/comunicata/article/view/4266>>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regra para Análise de Sementes**. . Brasília: MAPA/ACS. , 2009

CAMILO-COTRIM, Carlos Filipe *et al.* What can the *Allium cepa* test say about pesticide safety? A review. **Environmental Science and Pollution Research**. [S.l.]: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. , 1 jul. 2022

CHAKRABARTI, Manoswini; MUKHERJEE, Anita. Investigating the underlying mechanism of cadmium-induced plant adaptive response to genotoxic stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, 1 fev. 2021.

CHEREDNICHENKO, Oksana; PILYUGINA, Anastassiya; NURALIEV, Serikbai. Cytogenetical bioindication of pesticidal contamination. In: PERDEEP SINGH; SURUCHI SINGH; MIKA SILLANPÄÄ (Org.). . **Pesticides in the natural environment**. [S.l.]: Elsevier, 2022. p. 227–260. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323904896000100>>.

COORDENAÇÃO GERAL DE AGROTÓXICOS E AFINS. **Registros Concedidos**. . [S.l.: s.n.], 28 jul. 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>>. Acesso em: 4 out. 2024.

CUNHA NETO, Antonio Rodrigues *et al.* Toxicity of Heavy Metals that Affect Germination, Development and Cell Cycle of *Allium cepa* L. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 111, n. 2, 1 ago. 2023.

CUNHA NETO, Antônio Rodrigues *et al.* Cumulative potential of *Lactuca sativa* L. and physiological and anatomical damage when exposed to lead. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 32, p. 9975–9984, 2025. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-025-36339-x>>.

DA SILVA, Leonardo Mendes; ANDRADE-VIEIRA, Larissa Fonseca. Ecotoxicological bioassays with terrestrial plants: a holistic view of standards, guidelines, and protocols. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 28, n. 3, p. 183–221, 5 jan.

2025.

DAS, Tapas Kumar *et al.* Herbicides use in crop production: An analysis of cost-benefit, non-target toxicities and environmental risks. **Crop Protection**, p. 106691, abr. 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219424001194>>.

DAYAN, Franck E; ROMAGNI, Joanne G; DUKE, Stephen O. Protoporphyrinogen Oxidase Inhibitors. In: ROBERT I. KRIEGER (Org.). . **Handbook of Pesticide Toxicology**. San Diego: Academic Press, 2001. v. 2. p. 1529–1541.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EFSA. Evaluation of data concerning the necessity of flumioxazin as a herbicide to control a serious danger to plant health which cannot be contained by other available means, including non-chemical methods. **EFSA Journal**, v. 15, n. 1, jan. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2017.4688>>.

FELISBINO, Karoline *et al.* Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of Atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 150, p. 83–88, 1 set. 2018.

GUERRA, Marcelo; SOUZA, Maria José. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética animal e humana**. Ribeirão Preto - SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.

IBAMA. **Painéis de informações de agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>>. Acesso em: 10 maio 2024.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, jul. 2009.

LIMA, Maria Gabriela Franco *et al.* Nucleolar alterations are reliable parameters to determine the cytogenotoxicity of environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 174, p. 630–636, 15 jun. 2019.

LIMAN, Recep; CİĞERCI, Ibrahim Hakki; ÖZTÜRK, Nur Serap. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 38–42, 1 fev. 2015.

MAGGI, Federico; TANG, Fiona H.M. Estimated decline in global earthworm population size caused by pesticide residue in soil. **Soil Security**, v. 5, p. 100014, dez. 2021.

MAJEWSKA, Agnieszka *et al.* Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from *Rhodiola rosea* roots. **Caryologia**, v. 56, n. 3, p. 337–351, 1 jan. 2003.

MARCHI, Giuliano; MARCHI, Edilene Carvalho Santos; GUIMARÃES, Tadeu Gracioli. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2008. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br>>.

MAZZEO, Dânia Elisa Christofolletti; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 13, p. 9796–9806, 29 jul. 2015.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Bula Flumyazin 500SC**. BL-Agrofit. [S.l: s.n.], 2023

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Bula Yamato SC**. BL-Agrofit. [S.l: s.n.], 2024

NOVAIS, Júlia Rodrigues *et al.* Seleção de espécies bioindicadoras para os herbicidas pyroxasulfone e pyroxasulfone + flumioxazin em solos contrastantes. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 12, p. 115794–115808, 29 dez. 2021.

