

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA BIOLÓGICA E EFEITOS TÓXICOS DE FONTES
DE COBRE E DIQUAT PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS**

Igor Cruz Malaspina

Engenheiro Agrônomo

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFICÁCIA BIOLÓGICA E EFEITOS TÓXICOS DE FONTES
DE COBRE E DIQUAT PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS**

Igor Cruz Malaspina

Orientador: Prof. Dr. Silvano Bianco

Coorientador: Prof. Dr. Robinson Antônio Pitelli

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

2016

M239e Malaspina, Igor Cruz
Eficácia biológica e feitos tóxicos de fontes de cobre e diquat para organismos aquáticos / Igor Cruz Malaspina. -- Jaboticabal, 2016
xii, 66 f. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Silvano Bianco

Coorientador: Robinson Antônio Pitelli

Banca examinadora: Lúcia Helena Sipaúba Tavares, Claudinei da Cruz, Sílvia Patrícia Carraschi de Oliveira, Matheus Nicolino Peixoto Henares

Bibliografia

1. Ecotoxicologia. 2. *Hydrilla verticillata*. 3. Macrófita. I. Título. II. Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 632.954

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação - Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: igormalaspina@hotmail.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EFICÁCIA BIOLÓGICA E EFEITOS TÓXICOS DE FONTES DE COBRE E DIQUAT PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS

AUTOR: IGOR CRUZ MALASPINA
ORIENTADOR: SILVANO BIANCO
CO-ORIENTADOR: ROBINSON ANTONIO PITELLI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ROBINSON ANTONIO PITELLI
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. LUCIA HELENA SIPAUBO TAVARES
Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. CLAUDINETE DA CRUZ
Departamento de Agronomia / UNIFEB - Barretos/SP

Pós-Doutoranda SILVIA PATRÍCIA CARRASCHI DE OLIVEIRA
Instituto de Pesca de São Paulo / IPSP - São Paulo/SP

Prof. Dr. MATHEUS NICOLINO PEIXOTO HENARES
Departamento de Agronomia / UNIFEB - Barretos/SP

Jaboticabal, 01 de abril de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

IGOR CRUZ MALASPINA, ARARAQUARA – SP, 03/05/1980 – Filho de Osvaldo Carlos Malaspina e Lídia Cruz Malaspina, é Engenheiro Agrônomo graduado pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Câmpus de Jaboticabal (2003). Possui curso de aperfeiçoamento Lato Senso em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas no Agronegócio pela UFLA – Universidade Federal de Lavras (2006). Mestrado em Sistemas de Produção pela Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, UNESP Câmpus de Ilha Solteira (2008). Doutorando em Produção Vegetal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Câmpus de Jaboticabal, atuando nas áreas de controle de macrófitas e ecotoxicologia. Trabalha como professor universitário na UNIESP – Faculdade de Taquaritinga e no UNIFEB – Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, nos cursos de Agronomia, Engenharia Ambiental e Ciências Biológicas. Foi professor nos anos de 2009 a 2011 na ULBRA – Universidade Luterana do Brasil, em Ji-Paraná – RO, nos cursos de Agronomia, Medicina Veterinária e Ciências Biológicas. Foi Conselheiro na Câmara Especializada em Agronomia do CREA-RO nos anos de 2010 e 2011.

“A teoria sempre acaba, mais cedo ou mais tarde, assassinada pela experiência.”

ALBERT EINSTEIN

Aos meus pais Osvaldo e Lúdia

DEDICO

A minha esposa Ana Paula

OFEREÇO

A minha irmã Ana Carolina

AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

A UNESP e a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal.

Ao Professor Dr. Robinson Antônio Pitelli pela orientação e oportunidade de cursar o doutorado e por todo o conhecimento transmitido durante o curso.

Ao Professor Dr. Claudinei da Cruz pela orientação e por todo o conhecimento transmitido, pela parceria, confiança e amizade durante esta jornada.

Ao Professor Dr. Silvano Bianco pela orientação e colaboração para a realização deste trabalho.

A todos os membros da equipe do NEPEAM, especialmente ao Adilson, Alfredo, Cynthia, Taise, Roberto, Aline e Mayara pela ajuda e convivência durante os quatro anos de doutorado.

A Bióloga Nathália Garlich pela parceria durante estes anos e pela ajuda nos experimentos e na redação dos artigos.

A Eng. Agrônoma Joani Húngaro Bastos pela amizade e parceria durante os experimentos.

Aos colaboradores da ECOSAFE, Ronaldo e Alessandro por toda a ajuda durante os experimentos, estando sempre de prontidão, independentemente da tarefa a ser executada.

Ao CAUNESP, especialmente, a Professora Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares pelas importantes considerações sobre o trabalho e pela doação da microalga *Ankistrodesmus gracilis*.

Aos professores Dr. Dagoberto Martins e Dra. Silva Patrícia Carraschi de Oliveira, pelas considerações e sugestões referentes ao artigo apresentado no exame geral de qualificação.

Aos professores da UNESP de Jaboticabal: Dr. José Marques Jr, Dr. João Antônio Galbiatti, Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, Dr. Edson Coutinho, Dr. Dilermando Perecin, Dr. Arthur Bernardes Cecílio Filho e Dr. Rouverson Pereira da Silva pela convivência acadêmica e por todo o conhecimento transmitido durante o curso.

Aos funcionários da seção de pós-graduação e da biblioteca.

As instituições que trabalho UNIESP e UNIFEB.

A todos os que diretamente e indiretamente contribuíram com este trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1 Introdução.....	1
1.2 Revisão de Literatura.....	1
1.3 Referências.....	5
CAPÍTULO 2 – ECOTOXICOLOGIA DO HIDRÓXIDO DE COBRE E DAS MISTURAS DE DIQUAT COM HIDRÓXIDO E OXICLORETO DE COBRE PARA BIOINDICADORES NEOTROPICAIS.....	8
Resumo.....	8
2.1 Introdução.....	9
2.2 Material e Métodos.....	11
2.2.1 <i>Hyphessobrycon eques</i>	11
2.2.2 <i>Pomacea canaliculata</i>	13
2.2.3 <i>Lemna minor</i> e <i>Azolla caroliniana</i>	14
2.3 Resultados e Discussão.....	16
2.4 Conclusões.....	20
2.5 Referências.....	20
CAPÍTULO 3 – EFICÁCIA DO DIQUAT ISOLADO E EM MISTURA COM FONTES DE COBRE NO CONTROLE DA MACRÓFITA SUBMERSA <i>Hydrilla verticillata</i> E DA MICROALGA <i>Ankistrodesmus gracilis</i>.....	25
Resumo.....	25
3.1 Introdução.....	26

3.2 Material e Métodos	28
3.2.1 Experimentos de eficácia para a macrófita submersa <i>H. verticillata</i> e microalga <i>A. gracilis</i>	28
3.2.2 Avaliação da Clorofila <i>a</i> e análise estatística.....	29
3.3 Resultados e Discussão	29
3.4 Conclusões	34
3.5 Referências.....	35
CAPÍTULO 4 – CONTROLE QUÍMICO DE <i>Hydrilla verticillata</i> EM MICROCOSMOS E MESOCOSMOS COM DIQUAT E HIDRÓXIDO DE COBRE ...	40
Resumo.....	40
4.1 Introdução	41
4.2 Material e Métodos	42
4.2.1 Experimento 1	43
4.2.2 Experimento 2	44
4.3 Resultados e Discussões.....	46
4.3.1 Experimento 1	46
4.3.1.1 Variáveis de qualidade da água do experimento 1	49
4.3.2 Experimento 2	55
4.3.2.1 Variáveis de qualidade da água do experimento 2.....	59
4.4 Conclusões	65
4.5 Referências.....	65

EFICÁCIA BIOLÓGICA E EFEITOS TÓXICOS DE FONTES DE COBRE E DIQUAT PARA ORGANISMOS AQUÁTICOS

RESUMO – As macrófitas aquáticas possuem papel fundamental nos ecossistemas aquáticos participando dos processos de ciclagem de nutrientes, além de servirem como abrigo e alimento para muitas espécies de peixes e outros organismos. Dentre os principais métodos de controle de macrófitas está o controle químico com o uso de herbicidas. O objetivo deste estudo foi realizar o controle químico da macrófita *Hydrilla verticillata* com a aplicação isolada de diquat e hidróxido de cobre, e da mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre. O primeiro experimento para o controle da *H. verticillata* e da microalga *Ankistrodesmus gracilis* foi realizado em sala de bioensaio em recipientes plásticos de 1,5 litros, sendo todos os tratamentos testados eficientes no controle da macrófita e da microalga. Posteriormente, foram realizados experimentos em condições de microcosmos de concreto de 600 litros e em mesocosmos de concreto de 1200 litros, com o monitoramento de variáveis da qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH), teor de clorofila *a*, demanda biológica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) por um período de sessenta dias após a aplicação dos tratamentos. A mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre foi o tratamento mais eficaz no controle da macrófita *Hydrilla verticillata* para a maioria dos parâmetros analisados, havendo alteração nas variáveis de qualidade da água. Foram também realizados experimentos ecotoxicológicos para organismos não-alvo (*Hyphessobrycon eques*, *Pomacea canaliculata*, *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*) com diquat, oxicloreto e hidróxido de cobre, onde a mistura de diquat + 1% de oxicloreto de cobre foi a mais tóxica para os organismos bioindicadores e a macrófita *Lemna minor* foi o bioindicador que apresentou a maior sensibilidade aos agroquímicos testados.

Palavras-chave: ecotoxicologia, *Hydrilla verticillata*, macrófita

BIOLOGICAL EFFECTIVENESS AND TOXIC EFFECTS OF COPPER SOURCES AND DIQUAT FOR AQUATIC ORGANISMS

ABSTRACT – The macrophytes have a fundamental role in aquatic ecosystems participating in nutrient cycling processes, as well as serving as shelter and food for many species of fish and other organisms. Among the main weeds control methods is chemical control using herbicides. The aim of this study was the chemical control of the macrophyte *Hydrilla verticillata* with isolated application of diquat and copper hydroxide, and the mixture of diquat + 1% copper hydroxide. The first experiment for the control of *H. verticillata* and microalgae *Ankistrodesmus gracilis* was held in bioassay room in plastic containers of 1.5 liters, with all treatments tested effective in controlling macrophyte and microalgae. Subsequently, experiments were carried out under conditions of 600 liters concrete microcosms and in 1200 liters concrete mesocosms, with the monitoring of water quality variables (temperature, dissolved oxygen, electrical conductivity and pH), content chlorophyll *a*, demand biological oxygen (BOD) and chemical oxygen demand (COD) for a period of sixty days after the application of treatments. The mixture diquat + 1% copper hydroxide was the most effective treatment in *Hydrilla verticillata* of weed control for the majority of parameters, with change in water quality variables. Ecotoxicological experiments were also carried out for non-target organisms (*Hyphessobrycon eques*, *Pomacea canaliculata*, *Lemna minor* and *Azolla caroliniana*) with diquat, oxychloride and copper hydroxide, wherein the mixture of diquat + 1% copper oxychloride is more toxic to bioindicators organisms and macrophyte *Lemna minor* was bioindicator with the highest sensitivity to the tested pesticides.

Keywords: ecotoxicology, *Hydrilla verticillata*, macrophyte

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

Esta tese é composta por 4 capítulos. No capítulo 1 estão as considerações gerais sobre as macrófitas. No Capítulo 2 são apresentados os testes ecotoxicológicos. No capítulo 3 estão os experimentos realizados em laboratório para o controle da macrófita *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle e da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov. Finalmente, no Capítulo 4 estão os experimentos em microcosmos e mesocosmos para controle da macrófita *Hydrilla verticillata*.

O objetivo deste estudo foi realizar o controle químico da macrófita *Hydrilla verticillata* com o herbicida diquat e o hidróxido de cobre em condições de laboratório (1,5 litros), microcosmos de concreto (600 litros) e mesocosmos de concreto (1200 litros), com o monitoramento de variáveis da qualidade da água por sessenta dias e experimentos ecotoxicológicos com os agroquímicos para organismos não-alvo.

1.2 Revisão de literatura

As macrófitas são vegetais que possuem papel primordial nos ecossistemas aquáticos, auxiliando na ciclagem de nutrientes, no balanço de oxigênio da água, servindo como abrigo, refúgio e ambiente de reprodução de muitas espécies animais, como os peixes, moluscos, insetos, entre outros animais que alimentam-se de suas raízes, folhas e caules.

Segundo Martins et al. (2002) uma grande diversidade de plantas aquáticas pode ser encontrada nas margens de rios e reservatórios ou dentro dos mais diversos ambientes aquáticos, empregando diferentes mecanismos de adaptação para sobrevivência e desenvolvimento, como por exemplo enraizadas em corpos d'água com fortes correntezas ou vivendo em águas paradas e estagnadas.

As preocupações com espécies introduzidas acidentalmente ou intencionalmente aumentaram nos últimos anos devido aos impactos que essas

plantas podem ocasionar sobre a diversidade biológica, a estrutura das comunidades e o funcionamento dos ecossistemas aquáticos.

A macrófita submersa *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle é uma planta que causa problemas em muitas regiões tropicais e subtropicais (COOK; LÖÜND, 1982). Originária da Ásia, foi recentemente introduzida no Brasil e atualmente tem sido a causa de problemas ambientais pela sua elevada população.

Possui ampla capacidade de colonizar e substituir a flora nativa em uma variedade de habitats aquáticos causa diversos problemas para o manejo de ambientes aquáticos. O seu controle é difícil devido ao fato da planta de produzir diversos tubérculos subterrâneos, que são fonte de propágulos vegetativos para o surgimento de novas plantas, uma vez que a planta mãe foi morta por métodos químicos, físicos ou biológicos (SUTTON et al., 1992).

A *Hydrilla verticillata* é uma planta que infesta lagos e outros corpos de água, crescendo rapidamente e ultrapassando as vias fluviais se não for controlada. Esta planta reproduz-se rapidamente, dificultando a vida aquática, sendo mundialmente conhecida por ser difícil de ser controlada e erradicada sem o uso de herbicidas. Pode ser considerada uma ameaça ecológica, pois desloca competitivamente comunidades de plantas nativas submersas. Em povoamentos densos, altera as populações de peixes, provoca mudanças nas comunidades do zooplâncton e altera as características químicas da água (BIANCHINI Jr et al., 2010a).

No ano de 2005 a macrófita *Hydrilla verticillata* foi encontrada e identificada pela primeira vez colonizando o reservatório Porto Primavera (ANDERSON et al., 2005) e subseqüentemente, Thomaz et al. (2009) encontraram-na no reservatório de Itaipu. Desde então, tem rapidamente se espalhado ao longo do rio Paraná, infestando grandes áreas com alta produção de biomassa e causando problemas às atividades de transporte hidroviário, pesca, recreação, entre outros. A *Hydrilla verticillata* é a planta aquática mais importante do reservatório de Porto Primavera, principalmente na região próxima à cidade de Presidente Epitácio – SP, onde as condições são propícias ao seu desenvolvimento. No ano de 2008 no reservatório de Porto Primavera foi estimada uma área de cerca de 30.000 hectares de infestação desta macrófita submersa (PITELLI et al, 2012).

As ações antrópicas podem favorecer o crescimento acelerado das macrófitas aquáticas pelo aumento dos teores de nutrientes no ambiente aquático. Grandes populações de macrófitas mudam o cenário natural do ambiente e passam a influenciar de forma negativa a biota.

O crescimento das cidades tem sido responsável pelo aumento da pressão das atividades antrópicas sobre os recursos naturais. Em todo o planeta, praticamente não existe um ecossistema que não tenha sofrido influência direta e/ou indireta do homem, como por exemplo, contaminação dos ambientes aquáticos, desmatamentos, contaminação de lençol freático e introdução de espécies exóticas, resultando na diminuição da diversidade de habitats e perda da biodiversidade. O que se observa é uma forte pressão do sistema produtivo sobre os recursos naturais, através da obtenção de matéria prima, utilizada na produção de bens que são utilizados no crescimento econômico. O desenvolvimento gerado retorna capital para o sistema produtivo que devolve rejeitos e efluentes, além da degradação muitas vezes irreversível ao meio ambiente (GOULART; CALLISTO, 2003).

As macrófitas aquáticas são importantes componentes dos ecossistemas hídricos. Contudo, a presença excessiva dessas plantas nos reservatórios de água pode diminuir o potencial de usos múltiplos dos mesmos (BIANCHINI JR. et al., 2010b).

De acordo com Brooke et al. (2008) as atividades antrópicas está colocando em risco a disponibilidade dos recursos hídricos, principalmente no que se refere a um dos usos mais nobres da água, o consumo humano. Dentre os vários problemas causados pela ação do homem no meio ambiente, destaca-se a eutrofização de mananciais e o conseqüente crescimento de algas e plantas aquáticas.

Nas últimas décadas vem ocorrendo uma proliferação de macrófitas nos corpos hídricos causada pelo homem. Os possíveis aportes de nutrientes provenientes de atividades industriais, do esgoto doméstico liberado clandestinamente e dos resíduos da agricultura podem favorecer o estabelecimento de densas populações de macrófitas.

Em virtude dos prejuízos provocados por densas e extensas colonizações de macrófitas frequentemente há a necessidade de controle. As modalidades de controle mais comumente conhecidas são: controle químico, controle biológico,

controle físico e remoção mecânica das plantas. O problema do simples descarte da biomassa está centrado na licença ambiental junto às instituições estaduais de defesa do meio ambiente (ANJOS et al., 2014).

O manejo químico das macrófitas aquáticas e algas no Brasil é uma prática limitada por diversos fatores, destacando-se os impactos ambientais ao meio ambiente causados pela aplicação, a falta de tecnologias eficazes de aplicação e a legislação ambiental vigente.

A utilização de herbicidas em lavouras de arroz constitui uma ameaça à biodiversidade que sustentam, afetando organismos não alvos que habitam os sistemas aquáticos circundantes (MARQUES et al., 2009).

Dentre os herbicidas mais utilizados no mundo para o controle de macrófitas aquáticas destaca-se o Diquat, pertencente ao grupo dos inibidores do Fotossistema I. O Diquat foi estudado para o controle de espécies flutuantes como *Eichhornia crassipes*, *Salvinia molesta* e *Pistia stratiotes* e também de espécies submersas como a *Hydrilla verticillata*, *Egeria najas* e *Egeria densa* (PITELLI et al., 2008).

O cobre atua como herbicida inibindo o Fotossistema II. Suas principais vias de dissipação são a precipitação e a adsorção. Não existem restrições ao uso da água para irrigação, consumo humano e animal, pesca e natação. Os compostos a base de cobre são indicados para o controle de plantas submersas e flutuantes, como *Hydrilla verticillata*, *Najas* spp., *Egeria densa*, *Ceratophyllum demersum*, *Elodea canadensis*, *Potamogeton* spp, *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes*. Há a necessidade de 12 a 24 horas de contato do produto com a planta para o controle, levando a planta à morte em 3 a 4 semanas após a aplicação (PITELLI et al., 2008).

No mundo, os herbicidas mais estudados e testados em corpos hídricos são o 2,4-D, Endothal, Fluridone, Diquat, Glyphosate, Triclopyr, Imazapyr e compostos a base de Cobre.

O processo de eutrofização nos ambientes aquáticos favorece o afloramento de algas interferindo nos usos múltiplos da água, com efeitos diretos sobre a sua qualidade.

As algas filamentosas do gênero *Pithophora* são macroscópicas e vivem flutuando na água, formando densas massas flutuantes. O gênero *Pithophora* possui 20 espécies conhecidas, principalmente nas regiões tropical e subtropical do mundo.

(BICUDO; MENEZES, 2006). O gênero *Ankistrodesmus* engloba as algas unicelulares, em geral reunidas em colônias. O gênero inclui 11 espécies, estando entre os mais cosmopolitas de algas clorococales e um dos mais comuns em coletas de plâncton. Raramente uma coleta de material planctônico não contém exemplares de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (BICUDO; MENEZES, 2006).

1.3 Referências

ANDERSON, L.W.J. PITELLI, R.A. CARRUTHERS, R. PITELLI, R.L.C.M. FERREIRA, W.L.B. First *Hydrilla* found in Brazil: Implications and further dispersal and likely impacts. In: AQUATIC PKANT MANAGEMENT SOCIETY ANNUAL MEETING, 25., San Antonio Texas, 2005. **Abstracts**... San Antônio. Texas, p. 11-13. 2005.

ANJOS, M.L. HENARES, M.N.P. BARROS, J.P.A.A. NOBILE, F. O. Uso da matéria seca das partes aérea e das raízes do aguapé como substrato para a germinação e crescimento de milho. In: XI Congresso Nacional de Meio Ambiente. Poços de Caldas, 2014.

BIANCHINI Jr.,I.; CUNHA-SANTINO, M.B.; MILAN, J.A.M.; RODRIGUES, C.J.; DIAS, J.H.P. Growth of *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle under controlled conditions. **Hydrobiologia**, v. 644, n. 1, p. 301-312, 2010a.

BIANCHINI Jr; CUNHA-SANTINO, M.B; FUSHITA, A.T; ALMEIDA, D.A.A; MAIA, A.T. Monitoramento das macrófitas aquáticas do reservatório da usina Hidrelétrica Luís Eduardo Magalhães (Estado de Tocantins, Brasil). 2010b. Disponível em: <<http://www.ambiente-augm.ufscar.br/uploads/A2-013.doc>>. Acesso em: 02 de fevereiro de 2013.

BICUDO, C.E.M. MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil - chave para identificação e descrições**. 2ª ed. São Carlos: Rima Editora. 502 p. 2006.

BROOKE, D. RIBEIRO, D. RODRIGUES, L. CAMPOS, M. MENDES, R. **Algas e seus impactos em sistemas de tratamento de águas para abastecimento: estudo de caso sistema Guarapiranga.** 2008. Disponível em: <http://www.brookepeig.com/downloads/Algas.pdf>. Acesso em 3 de maio de 2013.

COOK, C.D.K. LÖÜND, R. A revision of the genus *Hydrilla*. **Aquat. Bot.** 13:485-504, 1982.

GOULART, M.D. CALLISTO, M. **Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental.** Revista da FAPAM, ano 2, nº 1. 2003.

MARQUES, C.R., PEREIRA, R., ANTUNES, S.C., CACHADA, A., DUARTE, A.C., GONÇALVES, F. Estudo in situ do efeito de herbicidas numa microalga. CAPTAR n.1. vol. 1. p.113-126. 2009.

MARTINS, D. VELINI, E.D. NEGRISOLI, E. TOFOLI, G.R.. **Controle químico de *Pistia stratiotes*, *Eichhornia crassipes* e *Salvinia molesta* em caixas d'água.** Planta Daninha, v. 20, n. 1, p. 83-88, 2002.

PITELLI, R.A.; MARTINS, D.; VELINI, E.D. Interferência e controle de macrófitas aquáticas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E.R. **Manual de manejo de controle de plantas daninhas.** Passo Fundo, Embrapa, p. 299-328. 2008.

PITELLI, R.L.C.M. PITELLI, R.A. RODRIGUES, C. J. DIAS, J. H. P. **Manual de identificação das plantas aquáticas de Porto Primavera.** Jaboticabal: Funep, 1.ed., 54 p. 2012.

POMPEO, M.L.M. As macrófitas aquáticas em reservatórios tropicais: aspectos ecológicos e propostas de monitoramento e manejo. In: POMPEO, M. L. M (ed). **Perspectivas da Limnologia no Brasil.** São Luís: Gráfica e Editora União, 198p. 1999.

SUTTON, D.L., VAN, T.K., PORTIER, K.M. Growth of dioecious and monoecious Hydrilla from single tubers. **J. Aquat. Plant Manage**, 30: 15-20, 1992.

THOMAZ, S.M., CARVALHO, P. PADIAL, A.A. KOBAYASHI, J.T. Temporal and spatial patterns of aquatic macrophyte diversity in the Upper Parana River floodplain. **Braz. J. Biol.**, v.69, n.2, p.617-625, 2009.

CAPÍTULO 2 – Ecotoxicologia do hidróxido de cobre e das misturas de diquat com hidróxido e oxicloreto de cobre para bioindicadores neotropicais

RESUMO – O objetivo deste estudo foi estimar a toxicidade do hidróxido de cobre e das misturas do herbicida diquat + 1,0% de hidróxido de cobre e diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre para os organismos bioindicadores neotropicais *Hyphessobrycon eques*, *Pomacea canaliculata*, *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*. Foram realizados experimentos ecotoxicológicos em sala de bioensaio climatizada, onde os organismos foram expostos a diferentes concentrações dos agroquímicos em um sistema estático. A toxicidade aguda foi calculada no software Trimmed Spearman-Kärber e os agroquímicos foram classificados de acordo com as classes ecotoxicológicas propostas por Zucker. Conclui-se ao final dos experimentos que a mistura de diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre foi a mais tóxica para os organismos bioindicadores deste experimento e que a macrófita *Lemna minor* foi o bioindicador mais sensível aos agroquímicos testados.

Palavras-chave: toxicidade aguda, macrófitas, diquat, bioindicadores.

2.1 Introdução

Os resíduos das atividades antrópicas que são lançados indevidamente em rios, lagos e lagoas contribuem no desenvolvimento excessivo de algumas populações de plantas em detrimento de outras, formando colonizações pouco diversificadas. Nestas condições de fertilidade da água são esperadas explosões populacionais de macrófitas e de comunidades límnicas, causando a eutrofização do meio e efeitos prejudiciais ao uso múltiplo da água (PITELLI et al., 2008; SILVA et al., 2012).

Para minimizar os efeitos do crescimento de macrófitas e desenvolvimento excessivo de algas em ambientes aquáticos, alguns procedimentos podem ser empregados, entre eles o controle químico de plantas com herbicidas (GIBBONS et al., 1994; POMPÊO, 2008), que consiste na utilização de moléculas que matam as plantas ou paralisam o seu crescimento. O controle químico tem sido empregado em vários países, entre eles os EUA, pois promove o controle rápido e eficiente das plantas (MOURA et al., 2009; HENARES et al., 2011).

O diquat é um herbicida de contato, não seletivo, inibidor do fotossistema I, pertencente ao grupo dos bipirilídios, que possui baixa taxa de bioconcentração e apresenta segurança ambiental para organismos aquáticos. Sua meia vida é menor que 48 horas pois o diquat se liga a partículas coloidais do solo (FAO/WHO, 1995; RODRIGUES et al., 2005).

O cobre é amplamente utilizado como fungicida em sistemas agrícolas para controle de doenças em culturas. Em alguns países compostos de cobre são utilizados para controle de algas e plantas que crescem em canais de irrigação, lagoas, lagos e reservatórios de água (GETTYS et al., 2009).

A avaliação ecotoxicológica de qualquer substância utilizada no meio aquático é fundamental para a regulamentação do seu uso e para a classificação da substância quanto ao seu potencial de risco ambiental (USEPA, 2002). Por isso, os experimentos de toxicidade são realizados com a finalidade de avaliar e quantificar os efeitos dos xenobióticos em organismos não-alvo.

Os experimentos de toxicidade aguda estimam o risco ambiental de xenobióticos e são amplamente utilizados em monitoramento de corpos hídricos,

pois proporcionam respostas imediatas dos efeitos letais de um agente tóxico sobre os organismos aquáticos (LOMBARDI, 2004).

Segundo Henares et al. (2011), novos estudos ecotoxicológicos com o herbicida diquat devem ser realizados, nos quais o comportamento ambiental do diquat deve ser aferido, especialmente para organismos nativos de corpos hídricos brasileiros.

A seleção do organismo teste é baseada em alguns critérios como a sensibilidade, a facilidade de criação e manejo, a representatividade de um grupo taxonômico ecológico, a ampla disponibilidade para execução de teste, a existência de informações sobre a biologia da espécie, o tamanho suficiente para amostragem de tecidos, entre outros critérios (RAND; PETROCELLI, 1985; ARAUCO et al., 2005; BURGER et al., 2013; FLORÊNCIO et al., 2014).

Os peixes, por serem expostos de forma direta aos produtos químicos, são bioindicadores potenciais de toxicidade (HELFRICH et al., 1996). O *Hyphessobrycon eques* (Steindachner, 1882), popularmente conhecido como mato grosso é um peixe neotropical nativo do Brasil e sua sensibilidade foi determinada em condições de bioensaio por Cruz et al. (2008), sendo está uma espécie que apresenta vários pré-requisitos para bioindicação (FLORÊNCIO et al., 2014).

O caramujo *Pomacea canaliculata* (Lamarck, 1822) não está estabelecido pela legislação como bioindicador de experimentos ecotoxicológicos, mas, recentemente vem sendo utilizado como organismos teste, como demonstram os dados da literatura. O caramujo é um consumidor primário, e por estar em contato direto com o sedimento fica exposto aos produtos químicos, principalmente aos que adsorvem no sedimento. O revolvimento do sedimento pode disponibilizar novamente a molécula ao ambiente (DUFT et al., 2003; VENTURINI et al., 2008).

A macrófita aquática *Lemna minor* L. é uma espécie representante dos vegetais superiores estabelecida como bioindicador pela OECD (2002). A *Lemna minor* é uma angiosperma que se reproduz vegetativamente a partir das bordas das folhas mais velhas formando novos frondes (SOUZA et al., 2011).

Outra macrófita aquática, a pteridófita *Azolla caroliniana* Willd é uma planta flutuante que também não está estabelecida como bioindicador em normas de experimentos ecotoxicológicos. A *Azolla caroliniana* pode ser utilizada em testes

ecotoxicológicos por sua facilidade de manejo, curto ciclo de vida, ser de pequeno porte e por já ter sido utilizada na remoção do mercúrio e cromo em efluentes e na remoção da molécula do herbicida atrazina em ambientes aquáticos (BENNICELLI et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2006; SILVA et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi estimar a concentração letal (CL50) e a concentração efetiva (CE50) do hidróxido de cobre, da mistura de diquat + 1,0% de hidróxido de cobre e da mistura diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre para os organismos bioindicadores *Hyphessobrycon eques*, *Pomacea canaliculata*, *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*.

2.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia, NEPEAM, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal.

Os agroquímicos utilizados foram o herbicida diquat (Reglone®), 200 g.L⁻¹ e os fungicidas cúpricos hidróxido de cobre (Supera®), com 537,4 g.L⁻¹ e oxicloreto de cobre (Difere®), com 588 g.L⁻¹.

2.2.1 *Hyphessobrycon eques*

Para a realização dos experimentos de toxicidade aguda foram utilizados exemplares do peixe *Hyphessobrycon eques* provenientes do setor de cultivo de organismos do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia. Os peixes foram criados em caixas d'água de amianto com capacidade para 500 L que continham substrato composto por solo, areia e esterco bovino na proporção de 2:1:1 (V:V) e macrófitas aquáticas submersas.

Os peixes foram mantidos em quarentena no setor de criação de organismos aquáticos do próprio laboratório antes da realização dos testes, sendo alimentados uma vez ao dia com ração comercial.

Para os experimentos foram utilizados peixes com peso médio de $0,82 \pm 0,20$ gramas que foram aclimatados durante 7 dias em sala de bioensaio a temperatura

de 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 h a 1000 lux, em tanques com capacidade de 250 L, com aeração contínua e alimentação diária com ração comercial (ABNT, 2011).

Inicialmente, para avaliar a sensibilidade dos peixes foram realizados ensaios de sensibilidade com a substância referência cloreto de potássio (KCl, Pro-analysis) com CL50;48h de $1,68 \text{ g.L}^{-1}$ com intervalo de 2,14 a $1,32 \text{ g.L}^{-1}$.

Em seguida, foram realizados experimentos preliminares com os agroquímicos para determinar o intervalo de concentração em que as substâncias causam zero e 100% de mortalidade dos peixes (OECD, 2009). A partir desses ensaios preliminares foram determinadas as concentrações utilizadas nos experimentos definitivos.