OECD. Test No. 487: **In vitro mammalian cell micronucleus test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.** Paris: OECD Publishing, 2023. Disponível em: <<http://www.oecd.org/termsandconditions/>>.

OHBAYASHI, Iwai; SUGIYAMA, Munetaka. Plant nucleolar stress response, a new face in the NAC-dependent cellular stress responses. **Frontiers in Plant Science.** [S.l.]: Frontiers Media S.A. , 9 jan. 2018

PARVAN, Lais Gonçalves *et al.* Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, n. 0, set. 2020.

PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. E. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 18–25, 1 jan. 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing.** . Vienna: R Foundation for Statistical Computing. , 2016

SAMOTA, Shiv Ram *et al.* Pyroxasulfone based tank-mix herbicide combinations for diverse weed flora control in wheat. **Crop Protection.**, p. 106695, jul. 2024.

TANETANI, Yoshitaka *et al.* Action mechanism of a novel herbicide, pyroxasulfone. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, n. 1, p. 47–55, set. 2009.

VERMA, Sonam; SRIVASTAVA, Alka. Morphotoxicity and cytogenotoxicity of pendimethalin in the test plant *Allium cepa* L. - A biomarker based study. **Chemosphere**, v. 206, p. 248–254, 1 set. 2018.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo se propôs a verificar, por meio do bioensaio vegetal *Allium cepa*, a citogenotoxicidade das moléculas herbicidas flumioxazina e piroxasulfona separadamente e combinadas, por meio de produtos comerciais formulados com tais moléculas. A análise dos resultados obtidos demonstrou que os herbicidas comerciais utilizados, compostos por flumioxazina, piroxasulfona e a mistura 1:1 de flumioxazina + piroxasulfona, diluídos a 5 mL.L⁻¹ mostraram-se igualmente citogenotóxicos para células meristemáticas de *Allium cepa*.

Tal levantamento é amparado pela redução do IM, aumento da FAC, com ênfase no aumento das anormalidades verificadas em mitose, aumento do número de nucléolos por núcleo e diminuição da área nucleolar. Para todos os parâmetros observados os três herbicidas se comportaram de maneira estatisticamente igual entre si e ao controle positivo (MMS).

Considerando-se a concentração testada a partir do uso de produtos comerciais, pode-se dizer que a combinação da flumioxazina + piroxasulfona, na proporção de 1:1, não provocou sinergia ou antagonismo dos efeitos citogenotóxicos.

REFERÊNCIAS

- BADR, A.; EIKINGTON, T. T. Antimitotic and chromotoxic activities of isoproturon in *Allium cepa* and *Hordeum vulgare*. **Environmental and Experimental Botany**, [S.l.], v. 22, n. 3, p. 265-270, May/Aug. 1982. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/009884728290017X>. Acesso em: 10 set. 2023.
- BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, [S.l.], v. 144, p. 475-483, Feb. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.021>. Acesso em 17 jan. 2022.
- BONCIU, E. *et al.* An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, Londres, v. 71, n. 3, p. 191-209, July 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00087114.2018.1503496>. Acesso em 15 nov. 2020.
- BORDIGNON, L. *et al.* Are pyroxasulfone and pyroxasulfone plus flumioxazin options for application in transplanted onions? **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 15, p. 1-7, Apr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.14295/cs.v15.4266>. Acesso em 18 nov. 2024.
- BRASIL. Casa Civil. Decreto Nº4.074 de 4 de Janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 jan. 2002. Seção 1. p. 1. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm. Acesso em: 10 maio 2024.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Bula Falcon**. Brasília, DF: Agrofit, 2024a. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 16 mar. 2024.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Bula Flumyazin 500SC**. Brasília, DF: Agrofit, 2023. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 16 mar. 2024.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Bula Yamato SC**. Brasília, DF: Agrofit, 2024b. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 16 mar. 2024.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Coordenação Geral de Agrotóxicos e Afins. **Informações Técnicas — Registros concedidos até 31 de dezembro de 2024**. Brasília, DF: MAPA, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>. Acesso em: 18 mar. 2025.

BURGESS, R. M. *et al.* Effects-directed analysis (EDA) and toxicity identification evaluation (TIE): Complementary but different approaches for diagnosing causes of environmental toxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Londres, v. 32, n. 9, p. 1935–1945, Sept. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.2299>. Acesso em: 18 abr. 2021.