Os experimentos definitivos foram realizados utilizando-se 5 concentrações para cada produto (Figura 1). Para o hidróxido de cobre foram utilizadas as concentrações de 1,5; 3,0; 7,5; 15,0 e $30,0 \text{ mg.L}^{-1}$; para a mistura de diquat + 1,0% de hidróxido de cobre as concentrações de 1,5; 2,1; 2,9; 4,1 e $5,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e para a mistura de diquat + 1,0% de oxiclreto de cobre as concentrações de 0,05; 0,1; 0,5; 0,9 e $1,4 \text{ mg.L}^{-1}$,

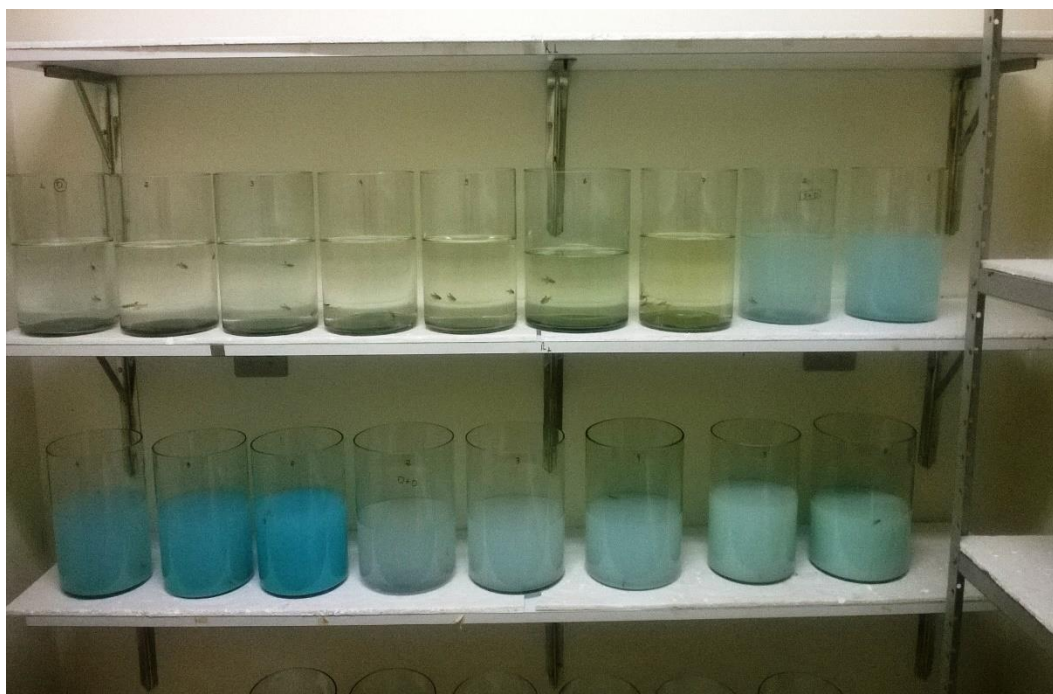


Figura 1. Experimento ecotoxicológico com diquat e hidróxido de cobre para o peixe *Hyphessobrycon eques* em sala de bioensaio.

Foram utilizados três repetições com três peixes por réplica. Os experimentos foram conduzidos em sistema estático, sem alimentação com duração de 48 h e a mortalidade dos peixes foi avaliada 24 e 48 horas após a exposição.

2.2.2 *Pomacea canaliculata*

Para a realização dos experimentos de toxicidade foram utilizados exemplares do caramujo *Pomacea canaliculata* provenientes do setor de cultivo de organismos do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia. Os caramujos foram criados em caixas de amianto com capacidade de 500 L contendo água e substrato composto por solo, areia e esterco bovino na proporção de 2:1:1 (V:V), sendo diariamente alimentados com macrófitas aquáticas.

Nos experimentos foram utilizados caramujos com peso médio de $2,30 \pm 0,3$ gramas, que foram aclimatados durante 7 dias em sala de bioensaio a temperatura média de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12 h a 1000 lux, em caixas com capacidade para 60 L, com aeração contínua e alimentação diária com macrófita submersa *Hydrilla verticillata* (ABNT, 2011).

A sensibilidade do lote de caramujos foi avaliada com a substância referência cloreto de potássio, onde a CE50; 48 h calculada foi de $2,85 \text{ g.L}^{-1}$ com intervalo de confiança de $3,82 \text{ g.L}^{-1}$ a $2,13 \text{ g.L}^{-1}$.

Logo após, foram realizados experimentos preliminares dos agroquímicos testados para a definição do intervalo de concentração que causa zero e 100% de imobilidade dos caramujos (OECD, 2009). A partir desses ensaios preliminares foram determinadas as concentrações utilizadas nos experimentos definitivos.

Nos experimentos definitivos foram utilizadas as seguintes concentrações do hidróxido de cobre: 0,03; 0,1; 0,34; 1,1; 3,62 e $11,8 \text{ mg.L}^{-1}$. Para a mistura de diquat + 1,0% de hidróxido de cobre as concentrações utilizadas foram 0,02; 0,05; 0,11; 0,25; 0,57 e $1,29 \text{ mg.L}^{-1}$. Já para a mistura de diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre foram utilizadas as concentrações 1,0; 4,0; 6,0; 10,0; 13,0 e $15,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

Foram utilizados três repetições com cinco caramujos em cada tratamento e na testemunha com duração de 48 horas. Os experimentos foram conduzidos em

sistema estático sem alimentação. Foi avaliada a imobilidade dos caramujos 24 e 48 horas após a exposição aos agroquímicos testados.

2.2.3 *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*

As macrófitas utilizadas nos experimentos foram provenientes do setor de cultivo do hidrofítotério do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação em caixas plásticas com volume de 2,5 L contendo água e substrato composto por solo, areia e esterco bovino na proporção de 2:1:1 (V:V).

As plantas selecionadas para os experimentos foram aclimatadas por um período de três dias em sala de bioensaio, com temperatura média de 25 ± 1 °C e iluminação constante de 1000 lux. Após a aclimação as plantas foram lavadas em uma solução de hipoclorito de sódio e água destilada (2% para *Lemna minor* e 3% para *Azolla caroliniana*). Foram selecionadas quatro plantas de *Lemna minor* com três frondes (12 frondes) e cinco plantas de *Azolla caroliniana*. As macrófitas foram distribuídas em recipientes de vidro com capacidade de 100 mL e foi adicionado 50 mL do meio de cultivo Hoagland's. As plantas foram aclimatadas por 24 horas, após esse período foram adicionados mais 50 mL de meio de cultivo Hoagland's com a diluição dos agroquímicos testados (OECD, 2002).

A sensibilidade das plantas foi avaliada utilizando como substância referência o cloreto de sódio (NaCl). Assim, a CL₅₀;7d calculada para *Lemna minor* foi de 0,65 g.L⁻¹ com intervalo de confiança de 0,69 a de 0,62 g.L⁻¹. Para a *Azolla caroliniana* a CL₅₀;7d calculada foi de 2,14 g.L⁻¹, com intervalo de confiança de 2,31 a 1,97 g.L⁻¹.

Em seguida, foram realizados experimentos preliminares dos agroquímicos para definir o intervalo de concentração que causa zero e 100% de mortalidade das plantas (OECD, 2009). A partir desses ensaios preliminares foram determinadas as concentrações utilizadas nos experimentos definitivos.

Nos experimentos definitivos para *Lemna minor* (Figura 2) foram utilizadas as seguintes concentrações do hidróxido de cobre: 0,01; 0,05; 0,10; 0,50 e 1,00 mg.L⁻¹. Para a mistura de diquat + 1,0% de hidróxido de cobre e diquat + 1,0% de oxicloreto

de cobre foram utilizadas as concentrações de 0,001; 0,005; 0,01; 0,05 e 0,10 mg.L⁻¹, com uma testemunha e três repetições por concentração.

Para *Azolla caroliniana* foram utilizadas as seguintes concentrações do hidróxido de cobre: 1,05; 3,43; 11,15; 36,26 e 117,84 mg.L⁻¹. Para mistura de diquat + 1,0% de hidróxido de cobre e diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 e 1,00 mg.L⁻¹, ambas com uma testemunha e três repetições por concentração.

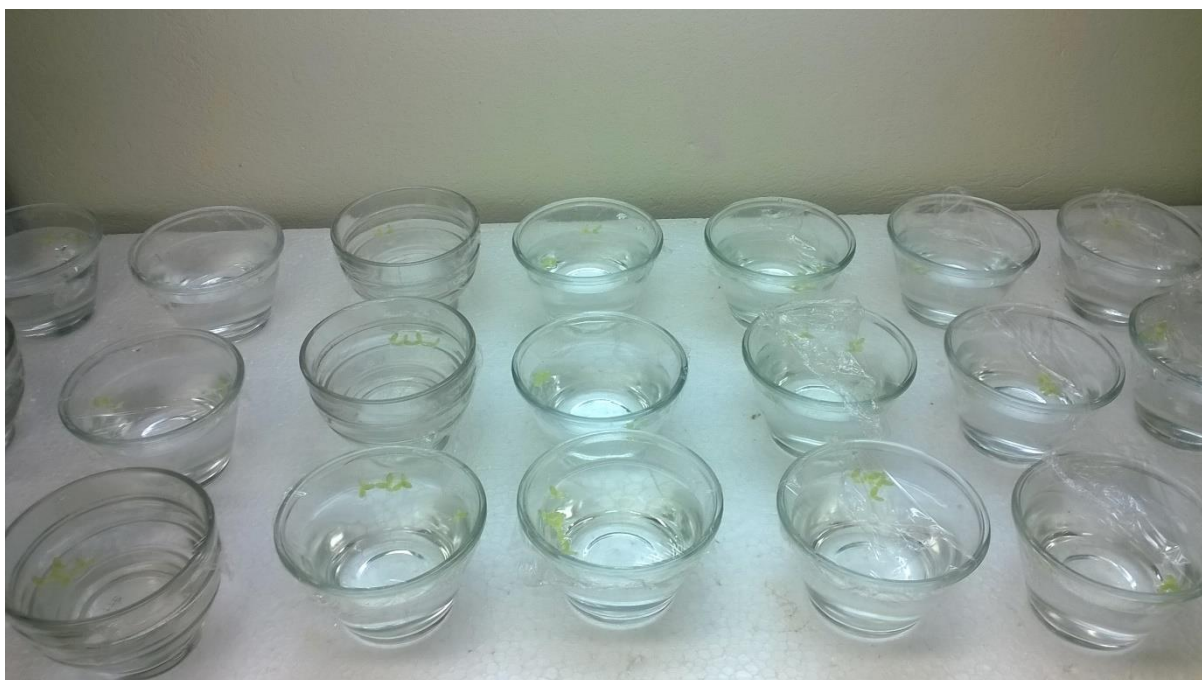


Figura 2. Experimento ecotoxicológico com diquat e hidróxido de cobre para a macrófita *Lemna minor* em sala de bioensaio.

A avaliação da porcentagem de mortalidade das plantas foi realizada em 3, 5 e 7 dias após exposição. A *Lemna minor* foi avaliada de acordo com alteração na taxa de crescimento no número de frondes e sinais de fitotoxicidade como clorose e necrose (OECD, 2002). Para *Azolla caroliniana* foi utilizada a escala de notas (A a E), onde as notas foram transformadas em porcentagens de mortalidade, sendo a nota A relativo ao intervalo de 91 a 100% de mortalidade; B de 81 a 90% de mortalidade; C de 71 a 80% de mortalidade; D de 41 a 70% de mortalidade e E de 0 a 40% de mortalidade, de acordo com Silva et al. (2012).

A concentração letal (CL50) e a concentração efetiva (CE50) foram calculadas com o software Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977) e os produtos testados foram classificados de acordo com as classes ecotoxicológicas de Zucker (1985).

2.3 Resultados e Discussão

O hidróxido de cobre foi mais tóxico para a macrófita *Lemna minor* com o valor de CL50;7d de 0,21 mg.L⁻¹ (limite superior 0,32 – 0,12 mg.L⁻¹ limite inferior) e menos tóxico para a *Azolla caroliniana* com CL50;48h > 100 mg.L⁻¹. O organismo bioindicador mais sensível ao hidróxido de cobre foi a *Lemna minor*, seguido por *Pomacea canaliculata*, *Hyphessobrycon eques* e *Azolla caroliniana* (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de toxicidade aguda (mg.L⁻¹) dos agroquímicos para organismos não alvo.

Bioindicadores	L.S.	CL/CE50	L.I.	Zucker	Coefficiente de Correlação
Hidróxido de cobre					
<i>H. eques</i>	13,19	9,35	6,62	Moderadamente tóxico	0,98
<i>P. canaliculata</i>	1,41	0,74	0,39	Altamente tóxico	0,96
<i>L. minor</i>	0,32	0,21	0,12	Altamente tóxico	0,94
<i>A. caroliniana</i>	-	> 100	-	Praticamente não-tóxico	-
diquat + 1,0% de hidróxido de cobre					
<i>H. eques</i>	3,85	3,21	2,68	Moderadamente tóxico	0,96
<i>P. canaliculata</i>	0,23	0,17	0,12	Altamente tóxico	0,97
<i>L. minor</i>	0,01	0,01	0,01	Extremamente tóxico	0,98
<i>A. caroliniana</i>	0,22	0,19	0,16	Altamente tóxico	0,98
diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre					
<i>H. eques</i>	0,52	0,36	0,25	Altamente tóxico	0,96
<i>P. canaliculata</i>	0,20	0,13	0,09	Altamente tóxico	0,98
<i>L. minor</i>	0,01	0,01	0,01	Extremamente tóxico	0,98
<i>A. caroliniana</i>	0,16	0,13	0,11	Altamente tóxico	0,98

LI: limite inferior; LS: limite superior; CL: concentração letal; CE: concentração efetiva.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados de porcentagem de mortalidade dos organismos bioindicadores expostos ao hidróxido de cobre isoladamente e as misturas de diquat + 1% de hidróxido e diquat + 1% oxicloreto de cobre.

Para *Lemna minor* o hidróxido de cobre foi mais tóxico (CL50;7d = 0,21 mg.L⁻¹) do que o encontrado por Garlich et al. (2016) para a mesma planta para o hidróxido de cobre (CL50;7d <0,01 mg.L⁻¹) e o oxicloreto de cobre (CL50;7d <0,01 mg.L⁻¹). Segundo Proença et al. (2012), o uso do cobre isoladamente causou a mortalidade das plantas a partir da concentração de 10 mg.L⁻¹.

Tabela 2. Porcentagem de mortalidade (%) dos organismos teste durante os experimentos.

Agroquímicos	Concentrações (mg.L ⁻¹) / mortalidade (%)						
<i>Hyphessobrycon eques</i>							
Hidróxido	0,0 / 0	1,5 / 11	3,0 / 33	7,5 / 44	15,0 / 78	30,0 / 100	
D + Hidróxido	0,0 / 0	1,50 / 11	2,1 / 22	2,9 / 44	4,1 / 67	5,7 / 100	
D + Oxicloreto	0,0 / 0	0,05 / 11	0,1 / 22	0,5 / 56	0,9 / 89	1,4 / 100	
<i>Pomacea canaliculata</i>							
Hidróxido	0,0 / 0	0,03 / 7	0,1 / 13	0,34 / 47	1,1 / 53	3,62 / 73	11,8 / 93
D + Hidróxido	0,0 / 0	0,02 / 13	0,05 / 40	0,1 / 47	0,25 / 80	0,57 / 87	1,29 / 100
D + Oxicloreto	0,0 / 0	1,0 / 7	4,0 / 27	6,0 / 40	10,0 / 67	13,0 / 87	15,0 / 100
<i>Lemna minor</i>							
Hidróxido	0,0 / 0	0,01 / 5	0,05 / 20	0,1 / 47	0,5 / 72	1,0 / 100	
D + Hidróxido	0,0 / 0	0,001 / 23	0,005 / 37	0,01 / 55	0,05 / 88	0,1 / 100	
D + Oxicloreto	0,0 / 0	0,001 / 22	0,005 / 40	0,01 / 51	0,05 / 86	0,1 / 100	
<i>Azolla caroliniana</i>							
Hidróxido	0,0 / 0	-	-	-	-	-	
D + Hidróxido	0,0 / 0	0,05 / 16	0,1 / 26	0,25 / 56	0,5 / 86	1,0 / 100	
D + Oxicloreto	0,0 / 0	0,05 /	0,1 / 40	0,25 / 70	0,5 / 93	1,0 / 100	

D + Hidróxido = diquat + 1% de hidróxido de cobre; D + Oxicloreto = diquat + 1% de oxicloreto de cobre

Para Garlich et al. (2016) o hidróxido de cobre foi menos tóxico para o caramujo *Pomacea canaliculata* com CL50;48h de 1,35 mg.L⁻¹ e o óxido de cobre e sulfato de cobre mais tóxico com CL50;48h de 0,47 mg.L⁻¹ e CL50;96h de 0,07 mg.L⁻¹ (PIYATIRATITIVORAKUL et al., 2006; VENTURINI et al., 2008) em comparação a esse estudo.

O hidróxido de cobre foi mais tóxico para o caramujo *Pomacea canaliculata* ($0,74 \text{ mg.L}^{-1}$) do que o oxicleto de cobre para *Biomphalaria glabrata* com $\text{CL}_{50};48\text{h}$ de $1,43 \text{ mg.L}^{-1}$ (OLIVEIRA-FILHO et al. 2004).

O sulfato de cobre foi mais tóxico para o *Labeo Rohita* ($\text{CL}_{50};96\text{h}$ $3,15 \text{ mg.L}^{-1}$) (LATIF et al., 2013); *Phalloceros caudimaculatus* ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$), *Brachydanio rerio* ($0,13 \text{ mg.L}^{-1}$) e *Hyphessobrycon eques* ($\text{CL}_{50};96\text{h}$ $0,16 \text{ mg.L}^{-1}$) (SILVA et al., 2014) do que o hidróxido de cobre.

Neste experimento, a toxicidade aguda do oxicleto de cobre para *Azolla caroliniana* foi similar a encontrada por Garlich et al. (2016), onde a $\text{CL}_{50};7\text{d}$ foi maior que 100 mg.L^{-1}

A mistura de diquat + 1,0% de hidróxido de cobre foi mais tóxica para a macrófita *Lemna minor* com valor de $\text{CL}_{50};7\text{d}$ de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ e menos tóxica para o *Hyphessobrycon eques* com $\text{CL}_{50};48\text{h}$ de $3,21 \text{ mg.L}^{-1}$ (limite superior $3,85 - 2,68 \text{ mg.L}^{-1}$ limite inferior).

O organismo bioindicador mais sensível a mistura de diquat + 1,0% de hidróxido de cobre foi a *Lemna minor*, seguido por *Azolla caroliniana*, *Pomacea canaliculata*, *Hyphessobrycon eques* (Tabela 1).

O diquat em mistura com 1% de hidróxido de cobre foi extremamente tóxico para as macrófitas aquáticas, resultados estes similares aos encontrados por Garlich et al. (2016), onde a mistura de diquat + 0,1% de hidróxido de cobre apresentou valores de $\text{CL}_{50};7\text{d} < 0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ para a *Lemna minor* e $\text{CL}_{50};7\text{d}$ de $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ para *Azolla caroliniana*.

Para o caramujo *Pomacea canaliculata* a toxicidade da mistura de diquat + 1,0% de hidróxido de cobre foi similar aos resultados obtidos por Garlich et al. (2016) com a mistura de diquat + 0,1% de hidróxido de cobre ($\text{CL}_{50};48\text{h}$ de $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$), assim como para o peixe *Hyphessobrycon eques* onde a mistura de diquat + 0,1% de hidróxido de cobre foi menos tóxica com $\text{CL}_{50};48\text{h}$ de $18,97 \text{ mg.L}^{-1}$.

A mistura de diquat + 1,0% de oxicleto de cobre foi mais tóxica para *Lemna Minor* ($\text{CL}_{50};7\text{d}$ de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) e menos tóxico para o *Hyphessobrycon eques* com o valor da $\text{CL}_{50};48\text{h}$ de $0,36 \text{ mg.L}^{-1}$ (limite superior $0,52 - 0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ limite inferior).

O organismo bioindicador mais sensível à mistura de diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre foi a *Lemna minor*, seguido por *Pomacea canaliculata*, *Azolla caroliniana* e *Hyphessobrycon eques* (Tabela 1).

O cobre isolado ou em mistura causou a maior toxicidade para a *Lemna minor*, acarretando em altas taxas de mortalidade da macrófita com baixas concentrações (Tabela 2).

A mistura de diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre foi menos tóxica do que a mistura de diquat + 0,1% de oxicloreto de cobre com CL50;7d de $<0,01 \text{ mg.L}^{-1}$ para *Lemna minor* e CL50;7d de $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ para *Azolla caroliniana* (GARLICH et al., 2016).

A toxicidade desta mistura para o *Pomacea canaliculata* ($0,13 \text{ mg.L}^{-1}$) foi similar ao encontrado por Garlich et al. (2016) com valor de CL50;48h de $0,33 \text{ mg.L}^{-1}$, utilizando a mistura de diquat + 0,1% de oxicloreto de cobre. No mesmo estudo realizado com o peixe *Hyphessobrycon eques* o valor obtido de CL50;48h foi de $18,97 \text{ mg.L}^{-1}$.

As misturas de diquat + 1,0% de hidróxido e diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre foram extremamente tóxicas para a macrófita *Lemna minor*. Resultados estes similares aos obtidos por Coutris et al. (2011) que utilizaram a mistura atrazina e isoproturon para *Lemna minor* com valores de CE50;21d de $0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ e CE50;21d de $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ para *Azolla filiculoides*.

As misturas testadas neste estudo foram mais tóxicas para o peixe *Hyphessobrycon eques*, diferindo da mistura de glifosato com 0,5% e 1,0% do surfactante condensado de alcoofenóis com óxido de eteno e sulfonados orgânicos, que foi praticamente não tóxico com valor de CL50;96h maior que 975 mg.L^{-1} em um experimento realizado para o peixe *Phalloceros caudimaculatus* (SHIOGIRI et al., 2010).

2.4 Conclusões

Com os resultados obtidos conclui-se ao final dos experimentos que a mistura de diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre foi a mais tóxica para os organismos bioindicadores e que a macrófita *Lemna minor* foi o bioindicador que apresentou a maior sensibilidade aos agroquímicos testados.

2.5 Referências

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 15088: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes*. São Paulo. 19p. 2011.

ARAUCO, L.R. CRUZ C. MACHADO, J.G. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. **Pesticidas: Rev. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**. 15, 55-64, 2005.

BENNICELLI, R. STĘPNIEWSKA, Z. BANACH, A.; SZAJNOCHA, K J. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg (II), Cr (III), Cr (VI)).; OSTROWSKI, from municipal waste water. **Chemosphere**, 55(1), 141-146, 2004.

BURGER, J. GOCHFELD, M. POWERS, C.W. CLARKE, J.H. BROWN, K. KOSSON, D. NILES, L. DEY, A. JEITNER, C. PITTFIELD, T. Determining Environmental Impacts for Sensitive Species: Using Iconic Species as Bioindicators for Management and Policy. **J. Environmental Protection**, 4, 87-95, 2013.

COUTRIS, C. MERLINA, G. SILVESTRE, J. PINELLI, E. ELGER, A. Can we predict community-wide effects of herbicides from toxicity tests on macrophyte species?. **Aquatic Toxicology**, 101(1), 49-56. 2011.

CRUZ, C. CUBO, P. GOMES, G. VENTURINI, F.P. GUILHERME, P.E. PITELLI, R. A. Sensibilidade de peixes neotropicais ao dicromato de potássio. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**, 3(1), 53-55, 2008.

DUFT, M. SCHULTE-OEHLMANN, U. TILLMANN, M. MARKERT, B. OEHLMANN, J. Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 22(1), 145–152, 2003.

FAO/WHO. **Pesticide residues in food — 1994. Evaluations — 1994. Part I Residues**, Vol. 1. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues (FAO Plant Production and Protection Paper 131/1), 1995.

FLORÊNCIO, T. CARRASCHI, S.P. CRUZ, C. SILVA, A.F. MARQUES, A.M. PITELLI, R.A. Bioindicadores neotropicais de ecotoxicidade e risco ambiental de fármacos de interesse para aquicultura. **Bol. Inst. Pesca**, 40(4), 569-576, 2014.

GARLICH, N. CRUZ, C. SILVA, A.F. CARRASCHI, S.P. MALASPINA, I.C. PITELLI, R.A. BIANCO, S. Diquat associated with copper sources for algae control: efficacy and ecotoxicology. **J. Environmental Science and Health, Part B.**, 0(0), 1-7, 2016.

GETTYS, L.A. HALLER, W.T. BELLAUD, M. **Biology and control of aquatic plant: A best management practices handbook**. Aquatic Ecosystem Restoration Foundation, Marietta GA, 210 pp. 2009.

GIBBONS, M.V. GIBBONS, H.L. SYTSMA, M.D. Acitizens manual for developing integrated aquatic vegetation management plans, **Washington Department of Ecology**, Water Quality Financial Assistance Program, 1994.

GUIMARÃES, F.P. **Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazina em solução aquosa.** 87f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

HAMILTON, M. A., RUSSO, R. C., THURSTON, V. 1977. Trimmed spearman-karber method for estimating medical lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science Technologic**, 7, 714-719, 1977.

HELFRICH, L.A. WEIGMANN, D.L. HIPKINS, P. STINSON, E.R. Pesticides and aquatic animals: a guide to reducing impacts on aquatic systems. **Virginia Cooperative Extension. Virginia State University.** Virginia, 24p. 1996.

HENARES, M.N.P. REZENDE, F.R.L. GOMES, G.R. CRUZ, C. PITELLI, R.A. Eficácia do diquat no controle de *Hydrilla verticillata*, *Egeria densa* e *Egeria najas* e toxicidade para o Guaru (*Phallocerus caudimaculatus*), em condições de laboratório. **Planta Daninha**, 29(2), 279-285, 2011.

LATIF, A. ALI, M. SAYYED, A.H. IQBAL, F. USMAN, K. RAUF, M. KAOSER, R. Effect of Copper sulphate and lead nitrate, administered alone or in combination, on the histology of liver and kidney of *Labeo rohita*. **Pakistan J. Zool**, 45(4), 913-920, 2013.

LOMBARDI, J.L. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos.** Editora Varela. São Paulo – SP, p. 263-272. 2004.

MOURA, M.A.M. FRANCO, D.A.S. MATALLO, M.B. Manejo integrado de macrófitas aquáticas. **Biológico**, 71(1), 77-82, 2009.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Draft guidance document. **The Threshold Approach for Acute Fish Toxicity Testing**, Paris. 4p. 2009.

OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. **Guidelines for the Testing of Chemicals, *Lemna* sp.** Growth inhibition test, p.22. 2002.

OLIVEIRA-FILHO, E.C. LOPES, R.M. PAUMGARTTEN, F.J.R. Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides. **Chemosphere**, 56(4), 369-374. 2004.

PITELLI, R.A. MARTINS, D. VELINI, E.D. Interferência e controle de macrófitas aquáticas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. R. **Manual de manejo de controle de plantas daninhas**. Passo Fundo, EMBRAPA, p. 299-328. 2008.

PIYATIRATITIVORAKUL, P. RUANGAREERAT, S. VAJARASATHIRA, B. Comparative toxicity of heavy metal compounds to the juvenile golden apple snail, *Pomacea* sp. **Language**, 379, 384, 2006.

POMPEO, M. Monitoramento e manejo de plantas aquáticas. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, 2008.

PROENÇA, M.A. OLIVEIRA, L.L.D.D. ROCHA, O. Efeito tóxico do cobre sobre o crescimento da macrófita aquática *Lemna minor*. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, 8(12), 2012.

RAND, G.M. PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and Applications. **Washington, Hemisphere Publishing**, 666p, 1985.

RODRIGUES, B.N. ALMEIDA, F.S. Guia de herbicidas. 5.ed. Londrina: **Grafmarke**, 591p. 2005.

SHIOGIRI, N.S. CARRASCHI, S.P. CUBO, P. SCHIAVETTI, B.L. CRUZ, C. PITELLI, R.A. Ecotoxicity of glyphosate and aterbane® br surfactant on guaru (*Phalloceros caudimaculatus*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 32(3), 285-289, 2010.

SILVA, A.F. CRUZ, C. N NETO, A. PITELLI, R. A. Ecotoxicity of herbicides for the aquatic macrophyte (*Azolla caroliniana*). **Planta Daninha**, 30(3), 541-546, 2012.

SILVA, A.F. CRUZ, C. REZENDE, F.R. L. YAMAUCHI, A.K.F. PITELLI, R.A. Copper sulfate acute ecotoxicity and environmental risk for tropical fish. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 36(4), 377-381, 2014.

SILVA, D.S. MARQUES, E.E. LÓLIS, S.F. Macrófitas aquáticas: “vilãs ou mocinhas”? **Revista Interface (Porto Nacional)**, (4), 2012.

SOUZA, G.S.F. CAMPOS, C.F. PEREIRA, M.R.R. MARTINS, D. Influência da chuva na eficiência de diquat no controle de *Salvinia auriculata*, *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes*. **Planta Daninha**, 29(4), 923-928, 2011.

USEPA. 2002. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Fifth edition. US Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. EPA-821-R-02-012. October 2002.

VENTURINI, F.P. CRUZ, C. PITELLI, R.A. Toxicidade aguda do sulfato de cobre e do extrato aquoso de folhas secas de nim para o caramujo (*Pomacea canaliculata*). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 30(2), 179-184, 2008.

ZUCKER, E. JOHNSON, S.L. **Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure Acute toxicity test for freshwater fish**. USEPA Publication, v.540, n.9, p.85-006, 1985.

CAPÍTULO 3 – Eficácia do diquat isolado e em mistura com fontes de cobre no controle da macrófita submersa *Hydrilla verticillata* e da microalga *Ankistrodesmus gracilis*

Resumo: O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do diquat isolado e em mistura com fontes de cobre (hidróxido e oxiclreto) para o controle da macrófita submersa *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle e da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov. Para tanto, foram utilizados ponteiros com 10,0 cm de *Hydrilla verticillata* e 300 mL de cultura de *Ankistrodesmus gracilis* em recipientes plásticos de 1,5 litros. Os experimentos foram conduzidos em laboratório e as concentrações de diquat testadas foram: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; e 1,8 mg L⁻¹ isoladas ou acrescidas em 1,0% de oxiclreto de cobre e de hidróxido de cobre, além de um controle. Em 3, 7, 11, 21 e 30 dias após aplicação foram avaliados os sinais visuais de fitotoxicidade e aos 60 dias após aplicação foi mensurada a produção de biomassa fresca e seca e o comprimento das plantas. Em 1, 7, 15, 21, 30, 45 e 60 dias após aplicação foi avaliada a concentração de clorofila *a* presente na água. O herbicida diquat utilizado de forma isolada ou em mistura com as fontes de cobre oxiclreto e hidróxido foi efetivo no controle de *Hydrilla verticillata* e da microalga *Ankistrodesmus gracilis*.

Palavras-chave: planta aquática, herbicida, clorofila *a*

3.1 Introdução

As macrófitas funcionam como habitat para muitos organismos e refúgio para peixes, ajudando na liberação de energia e carbono nas bases alimentares. As atividades antropogênicas têm contribuído de forma decisiva para a eutrofização dos corpos hídricos e para o crescimento desordenado destas plantas, prejudicando seus usos múltiplos (SILVA et al., 2012).