CAMILO-COTRIM, C. F. *et al.* What can the *Allium cepa* test say about pesticide safety? A review. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.l.], v. 29, p. 48088-48104, May 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20695-z>. Acesso em: 15 fev. 2025.

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. São Paulo: Melhoramentos, 1969.

CHAKRABARTI, M.; MUKHERJEE, A. Investigating the underlying mechanism of cadmium-induced plant adaptive response to genotoxic stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.l.], v. 209, Feb. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111817>. Acesso em: 18 fev. 2023.

CHEREDNICHENKO, O.; PILYUGINA, A.; NURALIEV, S. Cytogenetical bioindication of pesticidal contamination. *In*: PERDEEP, S.; SURUCHI, S.; MIKA, S. (Org.). **Pesticides in the natural environment**. [S.l.]: Elsevier, 2022. p. 227–260. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323904896000100>. Acesso em: 13 out. 2023.

CHHOKAR, R. S.; SHARMA, R. K. Weed control in wheat with pyroxasulfone and its combinations with other herbicides. **Weed Biology and Management**, Kyoto, v. 23, n. 2, p. 58-70, June 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/wbm.12268>. Acesso em: 17 fev. 2025.

DA SILVA, L. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Ecotoxicological bioassays with terrestrial plants: a holistic view of standards, guidelines, and protocols. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, Londres, v. 28, n. 3, p. 183-221, Jan. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10937404.2024.2440876>. Acesso em: 10 mar. 2025.

DAS, T. K. *et al.* Herbicides use in crop production: An analysis of cost-benefit, non-target toxicities and environmental risks. **Crop Protection**, [S.l.], v. 181, Apr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106691>. Acesso em 10 mar. 2025.

DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O. Protoporphyrinogen oxidase onhibitors. *In*: ROBERT I. K. (Org.). **Handbook of pesticide toxicology**. San Diego: Academic Press, 2001. v. 2. p. 1529–1541.

DE SOUZA, C. P.; GUEDES, T. A.; FONTANETTI, C. S. Evaluation of herbicides action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. ***Environmental Monitoring and Assessment***. [S.l.], v. 188, n. 12, Dec. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5702-8>. Acesso em: 10 dez 2022.

DU, L. *et al.* Synergistic effect of imazapic plus prometryn on weeds in peanut (*Arachis hypogaea* L.) fields. ***Crop Protection***, [S.l.], v. 145, July 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105631>. Acesso em 14 jun. 2022.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Evaluation of data concerning the necessity of flumioxazin as a herbicide to control a serious danger to plant health which cannot be contained by other available means, including non-chemical methods. ***EFSA Journal***, [S.l.], v. 15, n. 1, Jan. 2017. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2017.4688>. Acesso em 12 nov. 2020.

FELISBINO, K. *et al.* Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*). ***Pesticide Biochemistry and Physiology***, [S.l.], v. 150, p. 83-88, Sept. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.07.009>. Acesso em 14 mar. 2021

FERNANDES, T. C.C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. ***Pesticide Biochemistry and Physiology***, [S.l.], v. 88, n. 3, p. 252-259, July 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>. Acesso em: 10 mar. 2021.

FERRIER, J. *et al.* The interaction of pyroxasulfone and flumioxazin applied preemergence for the control of multiple-herbicide-resistant waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) in soybean. ***Weed Technology***, [S.l.], v. 36, n. 2, p. 318–323, Apr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/wet.2022.11>. Acesso em: 13 abr. 2025.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. ***Mutation Research***, [S.l.], v. 310, p. 175–185, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90112-0). Acesso em: 14 mai. 2021

HERBICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE. ***2024 HRAC global herbicide moa classification***. [S.l.]. HRAC, 2024. Disponível em: <https://hracglobal.com/tools/2024-hrac-global-herbicide-moa-classification>. Acesso em: 14 maio 2024.

IBAMA. ***Painéis de informações de agrotóxicos***. Brasília, DF: IBAMA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos/paineis-de-informacoes-de-agrotoxicos#Painel-comercializacao>. Acesso em: 10 maio 2024.

IQBAL, M. *et al.* Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: a review. ***Chemistry International***, [S.l.], p. 1-80, 2019.