O reflexo destas infestações é o acúmulo de resíduos e sedimentos, a proliferação de insetos vetores de doenças, dificuldade na navegação e transporte de cargas, prejuízos ao turismo, à pesca e geração de energia nas usinas hidrelétricas. Dentre os principais problemas, as macrófitas submersas causam desequilíbrio na oxigenação da água, principalmente, durante o período noturno, pois ocorre um decréscimo na taxa de oxigenação, o que pode causar a mortalidade de peixes (CARVALHO et al., 2005), além disso causa desequilíbrio na relação carbono nitrogênio devido aos processos de degradação e decomposição (YUAN et al., 2016).

No Brasil, a *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle tem sido relatada como uma das plantas mais problemáticas no cenário atual, ela é nativa da Ásia e tem grande facilidade de colonização por se reproduzir vegetativamente por tubérculos, fragmentação do caule e sementes, tornando o ambiente colonizado com vegetação monoespecífica ou pouco diversificada (PITELLI et al., 2012).

Dentre os procedimentos de manejo para o controle de macrófitas aquáticas pode ser utilizado o controle físico com poda ou coleta manual, o controle mecânico utilizando máquinas de grande porte, o controle biológico que utiliza organismos vivos e o controle químico com herbicidas (POMPÊO, 2008).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente aprovou a regulamentação de autorização de uso de produtos químicos desde que devidamente registrado em ambientes aquáticos através da RESOLUÇÃO Nº 467, DE 16 DE JULHO DE 2015, Publicada no DOU nº 135, de 17 de julho de 2015, seção 1, pag. 70 a 71 que “Dispõe sobre critérios para a autorização de uso de produtos ou de agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para o controle de organismos ou

contaminantes em corpos hídricos superficiais e dá outras providências” (CONAMA, 2015).

O herbicida diquat é uma alternativa para o controle de macrófitas submersas, pois é um herbicida de contato, não seletivo, inibidor do fotossistema I, pertencente ao grupo dos bipirilídios, sua meia vida é menor que 48 horas deixando a água livre de resíduos, pois se liga a partículas coloidais do solo (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011) e possui segurança ambiental para organismos aquáticos como peixes e caramujos (GARLICH et al., 2016a). Estudos sobre sua eficácia já foram realizados com *Hydrilla verticillata*, *Egeria densa* e *Egeria najas* (HENARES et al., 2011) e *Ceratophyllum demersum* (GARLICH et al., 2016b).

Um dos possíveis problemas após o controle das infestações de macrófitas é a liberação de nutrientes como o nitrogênio e fósforo no ambiente aquático, favorecendo o processo de eutrofização (MOHR et al., 2007), o que pode favorecer a reprodução e a proliferação de algas.

Com o aumento de algas ocorre a diminuição do oxigênio dissolvido na água, o que pode acarretar na mortalidade de peixes, liberação de toxinas secretadas por algumas espécies de cianobactérias, degradação da qualidade da água, alteração da potabilidade, alto custo de tratamento, problemas no abastecimento público e uso impróprio da água para recreação (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; MOURA; FIRMINO, 2014).

O cobre pode ser eficiente no controle de algas, pois inibe a divisão celular e a fotossíntese como demonstrado para *Chlorella* sp. e *Scenedesmus obliquus* (MA; LIANG, 2001), *Pseudokirchneriella subcapitata* (SCHAMPHELAERE et al., 2005), *Chlorella pyrenoidosa* (XIA; TIAN, 2009) e *Ankistrodesmus gracilis* (GARLICH et al., 2016a).

A aplicação de um herbicida e de um produto algicida pode facilitar o controle de macrófitas e algas, e as misturas destes dois produtos químicos são descritos como eficazes para o controle de macrófitas e algas, minimizando os impactos ambientais do controle (SUTTON, 1970; MARTINS et al., 2008; HENARES et al., 2011; GARLICH et al., 2016a,b).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de controle do herbicida diquat, isolado e em mistura com duas fontes de cobre (oxicloreto e hidróxido) no controle

da macrófita submersa *Hydrilla verticillata* e avaliar a eficácia de controle secundário da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em condição de laboratório.

3.2 Material e métodos

Nos experimentos foram utilizados ponteiros de *H. verticillata* com 10,0 cm de comprimento, conforme as recomendações de Henares et al. (2011). A microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov foi obtida da coleção nº 005CH, originária da represa do Broa em Itirapina – SP (22°15'S e 47°19'W). Esta microalga foi cedida pelo Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton do Centro de Aquicultura da UNESP e cultivada em sistema estático a $22,0 \pm 2,0$ °C, exposta a luz a $60,1 \mu\text{mol cm}^2\text{s}^{-1}$ em meio NPK (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 1993).

Os produtos testados foram o herbicida diquat, na formulação Reglone[®], com 200,0 g i.a. L⁻¹, de forma isolada e misturado com 1,0% de oxicloreto de cobre, na formulação Difere[®], com 588,0 g i.a.L⁻¹ e 1,0% de hidróxido de cobre (Supera[®]) com 537,4g i.a. L⁻¹.

3.2.1 Experimentos de eficácia para a macrófita submersa *H. verticillata* e microalga *A. gracilis*

Os experimentos foram conduzidos em sala de bioensaio climatizada a $25,0 \pm 1,0$ °C, com fotoperíodo de 12 horas e iluminação de 1000 lux. Para tanto, em recipientes plásticos com capacidade para 1,5 L com aeração contínua foram adicionados três ponteiros de *H. verticillata* unidos na base por um peso de chumbo. Foi adicionado em cada unidade experimental 300 mL da cultura da microalga na fase exponencial do crescimento (10 dias) com concentração de 5×10^3 células.mL⁻¹

Após 24 horas de aclimação foi realizada a aplicação do herbicida isolado e em mistura com as fontes de cobre. As concentrações do diquat e das misturas com 1,0% de oxicloreto de cobre e 1,0% de hidróxido de cobre testadas foram: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; e 1,8 mg.L⁻¹ e uma testemunha, com dez réplicas em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Em 3, 7, 11, 21 e 30 dias após aplicação (DAA) foram avaliados os sinais de fitotoxicidade (clorose, necrose das folhas e perda da capacidade de sustentação dos ponteiros) e em 60 dias após aplicação (DAA) foi mensurada a produção de biomassa verde, o comprimento das plantas (cm) e a biomassa seca das plantas conforme recomendação de ARTS et al., (2008). Para a obtenção da massa seca (g) as plantas permaneceram em estufa com circulação de ar forçada a 65,0°C até obtenção de peso constante.

3.2.2 Avaliação da clorofila a e análise estatística

A clorofila a foi extraída com acetona 90% e quantificada a 664 e 750 nm em espectrofotômetro (CETESB, 1990). Foram avaliadas as concentrações de clorofila a presentes na água no primeiro e aos 7, 15, 21, 30, 45 e 60 dias após a aplicação (DAA).

Os resultados obtidos de biomassa fresca, comprimento dos ponteiros, biomassa seca e clorofila a foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e suas médias comparadas teste de Tukey a 5% de probabilidade no programa Assistat versão 7.6 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2012).

3.3 Resultados e discussão

Nos experimentos com diquat isolado ou acrescido de 1,0% de oxicloreto e hidróxido de cobre ocorreu 100% de controle em todas as concentrações testadas, sem produção final de biomassa, similar ao descrito por Garlich et al. (2016b) em que o diquat isolado e em mistura com 0,1% de oxicloreto de cobre e hidróxido de cobre controlou 100% o *Ceratophyllum demersum* em todas as concentrações testadas. Em 3 dias DAA não ocorreu sinal de fitotoxicidade causada pelo herbicida, exceto paralisia do crescimento das plantas em relação a testemunha. Em 7 e 11 DAA ocorreu clorose apical dos ponteiros em todas as concentrações testadas, aos 21 DAA ocorreu perda da capacidade de sustentação dos ponteiros e em 30 DAA ocorreu necrose total dos ponteiros em todas as concentrações. Estes sinais de fitointoxicação da *Hydrilla verticillata* também foram descritos para *Elodea*

canadenses, *Elodea nuttallii* e *Potamogeton crispus* expostas ao herbicida asulam (ARTS et al., 2008) e para o *Ceratophyllum demersum* exposto ao diquat (GARLICH et al., 2016b).

Segundo Henares et al. (2011), a *Hydrilla verticillata* é mais sensível ao diquat do que outras macrófitas submersas brasileiras como a *Egeria densa* e *Egeria najas*, com redução do crescimento dos ponteiros até 3 vezes quando comparado a estas macrófitas após a aplicação de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$. Na comparação entre estes estudos, verificou-se uma maior sensibilidade das plantas ao diquat isolado ou em mistura com as fontes de cobre. Henares et al. (2011), ao final de 14 dias do uso do diquat na concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$, obtiveram a biomassa fresca das plantas de 1,6 g como também os ponteiros com 6,0 cm de comprimento. Já Langeland et al. (2002) e Glomski et al. (2005), observaram a biomassa seca de *H. verticillata* aos 21 dias com aplicação de $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,37 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Como constatado neste experimento, para a obtenção do controle total da biomassa da macrófita *H. verticillata* faz-se necessário uma avaliação mais prolongada de até 60 dias após aplicação.

Van et al. (1987) observaram o tempo mínimo de 2 dias de exposição desta macrófita em condição de laboratório a $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ para obtenção de controle, enquanto que para a concentração de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ o tempo necessário foi de 6 a 12 horas.

Para Glomski et al. (2005), o diquat nas concentrações de 0,09; 0,185; e $0,37 \text{ mg L}^{-1}$, com exposição de 12 horas, apresentou excelente controle da *Elodea canadenses*, porém o controle para *H. verticillata* não foi satisfatório. O diquat ($0,37 \text{ mg L}^{-1}$) apresentou excelente controle desta macrófita e *Egeria densa* em condição estática ou com tempo mínimo de três horas de exposição, porém em cenário de simulação de fluxo de água, este não foi efetivo no controle *H. verticillata* (SKOGERBOE et al., 2006).

O acréscimo de 1,0% de cobre na formulação comercial de diquat não interferiu na eficácia do herbicida, indicando que não ocorre efeito antagônico entre o ingrediente ativo (6,7-dihydrodipyrído [1,2- α :2',1'-c] pyrazinediium íon) e o oxiclreto ou hidróxido de cobre. Este efeito também foi descrito por Sutton et al. (1970) com a mistura de 0,1 a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de sulfato de cobre ao herbicida diquat

para controle de *Egeria densa*, *Najas guadalupensis* e *H. verticillata*, por Pennington et al. (2001) com mistura de 1,0 a 3,0 mg L⁻¹ de endothall + 0,5 mg L⁻¹ de cobre com resultados similares de controle (> 99%) de *H. verticillata* com o herbicida isolado ou em mistura e por Garlich et al. (2016b) com 0,1% de oxicloreto e hidróxido de cobre ao herbicida para controle de *C. demersum*.

Nos experimentos realizados com diquat isolado ou acrescido das fontes do cobre o período experimental foi de 60 dias em sistema estático, pois um dos objetivos foi a verificação do possível efeito de controle da microalga *A. gracilis*, porém a ausência de biomassa final da macrófita em todas as concentrações testadas indica que o principal problema em experimentos com diquat é o tempo de exposição e o tempo de avaliação dos efeitos.

Na avaliação da clorofila *a* no primeiro dia após aplicação do diquat a concentração do pigmento foi em torno de 12,0 µg L⁻¹ em todas as concentrações testadas (Tabela 1). Em 7 e 15 dias DAA no tratamento testemunha a concentração de clorofila *a* foi de 13,77 e 16,39 µg L⁻¹, respectivamente, enquanto que, em todas as concentrações ocorreu uma diminuição acentuada na clorofila *a* diferindo significativamente da testemunha, com valores entre 1,92 a 0,36 µg L⁻¹, sendo que os tratamentos 0,8; 1,2 e 1,8 mg L⁻¹ ainda diferiram das demais concentrações (Tabela 1). A expressiva redução da clorofila *a* em 15 DAA para a alga *A. gracilis* é similar ao encontrado por Garlich et al. (2016a) em que o diquat, oxicloreto de cobre e o hidróxido de cobre reduziram a atividade fotossintética com valores entre 0,09 a 0,14 µg L⁻¹.

O diquat tem sido muito avaliado para controle de macrófitas, especialmente por promover o rápido controle de muitas espécies (MARTINS et al., 2008; GARLICH et al., 2016b). Este é um herbicida inibidor do fotossistema I, que reduz a eficiência na transferência de elétrons, sistema este que está presente tanto nas macrófitas como nas algas.

O efeito secundário sobre a microalga *A. gracilis* é fundamental na tomada de decisão de manejo, pois um dos principais problemas da utilização do controle químico é a rápida liberação de nutrientes na água, o que pode causar eutrofização e favorecer novas colonizações de macrófitas (RATTRAY et al., 1991) ou a ocorrência de bloom de algas (HESSEN et al., 2002).

Tabela 1. Médias dos valores de Clorofila *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$) da microalga *Ankistrodesmus gracilis* com a aplicação do herbicida diquat durante o período experimental.

Conc. (mg L^{-1})	Dias após aplicação						
	1	7	15	21	30	45	60
Testemunha	12,67	13,77 a	16,39 a	17,16 a	17,73 a	18,71 a	20,69 a
0,1	12,45	1,92 b	1,30 b	0,61 b	1,81 b	4,63 b	5,45 b
0,2	12,37	1,65 b	1,07 b	0,50 bc	1,65 b	4,38 b	5,22 b
0,4	12,61	1,52 b	0,74 b	0,46 bc	1,57 b	4,10 b	4,51 b
0,8	12,62	0,74 c	0,52 b	0,35 bc	1,05 bc	3,33 b	4,39 b
1,2	12,69	0,61 c	0,44 b	0,26 bc	0,72 c	1,56 c	2,84 c
1,8	12,53	0,36 c	0,37 b	0,23 c	0,68 c	0,92 c	2,64 c
CV	1,21	7,86	9,46	4,67	8,03	9,04	8,36
DMS	0,42	0,64	1,61	0,36	0,80	1,50	1,52

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

O diquat foi efetivo no controle da microalga *A. gracilis*, assim como para *Scenedesmus vacuolatus* exposta de 13 a 30.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ do herbicida S-metalachor por 48 horas (COPIN et al., 2016) e para a *Chlamydomonas reinhardtii* exposta ao herbicida paraquat com concentração efetiva (EC50) de 26 μM (JAMERS; DE COEN, 2010).

No ensaio com diquat + 1,0% hidróxido de cobre em 1 DAA a concentração de clorofila *a* detectada foi em torno de 12,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 2). Em 7 DAA ocorreu diminuição significativa em todas as concentrações testadas em relação a testemunha. As concentrações mais efetivas foram 1,2 e 1,8, que apresentaram os menores valores de clorofila *a* na água. Em 15 DAA até 60 DAA ocorreu comportamento similar de controle em todas as concentrações (Tabela 2). Em comparação com o ensaio com diquat isolado, a concentração final de clorofila *a* foi menor neste ensaio, indicando que a presença de 1,0% de hidróxido de cobre na formulação do herbicida aumenta o efeito algicida na unidade experimental. Segundo Garlich et al. (2016a) o diquat misturado com 0,1% de hidróxido de cobre em 15 DAA foi eficaz a partir de 0,8 mg L^{-1} com valores de clorofila *a* de 0,32 $\mu\text{g L}^{-1}$, diferindo dos resultados encontrados neste estudo.

Tabela 2. Médias dos valores de Clorofila *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$) da microalga *Ankistrodesmus gracilis* com a aplicação do herbicida diquat + 1,0% hidróxido de cobre durante o período experimental.

Conc. (mg L^{-1})	Dias após aplicação						
	1	7	15	21	30	45	60
Testemunha	12,68	13,77 a	13,39 a	17,16 a	17,73 a	18,71 a	20,69 a
0,1	12,62	3,91 b	1,06 b	0,98 b	1,24 b	1,25 b	0,79 b
0,2	12,71	3,27 bc	0,77 b	0,66 bc	1,06 b	0,52 bc	0,54 b
0,4	12,47	3,25 bc	0,60 b	0,57 bc	1,02 b	0,37 bc	0,46 b
0,8	12,50	2,14 cd	0,26 b	0,54 bc	0,88 bc	0,32 c	0,31 b
1,2	12,69	1,76 d	0,23 b	0,53 bc	0,32 c	0,25 c	0,09 b
1,8	12,79	1,54 d	0,15 b	0,45 c	0,29 c	0,24 c	0,08 b
CV	1,46	8,12	9,72	5,52	7,73	8,43	9,98
DMS	0,51	1,19	1,60	0,45	0,69	0,90	1,00

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

No ensaio com diquat + 1,0% de Oxicloreto de cobre, as concentrações de clorofila *a* demonstram o controle de *A. gracilis* similar ao descrito com a adição de hidróxido de cobre na formulação de diquat (Tabela 3), porém a concentração de clorofila *a* em 60 dias após a aplicação foi menor com oxicloreto de cobre, com valores entre 0,39 a 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$. O resultado encontrado por Garlich et al. (2016a) foi similar ao descrito neste estudo, pois a mistura de diquat + 0,1% de oxicloreto de cobre em 15 DAA na concentração de 1,2 mg L^{-1} reduziu a os valores de clorofila *a* em 0,26 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para Franklin et al. (2002) a adição de apenas 1,4 mM de íon cobre ou combinado com zinco ou cádmio é suficiente para o controle da atividade de crescimento da alga de água doce tropical *Chlorella* sp., sendo este valor muito menor ao utilizado neste estudo.

Em alguns casos dependendo da forma ativa, formulação, disponibilidade química ou fatores ambientais, o cobre pode apenas paralisar temporariamente a atividade de crescimento da alga, pois segundo Zhang et al. (2014) para *Chlorella vulgaris*, Hook et al. (2014) para *Ceratoneis closterium*, a intensidade luminosa e as altas concentrações de cobre prejudicam as rotas metabólicas da fotossíntese causando efeitos deletérios em níveis estruturais, bioquímicos e fisiológicos nas

algas e, em consequência, afetam a fixação de nitrogênio, provocam desarranjos na membrana plasmática, reduzem a absorção de elementos minerais, afetando a mobilidade celular e causando instabilidade em organelas.

Tabela 3. Médias dos valores de Clorofila *a* ($\mu\text{g L}^{-1}$) da microalga *Ankistrodesmus gracilis* com a aplicação do herbicida diquat + 1,0% de oxicloreto de cobre durante o período experimental.

Conc. (mg L^{-1})	Dias após aplicação						
	1	7	15	21	30	45	60
Testemunha	12,66	13,77 a	16,39 a	17,16 a	17,73 a	18,71 a	20,69 a
0,1	12,60	3,88 b	0,47 b	0,92 b	2,07 b	0,48 b	0,39 b
0,2	12,74	2,26 bc	0,44 b	0,44 c	0,73 c	0,27 b	0,27 b
0,4	12,63	1,85 bc	0,40 b	0,40 c	0,27 c	0,18 b	0,18 b
0,8	12,65	1,61 c	0,31 b	0,28 c	0,21 c	0,12 b	0,07 b
1,2	12,77	1,47 c	0,30 b	0,27 c	0,17 c	0,08 b	0,06 b
1,8	12,96	0,89 c	0,22 b	0,19 c	0,14 c	0,04 b	0,05 b
CV	1,50	9,77	8,51	5,13	8,69	7,97	9,48
DMS	0,53	2,02	1,59	0,40	1,16	0,63	0,99

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

A diminuição da concentração de clorofila *a* nos três experimentos foi similar ao descrito para *Scenedesmus obliquus* exposta a $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Diuron (EULLAFFROY; VERNET, 1990). A mesma alga exposta por 24 e 48h a 1000,0; 100,0; 10,0; 1,0 e 0,1 mg L^{-1} do herbicida Flazasulfuron resultou nos valores finais em torno de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ de pigmento fotossintético (COUDERCHET; VERNET, 2003).

3.4 Conclusões

O herbicida diquat utilizado de forma isolada ou em mistura com as fontes de cobre oxicloreto e hidróxido foram eficientes no controle da macrófita submersa *Hydrilla verticillata* da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em todas as concentrações testadas nas condições deste experimento.

Agradecimentos

O autor agradece a Profa. Dr. Lúcia Helena Sipaúba Tavares do CAUNESP da UNESP de Jaboticabal pela doação da microalga utilizada neste estudo.

3.5 Referências

ARTS, G.H.P. BELGERS, J.D.M. HOEKZEMA, C.H. THISSEN, J.T.N.M. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. **Environmental Pollution.**, v. 153, n. 1, p. 199–206, 2008.

CARVALHO, F.T. VELINI, E.D. MARTINS, D. Plantas aquáticas e nível de infestação das espécies presentes no reservatório de Bariri, no rio Tietê. **Planta Daninha**, v. 23, n. 2, p. 371-374, 2005.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 1990. **Norma técnica CETESB L5.306. Determinação de pigmentos fotossintetizantes - clorofila-A, B e C e feofitina-A: método de ensaio.** 1990. 22p.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução n. 467, de 16 de Julho de 2015**, Publicada no DOU nº 135, de 17 de julho de 2015, seção 1, pag. 70 a 71, 2015.

COPIN, P.J. PERRONET, L. CHÈVRE, N. Modelling the effect of exposing algae to pulses of S-metolachlor: How to include a delay to the onset of the effect and in the recovery. **Science of the Total Environment.**, v. 541, p. 257–267, 2016.

COUDERCHET, M. VERNET, G. Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. **Ecotox. Environ. Safety.**, v. 55, p. 271–277, 2003.

EULLAFFROY, P. VERNET, G. The F684/F735 chlorophyll fluorescence ratio: a potential tool for rapid detection and determination of herbicide phytotoxicity in algae. **Water Research.**, v. 37, p. 1983–1990, 1990.

FRANKLIN, N. STAUBER, J. LIM, R. PETOCZ, P. Toxicity of metal mixtures to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.): the effect of interactions between copper, cadmium, and zinc on metal cell binding and uptake. **Environmental Toxicology and Chemistry.**, v. 21, n. 11, p. 2412–2422, 2002.

GARLICH, N. CRUZ, C. SILVA, A.F. CARRASCHI, S.P. MALASPINA, I.C. PITELLI, R.A. BIANCO, S. Diquat associated with copper sources for algae control: Efficacy and ecotoxicology. **J. of Env. Sci. and Health, Part B**, v. 51, n. 4, p. 215-221, 2016.

GARLICH, N. CRUZ, C. SILVA, A.F. MALASPINA, I.C. FERREIRA, R.G. TEDESQUE, M.G. PITELLI, R.A. BIANCO, S. Effectiveness of diquat, copper hydroxide, copper oxychloride and their association in control of submerged macrophytes *Ceratophyllum demersum*. **Planta Daninha**, v. 34, n. 1, p. 117-123, 2016.

GLOMSKI, L.A.M. SKOGERBOE, J.G. GETSINGER, K.D. Comparative Efficacy of Diquat for Control of Two Members of the Hydrocharitaceae: Elodea and Hydrilla. **J. Aquat. Plant Manage.**, v. 43, p. 103-105, 2005.

HENARES, M.N.P. REZENDE, F.R.L. GOMES, G.R. CRUZ, C. PITELLI, R.A. Eficácia do diquat no controle de *Hydrilla verticillata*, *Egeria densa* e *Egeria najas* e toxicidade aguda para o guaru (*Phallocerus caudimaculatus*), em condições de laboratório. **Planta Daninha.**, v. 29, n. 2, p. 279-285, 2011.

HESSEN, D.O. FÆRØVIG, P.J. ANDERSEN, T. Light, nutrients, and p:c ratios in algae: grazer performance related to food quality and quantity. **Ecology**, v. 83, p. 1886–1898, 2002.

HOOK, S.E. OSBORN, H.L. GISSI, F. MONCUQUET, P. TWINE, N.A. WILKINS, M. R. ADAMS, M.S. RNA-Seq analysis the toxicant-induced transcription e of the marine diatom, *Ceratoneis closterium*. **Mar. Genomics.**, v. 16, p. 45-53, 2014.

JAMERS, A. DE COEN, W. Effect assessment of the herbicide paraquat on a green alga using differential gene expression and biochemical biomarkers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 4, p. 893–901, 2010.

LANGELAND, K.A. HILL, O.N. KOSCHNICK, T.J. HALLER, W.T. Evaluation of a New Formulation of Reward Landscape and Aquatic Herbicide for Control of Duckweed, Waterhyacinth, Waterlettuce, and Hydrilla. **J. Aquat. Plant Manage.** v. 40, p. 51-53, 2002.

MA, J. LIANG, W. Acute toxicity of 12 herbicides to the green algae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 67, p. 347–351, 2001.

MARTINS, D., COSTA, N.V., DOMINGOS, V.D., RODRIGUES, A.C.P., CARVALHO, F.T.. Efeito do período de exposição a concentrações de diquat no controle de plantas de *Egeria densa*, *Egeria najas* e *Ceratophyllum demersum*. **Planta Daninha.**, v. 26, n. 4, p. 865-874, 2008.

MOHR S, BERGHAHN R, FEIBICKE M, MEINECKE S, OTTENSTRÖER T, SCHMIEDLING, I Effects of the herbicide metazachlor on macrophytes and ecosystem function in freshwater pond and atream mesocosms. **Aquatic Toxicol.**, v.82, p.73-84, 2007.

MOURA, D. FERMINO, F. S. Aspectos da qualidade da água para abastecimento público na represa Paulo de Paiva Castro sistema cantareira São Paulo-SP. **R. Met. de Sust.**, v. 4, n. 2, p. 96-109, 2014.

PENNINGTON, T.G. SKOGERBOE, J.G. GETSINGER, K.D. Herbicide/Copper Combinations for Improved Control of *Hydrilla verticillata*. **J. Aquat. Plant Manage.**, v. 39, p. 56-58, 2001.

PITELLI, R.L.C.M. PITELLI, R.A. RODRIGUES, C. J. DIAS, J. H. P. **Manual de identificação das plantas aquáticas de Porto Primavera**. Jaboticabal: Funep, 1.ed., 54 p. 2012.

POMPÊO, M.L.M. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas. **Oecol. Bras.**, v. 12, n. 3, p. 406-424, 2008.

RATTRAY, M.R. HOWARD-WILLIAMS, C. BROWN, J.M.A. Sediment and water as sources of nitrogen and phosphorus for submerged rooted aquatic macrophytes. **Aquatic Botany**, v. 40, p. 225-237, 1991.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 6.ed. Londrina: 2011. 697p.

SCHAMPHELAERE, K.C. STAU BER, J.L. WILDE, K.L. SCOTT. J. M. BROWN, P. FRANKLIN, N. CREIGHTON, N.M. JANSSEN, C. Toward a Biotic Ligand Model for Freshwater Green Algae: Surface-bound and internal copper are better predictors of toxicity than free Cu^{2+} -ion activity when pH is varied. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, p. 2067-2072, 2005.

SILVA, D.S. MARQUES, E.E. LOLI, S.F. Macrófitas aquáticas: “vilãs ou mocinhas”? **Revista Interface** (Porto Nacional), n.04, p.17-27, 2012.

SILVA, F.A.S. AZEVEDO, C.A.V. **Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows - ASSISTAT**. 7.6 Beta. (2012).

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. ROCHA, O. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I - algas clorofíceas. **Biotemas**, v. 6, p. 93-106. 1993.

SKOGERBOE, J.G. GETSINGER, K.D. GLOMSKI, L.A.M. Efficacy of Diquat on Submersed Plants Treated Under Simulated Flowing Water Conditions. **J. Aquat. Plant Manage.**, v. 44, p. 122-125, 2006.

SUTTON, D.L. WELDON, L.W. BLACKBURN, R.D. Effect of Diquat on Uptake of Copper in Aquatic Plants. **Weed Science**, v. 18, n. 6, p. 703-707, 1970.

VAN, T.K. STEWARD, K.K. CONANT, JR. R.D. Responses of Monoecious and Dioecious Hydrilla (*Hydrilla verticillata*) to Various Concentrations and Exposures of Diquat. **Weed Science**, v. 35, n. 2, p. 247-252, 1987.

VIDOTTI, E.C. ROLLEMBERG, M.C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Quim. Nova.**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

XIA J. TIAN, Q. Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa* – OJIP chlorophyll a fluorescence analysis. **J. Environmental Sciences**, v. 21, p. 1569–1574, 2009.

YUAN, G. FU, H. ZHONG, J. LOU, Q. NI, L. CAO, T. Growth and C/N metabolism of three submersed macrophytes in response to water depths. **Environ. Experim. Botany.**, 122, 94–99. 2016.

ZHANG, W. TAN, N.G.J. LI, S.F.Y. NMR-based metabolomics and LC-MS/MS quantification reveal metal-specific tolerance and redox homeostasis in *Chlorella vulgaris*. **Mol. BioSyst.**, v. 10, p. 149–160, 2014.

CAPÍTULO 4 – Controle químico de *Hydrilla verticillata* em microcosmos e mesocosmos com diquat e hidróxido de cobre.

RESUMO – O objetivo deste estudo foi realizar o controle da macrófita submersa *Hydrilla verticillata* em condições microcosmos (600 litros) e mesocosmos de (1200 litros), com o monitoramento das variáveis de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH), do teor de clorofila *a*, demanda biológica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) por um período de 60 dias. Inicialmente, foi realizado a colonização das unidades experimentais com *Hydrilla verticillata* até a obtenção de 80% de ocupação. A seguir, foi realizado a aplicação de diquat na concentração 0,8 mg.L⁻¹; da mistura de diquat 1% de hidróxido de cobre na concentração 0,8 mg.L⁻¹ e aplicação de hidróxido de cobre na concentração 1,5 mg.L⁻¹. Todos os tratamentos testados controlaram a macrófita *Hydrilla verticillata*, sendo o tratamento mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre o mais eficiente na maioria dos parâmetros analisados.

Palavras-chave: macrófita, mistura, herbicida, bioindicador

4.1 Introdução

As macrófitas aquáticas são fonte de energia e matéria prima no primeiro nível trófico das cadeias alimentares em ecossistemas aquáticos e além de seu papel fundamental no estoque de energia e carbono nas bases da cadeia alimentar, promovem habitats para muitos organismos animais e servem de suporte para a oviposição, além de refúgio de muitos peixes e outros animais (Neves et al., 2002).

Atualmente as macrófitas aquáticas têm ganhado destaque em pesquisas técnicas e científicas. Outro fato importante que vem ocorrendo são os programas de monitoramento e levantamento de espécies e populações em diversos corpos hídricos pelo Brasil.

Entre os principais motivos dos estudos e programas de monitoramento dos corpos hídricos destaca-se a presença de grandes populações de macrófitas em diversos reservatórios de usinas hidroelétricas, como no caso da Usina Hidroelétrica Engenheiro Souza Dias (Jupiá), no rio Paraná, onde diariamente são retiradas mecanicamente das grades de proteção das turbinas geradoras de energia elétrica grandes quantidades da macrófita submersa *Egeria* spp.

Segundo Marcondes et al. (2002), um dos maiores problemas de infestação de plantas aquáticas no Brasil está relacionado a presença das espécies *Egeria najas*, *Egeria densa* e *Ceratophyllum demersum* no reservatório da Usina Hidroelétrica Engenheiro Souza Dias.

No Brasil, plantas como a *Eichhornia crassipes*, *Urochloa subquadrifera*, *Egeria najas*, *Egeria densa* e *Ceratophyllum demersum* constantemente são apontadas como espécies causadoras de danos a determinadas situações de uso e exploração de corpos hídricos.

Segundo Pitelli et al. (2008), as densas colonizações de macrófitas podem alterar as características dos corpos hídricos, principalmente por afetarem a instalação e manutenção de uma série de populações de organismos aquáticos.

De acordo com Neves et al. (2002) o crescimento intenso de vegetais aquáticos, desde macrófitas até as algas, que infestam várias áreas de superfície livre dos corpos d'água, influenciam significativamente os usos múltiplos da água. Segundo Tanaka et al. (2002), o controle de plantas aquáticas no Brasil tornou-se

alvo intenso de estudos nos últimos anos, devido aos prejuízos provocados por esse tipo de vegetação nos reservatórios de usinas hidrelétricas.