Disponível em: <https://zenodo.org/records/1475399>. Acesso em: 20 mai. 2022.

IWASHITA, K. *et al.* Flumioxazin, a PPO inhibitor: A weight-of-evidence consideration of its mode of action as a developmental toxicant in the rat and its relevance to humans. **Toxicology**, Bruxelas, v. 472, 30, Apr. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153160>. Acesso em: 14 de out. 2023.

KUMAR DAS, S.; MONDAL, T. Mode of action of herbicides and recent trends in development: A Reappraisal. **International Journal of Agricultural and Soil Science**, [S.l.], v. 2, n. 3, p. 27-32, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/303130418_Mode_of_action_of_herbicides_and_recent_trends_in_development_a_reappraisal#full-text. Acesso em: 26 out 2021

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, [S.l.], v. 682, n. 1, p. 71-81, July 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>. Acesso em: 08 dez. 2020.

LIMA, M. G. F. *et al.* Nucleolar alterations are reliable parameters to determine the cytogenotoxicity of environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.l.], v. 174, p. 630-636, June 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.033>. Acesso em: 13 mai. 2023.

LIMAN, R. *et al.* Genotoxic and cytotoxic effects of pethoxamid herbicide on *Allium cepa* cells and its molecular docking studies to unravel genotoxicity mechanism. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.l.], v. 29, n. 42, p. 63127-63140, Sept. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20166-5>. Acesso em: 10 dez. 2024.

LIMAN, R.; CIĞERCI, I. H.; ÖZTÜRK, N. S. Determination of genotoxic effects of imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S.l.], v. 118, p. 38–42, Feb. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.007>. Acesso em 15 nov. 2020.

MAGGI, F.; TANG, F. H.M. Estimated decline in global earthworm population size caused by pesticide residue in soil. **Soil Security**, [S. l.], v. 5, p. 100014, Dec. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.soisec.2021.100014>. Acesso em: 15 set 2022

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 2008. Disponível em: <http://www.cpac.embrapa.br>. Acesso em: 10 nov. 2020.

MERCADO, S. A. S.; CALEÑO, J. D. Q. Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. **Science of the Total Environment**, [S.l.], v. 700, 15 Jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134452>. Acesso em: 14 abr. 2022.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem**

compound summary for CID 11556910, pyroxasulfone. [S.l.]: NCBI, [2024]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11556910#section=2D-Structure>. Acesso em: 31 out. 2024a.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem compound cummary for CID 92425, flumioxazin.** [S.l.]: NCBI, [2024]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flumioxazin..> Acesso em: 31 out. 2024b.

NOVAIS, J. R. *et al.* Seleção de espécies bioindicadoras para os herbicidas pyroxasulfone e pyroxasulfone + flumioxazin em solos contrastantes. **Brazilian Journal of Development**, São José dos Pinhais, v. 7, n. 12, p. 115794-115808, dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n12-373>. Acesso em: 14 abr. 2024.

PARVAN, L. G. *et al.* Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 11, n. 0, set. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223202000544>. Acesso em 14 abr. 2024.

ROSE, M. T. *et al.* Herbicide residues in Australian grain cropping soils at sowing and their relevance to crop growth. **Science of the Total Environment**, [S.l.], v. 833, Aug. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155105>. Acesso em: 16 mar. 2025.

SAMOTA, S. R. *et al.* Pyroxasulfone based tank-mix herbicide combinations for diverse weed flora control in wheat. **Crop Protection**, [S.l.], p. 106695, July 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2024.106695>. Acesso em: 21 mar. 2025.

TANETANI, Y. *et al.* Action mechanism of a novel herbicide, pyroxasulfone. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S.l.], v. 95, n. 1, p. 47-55, Sept. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.06.003>. Acesso em: 12 mai 2025.

VERMA, S.; SRIVASTAVA, A. Morphotoxicity and cytogenotoxicity of pendimethalin in the test plant *Allium cepa* L. - A biomarker based study. **Chemosphere**, [S.l.], v. 206, p. 248–254, 1 Sept. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.177>. Acesso em: 12 dez. 2020.

YADAV, V. *et al.* Guidance for the use and interpretation of assays for monitoring anti-genotoxicity. **Life Sciences**, [S.l.], v. 337, Jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.122341>. Acesso em: 28 jan. 2025.