A macrófita aquática *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle é a planta mais importante do reservatório de Porto Primavera no rio Paraná. A sua presença no reservatório foi constatada no ano de 2005 pelo professor da Universidade da Califórnia Dr. Lars Anderson (PITELLI et al., 2012).

Anualmente milhões de dólares são gastos em herbicidas e colhedoras mecânicas para o controle das infestações de *Hydrilla verticillata* no Estado da Flórida – EUA.

Segundo Cardoso et al. (2003), o controle químico promove resultado rápido, sendo uma alternativa de manejo que mantém as plantas daninhas aquáticas abaixo do nível de dano econômico, não prejudicando as funções dos corpos hídricos. De acordo como os mesmos autores, outra vantagem proporcionada pelo controle químico é a especificidade, que elimina o risco da coleta indevida de animais, como ocorre na retirada de plantas dos corpos hídricos utilizando-se o controle mecânico.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de diquat, hidróxido de cobre e mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre para o controle da macrófita submersa *Hydrilla verticillata*.

4.2 Material e Métodos

Neste estudo foram realizados dois experimentos em condições de microcosmos e mesocosmos no Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia - NEPEAM, da UNESP de Jaboticabal – SP.

Os produtos testados para o controle da macrófita foram o herbicida diquat, na formulação Reglone[®], com 200,0 g i.a. L⁻¹ e o hidróxido de cobre (Supera[®]) com 537,4 g i.a. L⁻¹.

4.2.1 Experimento 1

O experimento para o controle da macrófita submersa *Hydrilla verticillata* foi realizado em microcosmos de concreto com volume de 600 litros (Figura 1) e vazão da água ajustada para $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Em cada microcosmo (Figura 1) foram distribuídos três vasos com 1 kg de substrato composto por solo, areia e esterco bovino, na proporção 2:1:1 (V:V), onde foram plantados 50 g de ponteiros de *Hydrilla verticillata* provenientes do hidrofítotério do NEPEAM.



Figura 1. Microcosmos de concreto com capacidade para 600 litros utilizados no experimento 1.

Em todas as unidades experimentais foram adicionados 5 indivíduos adultos do peixe *Hyphessobrycon eques*. A aplicação dos tratamentos foi realizada no dia 22/08/2013 às 08h00min, quando os microcosmos estavam 75% colonizados pela macrófita submersa *Hydrilla verticillata*.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com três tratamentos e uma testemunha, todos com 3 repetições. Os tratamentos utilizados

foram: diquat na concentração de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$, hidróxido de cobre na concentração de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e a mistura de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de diquat + 1% de hidróxido de cobre.

Em 60 DAA foram avaliadas a produção de biomassa fresca e a mortalidade dos peixes. Para a obtenção da biomassa seca as plantas permaneceram em estufa com circulação de ar forçada a 65°C até atingirem massa constante.

Em 1, 3, 7, 11, 15, 21, 30, 45 e 60 DAA foram realizadas coletas para amostragem dos teores de clorofila a presentes na água, a demanda biológica de oxigênio (DBO) e a demanda química de oxigênio (DQO).

Neste período também foram mensuradas as variáveis de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH) com uma sonda multiparâmetros YSI 556 MPS da YellowSpring Co©.

4.2.2 Experimento 2

No experimento para o controle da macrófita submersa *Hydrilla verticillata* foi realizado em condição de mesocosmos de concreto com volume de 1.200 litros (Figura 2) e vazão de 50 mL.min^{-1} . Em cada mesocosmo foram distribuídos 12 vasos com 5 kg de substrato composto por solo, areia e esterco bovino, na proporção 2:1:1 (V:V), onde foram transplantados 300 g de ponteiros de *Hydrilla verticillata*.

Em todas as unidades experimentais foram introduzidos 10 indivíduos adultos do peixe *Hyphessobrycon eques* e em suportes flutuantes foram introduzidos 10 g das macrófitas *Azolla caroliniana* e *Lemna minor* e 5 g da alga filamentosa *Pithophora kewensis* como organismos não alvo da aplicação e bioindicação.

No dia 01/05/2014 as 08h00min horas ocorreu a aplicação dos tratamentos, com os mesocosmos 100% colonizados pela macrófita submersa *Hydrilla verticillata* (Figura 2).

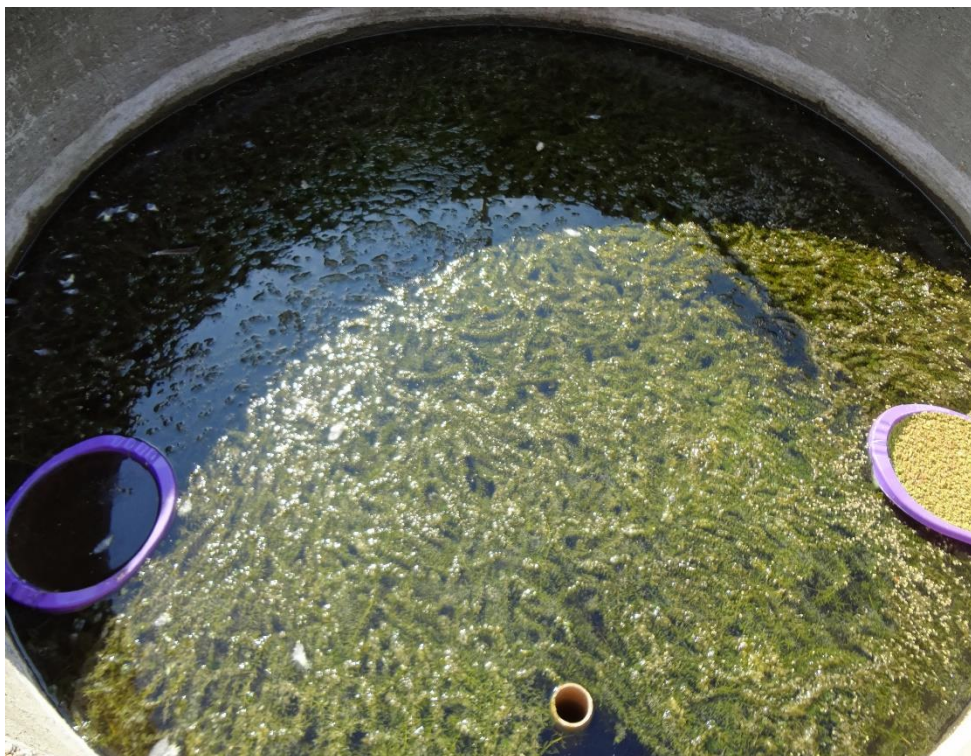


Figura 2. Mesocosmo de 1200 litros colonizado pela macrófita *Hydrilla verticillata* utilizado no experimento 2 .

O delineamento experimental utilizado neste experimento foi o de blocos casualizados, com três tratamentos e uma testemunha, todos com 4 repetições. Os tratamentos testados foram: diquat na concentração de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$, hidróxido de cobre na concentração de $1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ e a mistura de diquat com 1% de hidróxido de cobre na concentração de $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$.

As avaliações aos 60 DAA foram: produção de biomassa fresca, número de tubérculos, biomassa seca de tubérculos e biomassa seca de raízes. Para a obtenção da biomassa seca as plantas permaneceram em estufa com circulação de ar forçada a 65°C até atingirem massa constante. Também 60 DAA foi avaliado a mortalidade do *Hyphessobrycon eques*, o número de alevinos de *Hyphessobrycon eques*, o número de caramujos *Biomphalaria* spp. que ocorreram espontaneamente nos mesocosmos, a biomassa fresca das plantas indicadoras *Azolla caroliniana* e *Lemna minor* e a biomassa fresca da alga filamentosa *Pithophora kewensis*.

Em 1, 3, 7, 11, 15, 21, 30, 45 e 60 DAA foram realizadas coletas para amostragem dos teores de clorofila a presentes na água, a demanda biológica de oxigênio (DBO) e a demanda química de oxigênio (DQO).

Neste período também foram mensuradas as variáveis de qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica e pH) com uma sonda multiparâmetros YSI 556 MPS da YellowSpring Co©.

A análise estatística dos dados obtidos nos experimentos foi realizada no programa Assisat versão 7.6 Beta (SILVA; AZEVEDO, 2012). As médias obtidas nos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Experimento 1

Os tratamentos foram eficazes no controle da macrófita submersa *Hydrilla verticillata* (Tabela 1). Os menores valores de biomassa fresca ocorreram nos tratamentos diquat e mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre, porém o hidróxido de cobre aplicado isoladamente apresentou um controle intermediário da macrófita, porém satisfatório nas condições deste experimento. Não ocorreu mortalidade de peixes nos tratamentos testados.

Tabela 1. Valores de biomassa fresca (g) e biomassa seca (g) de *Hydrilla verticillata* 60 dias após a aplicação dos tratamentos.

Tratamentos	Biomassa fresca	Biomassa seca
Testemunha	1336,29 a	163,84 a
Hidróxido	212,85 b	25,98 b
Diquat	40,86 c	5,08 b
Mistura	12,79 c	1,65 b
CV	6,40	9,84
DMS	67,05	25,51

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa

Para os valores de biomassa seca todos os tratamentos foram significativos para o controle da macrófita *Hydrilla verticillata*, sem diferença entre os tratamentos (Tabela 1).

Os valores de clorofila *a* (Tabela 2) obtidos neste experimento mostram uma diminuição dos teores de clorofila *a* da água do 3° ao 11° dia após a aplicação dos tratamentos. Neste período, destaca-se a uso do diquat isolado e em mistura com o hidróxido de cobre, com os menores valores de clorofila *a* no período.

Para os teores de clorofila *a* após a aplicação, em 1 DAA estes teores foram similares em todos os tratamentos e na testemunha (Tabela 2). Em 3 DAA, na testemunha o valor médio foi de 1,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$, sendo mantido próximo deste valor até os 60 DAA (Tabela 2). Neste período de avaliação ocorreu diferença significativa entre os tratamentos em relação a testemunha.

Esta tendência também ocorreu em 7, 11 e 15 DAA, entretanto o maior valor ocorreu no tratamento com diquat e o menor valor na mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre (Tabela 2). A partir de 21 DAA não ocorreu diferença nos valores de clorofila *a*.

Tabela 2. Valores de Clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) presentes na água durante o período experimental.

Tratamentos	Dias após a aplicação								
	1	3	7	11	15	21	30	45	60
Testemunha	1,03	1,25 a	1,18 a	1,24 a	1,14 ab	1,25	1,20	1,44	1,27
Hidróxido	1,04	0,53 b	0,56 ab	0,33 b	1,32 ab	1,33	5,35	3,92	2,23
Diquat	1,01	0,58 b	0,24 b	0,45 b	1,43 a	1,77	3,84	2,00	0,87
Mistura	1,08	0,14 b	0,23 b	0,32 b	0,17 b	0,77	2,77	1,86	1,22
CV	1,49	5,69	7,25	9,39	6,36	10,65	9,92	6,13	12,97
DMS	1,59	0,52	0,83	0,76	1,23	1,70	4,30	5,80	4,14

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

Na análise da demanda biológica de oxigênio (BDO), em 1 e 3 DAA esta foi similar em todos os tratamentos (Tabela 3). Em 7 DAA, ocorreu aumento significativo da DBO no tratamento diquat e diquat + 1% de hidróxido de cobre (Tabela 3). Este

comportamento se manteve até 21 DAA, com tendência até 60 DAA (Tabela 3). O aumento da demanda biológica de oxigênio está relacionado ao efeito de controle da *Hydrilla verticillata*, com disponibilização de matéria orgânica na água para degradação.

Tabela 3. Valores da demanda biológica de oxigênio (DBO) em mg.L⁻¹ da água dos microcosmos após a aplicação dos tratamentos.

Tratamentos	Dias após a aplicação								
	1	3	7	11	15	21	30	45	60
Testemunha	1,25	1,50	1,50 b	1,50 c	2,00	1,75 b	1,25	1,50	1,50 b
Hidróxido	1,25	1,75	2,50 b	2,75 bc	3,00	3,25 ab	2,75	2,75	2,50 ab
Diquat	1,50	2,50	4,00 a	4,25 ab	4,00	4,00 a	3,50	3,25	3,00 ab
Mistura	1,50	2,50	4,00 a	4,50 a	4,00	4,25 a	3,50	3,50	3,25 a
CV	9,28	7,10	9,25	14,33	15,53	11,79	6,35	15,6	9,27
DMS	1,13	1,17	1,21	1,66	2,42	1,51	2,67	2,05	1,57

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

A demanda química de oxigênio aumentou a partir de 7 DAA nos três tratamentos testados (Tabela 4), mantendo-se superiora estatisticamente a testemunha até o final do período experimental.

Tabela 4. Valores da demanda química de oxigênio (DQO) em mg.L⁻¹ da água dos microcosmos após a aplicação dos tratamentos.

Tratamentos	Dias após a aplicação								
	1	3	7	11	15	21	30	45	60
Testemunha	5,50	6,50	6,25 b	6,75 b	6,50 c	6,50 b	5,50 b	5,75 b	5,00 b
Hidróxido	5,25	7,75	8,75 a	9,25 a	8,50 bc	8,25 ab	8,00 ab	7,25 ab	7,25 ab
Diquat	5,25	7,75	9,00 a	10,25 a	10,50 ab	9,75 a	10,25 a	9,00 a	8,50 a
Mistura	5,25	7,50	8,75 a	9,75 a	11,25 a	10,25 a	10,50 a	9,00 a	8,75 a
CV	1,22	12,06	13,31	12,42	13,96	13,80	15,36	9,53	15,90
DMS	2,36	1,86	2,28	2,34	2,69	2,51	2,76	3,17	2,46

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

Os tratamentos com diquat e a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre resultaram em maiores valores de DQO (Tabela 4), diferindo estatisticamente da testemunha. Esta tendência manteve-se constante de 7 a 60 DAA.

A aplicação do hidróxido de cobre de forma isolada resultou em valores de DQO superiores estatisticamente aos da testemunha somente em 7 e 11 DAA. Nas demais avaliações não houve diferença estatística entre o tratamento e a testemunha para a demanda química de oxigênio.

4.3.1.1 Variáveis de qualidade da água do experimento 1

A temperatura média da água durante o experimento foi de 21,5 °C no período da manhã (8:00 h) e de 27 °C no período da tarde (18:00 h), demonstrando uma alternância das temperaturas da água dos microcosmos durante os períodos do dia. As temperaturas mais altas no período experimental foram registradas em 60 DAA com valores de 26,2 °C para o período da manhã e 34,4 °C para o período da tarde. As temperaturas médias mais baixas foram observadas em 7 DAA com valores de 15,3 °C no período da manhã e 21,2 °C no período da tarde.

No período da manhã a testemunha apresentou em média 10 mg.L⁻¹ de oxigênio dissolvido, enquanto que os demais tratamentos apresentaram menores teores médios de oxigênio dissolvido (Figura 3). O tratamento com diquat apresentou valores médios de 7,2 mg.L⁻¹, enquanto que para o tratamento com hidróxido de cobre o valor foi de 8,0 mg.L⁻¹. O tratamento com diquat + 1% de hidróxido de cobre apresentou o menor valor de oxigênio dissolvido, 6,5 mg.L⁻¹ (Figura 3).

No terceiro dia após a aplicação houve uma diminuição no teor de oxigênio dissolvido, sendo o menor valor registrado de 3,6 mg.L⁻¹ no tratamento com a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre (Figura 3). No tratamento com Diquat o valor observado foi de 5,6 mg.L⁻¹ e para o hidróxido de cobre 6,9 mg.L⁻¹, enquanto que na testemunha o valor foi de 10,3 mg.L⁻¹. Os valores obtidos nos tratamentos são próximos aos estabelecidos pela resolução n°20 do CONAMA, que considera o valor limite de 5,0 mg L⁻¹.

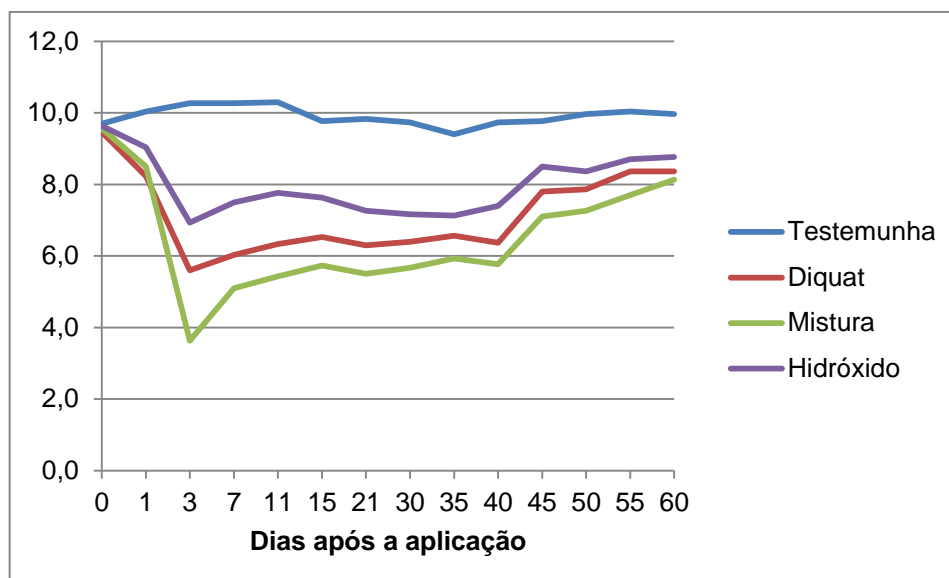


Figura 3. Valores de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) dos tratamentos no período da manhã.

O nível de oxigênio foi sendo restabelecido ao longo dos dias, finalizando aos 60 dias após a aplicação em $8,1 \text{ mg.L}^{-1}$ no tratamento com a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre, $8,4 \text{ mg.L}^{-1}$ no tratamento com diquat e $8,8 \text{ mg.L}^{-1}$ para o hidróxido de cobre. Todos os valores anteriores estão abaixo da testemunha, com $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$.

No período da tarde a testemunha apresentou em média $12,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido (Figura 4), enquanto que os demais tratamentos apresentaram menores teores médios de oxigênio dissolvido. O tratamento com diquat apresentou valores médios de $9,0 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto que para o tratamentos hidróxido de cobre o valor foi de $10,2 \text{ mg.L}^{-1}$. O tratamento de diquat + 1% de hidróxido de cobre apresentou o menor valor de oxigênio dissolvido, $8,2 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 4).

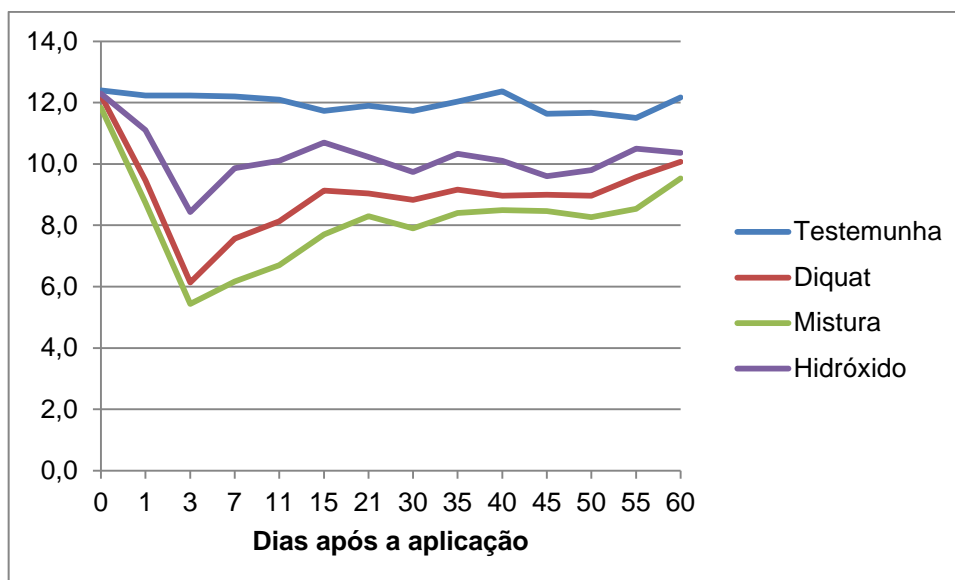


Figura 4. Valores de oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹) dos tratamentos no período da tarde.

No terceiro dia após a aplicação houve uma diminuição no teor de oxigênio dissolvido, sendo o menor valor registrado de 5,4 mg.L⁻¹ no tratamento com a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre. No tratamento com Diquat o valor observado foi de 6,1 mg.L⁻¹ e para o hidróxido de cobre 8,4 mg.L⁻¹, enquanto que na testemunha o valor foi de 12,2 mg.L⁻¹ (Figura 4).

O nível de oxigênio foi sendo restabelecido ao longo dos dias, finalizando aos 60 dias após a aplicação em 9,5 mg.L⁻¹ no tratamento com a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre, 10,1 mg.L⁻¹ no tratamento com diquat e 10,4 mg.L⁻¹ para o hidróxido de cobre. Todos os valores anteriores estão abaixo da testemunha, com 12,2 mg.L⁻¹ (Figura 4). Os maiores valores de oxigênio dissolvido foram registrados no período da tarde.

No período da manhã, o valor médio de condutividade elétrica da testemunha foi de 158,6 $\mu\text{s.cm}^{-1}$ (Figura 5). Todos os demais tratamentos testados causaram a elevação da condutividade elétrica da água dos microcosmos, com destaque para a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre que apresentou os maiores valores médios de condutividade elétrica de 190,5 $\mu\text{s.cm}^{-1}$ durante os 60 dias do experimento (Figura 5).

Os tratamentos com diquat ($171,8 \mu\text{s.cm}^{-1}$) e hidróxido de cobre ($180,4 \mu\text{s.cm}^{-1}$) isolados também apresentaram valores médios de condutividade elétrica superiores aos da testemunha (Figura 5).

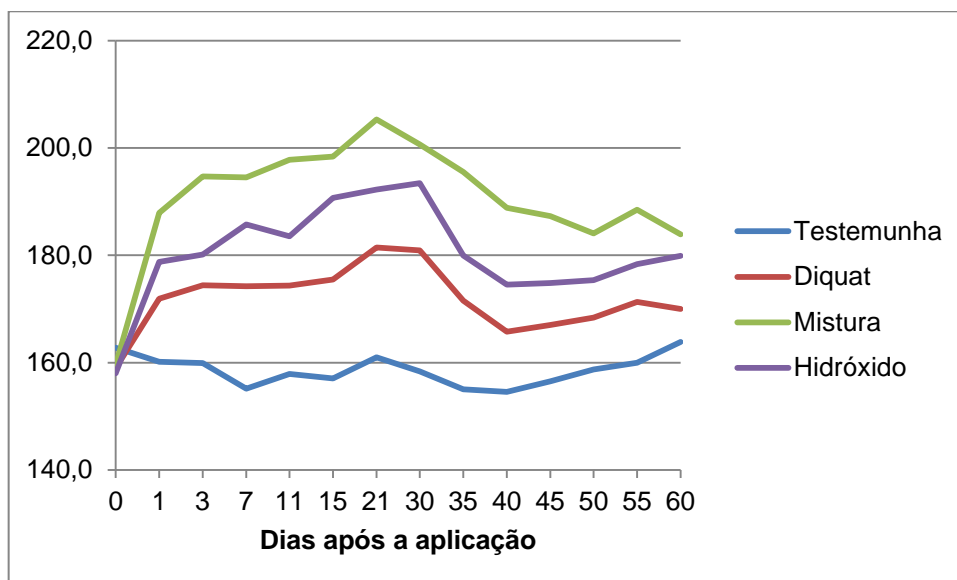


Figura 5. Valores de condutividade elétrica ($\mu\text{s.cm}^{-1}$) dos tratamentos no período da manhã.

No 21º dia após a aplicação dos tratamentos foi registrado o maior valor de condutividade elétrica para o período da manhã, com o valor de $205,3 \mu\text{s.cm}^{-1}$ no tratamento mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre. Todos os tratamentos tiveram seus valores de condutividade elétrica reduzidos nas avaliações da manhã a partir do 30º dia após a aplicação dos tratamentos (Figura 5).

Comportamento semelhante foi observado o período da tarde (Figura 6), onde o valor médio de condutividade elétrica da testemunha foi de $182,8 \mu\text{s.cm}^{-1}$. Todos os demais tratamentos testados causaram a elevação da condutividade elétrica da água dos microcosmos, com destaque para a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre que apresentou os maiores valores médios de condutividade elétrica de $215,9 \mu\text{s.cm}^{-1}$ durante os 60 dias do experimento (Figura 6). Os tratamentos com diquat ($196 \mu\text{s.cm}^{-1}$) e hidróxido de cobre ($206,2 \mu\text{s.cm}^{-1}$) isolados também apresentaram valores médios de condutividade elétrica superiores aos da testemunha (Figura 6).

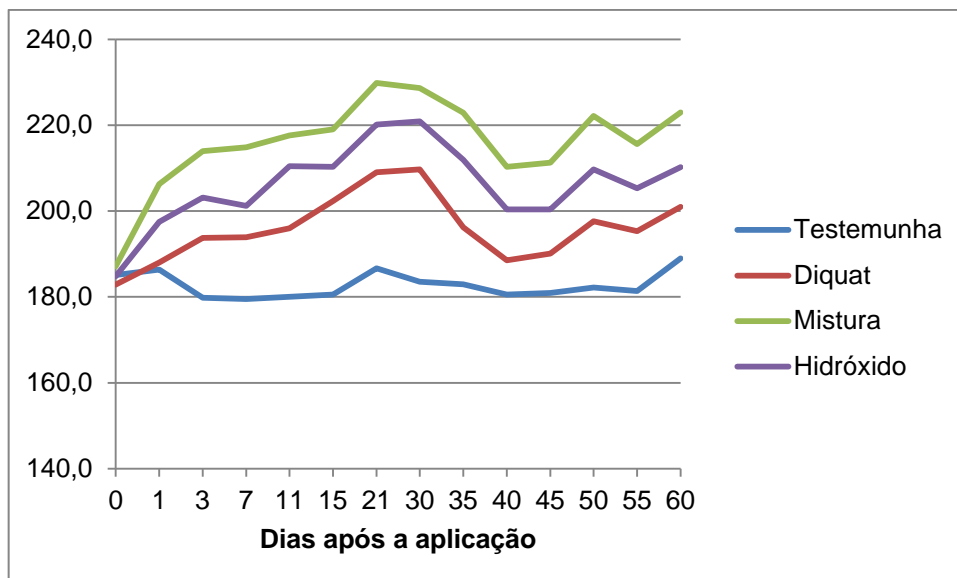


Figura 6. Valores de condutividade elétrica ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) dos tratamentos no período da tarde.

No 21° e 30° dia após a aplicação dos tratamentos foram registrados os maiores valores de condutividade elétrica para o período da tarde, com valores próximos a $230 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ no tratamento mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre (Figura 6).

Quando foram comparados os dois períodos, observou-se que no período da tarde (18:00 h) os valores de condutividade elétrica da água foram superiores aos obtidos no período da manhã (8:00 h).

Após a aplicação dos tratamentos houve uma pequena diminuição no pH da água das parcelas onde ocorreram a aplicação dos tratamentos em relação a testemunha no período da manhã (Figura 7).

Os valores de pH obtidos durante o experimento demonstram uma leve queda nos valores nos três tratamentos testados. No período da manhã os valores de pH variaram de 9 a 10 (Figura 7).

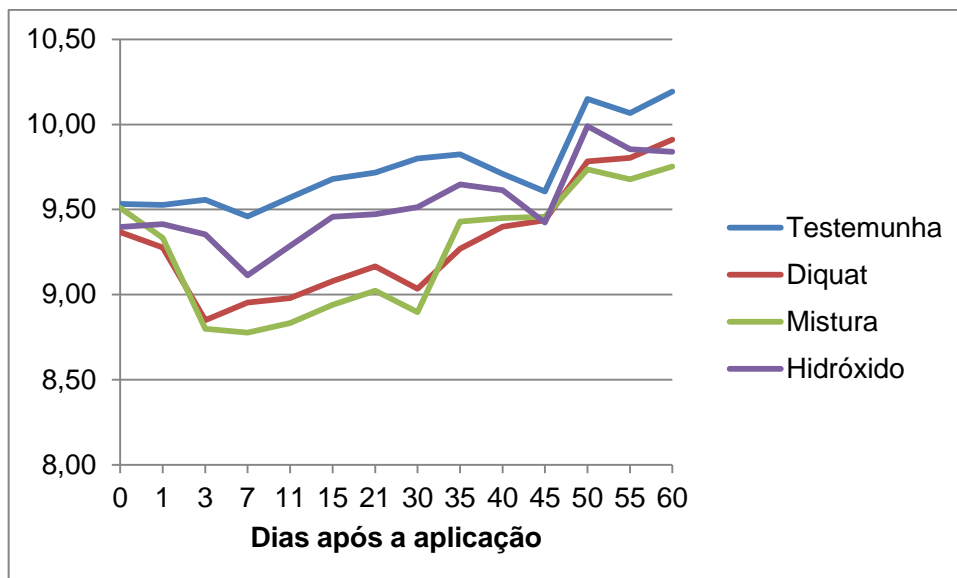


Figura 7. Valores de pH dos tratamentos no período da manhã.

A mesma tendência foi observada para os valores de pH para o período da tarde (Figura 8), com valores de pH variando entre 8,5 a 10,5.

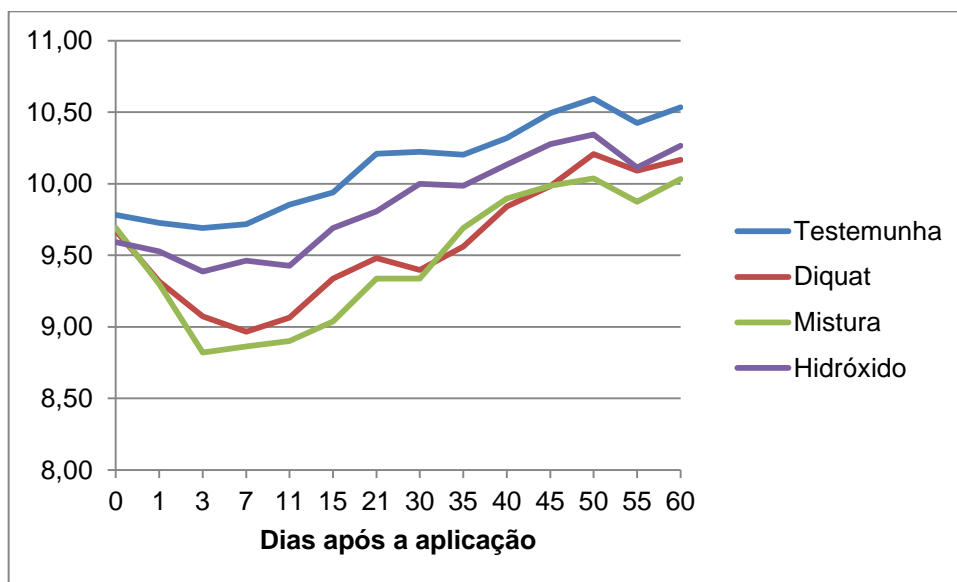


Figura 8. Valores de pH dos tratamentos no período da tarde.

4.3.2 Experimento 2

Para a produção de biomassa fresca, todos os tratamentos apresentaram diferença significativa em relação a testemunha (Tabela 5). Este comportamento também ocorreu para a produção de biomassa seca final aos 60 DAA (Tabela 5). Para o tratamento mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre não houve presença de biomassa fresca na avaliação aos 60 DAA (Tabela 5).

Para a produção de tubérculos, a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre apresentou o menor número médio em relação aos demais tratamentos e a testemunha (Tabela 5), sendo também similar a biomassa seca de tubérculos (Tabela 5). Para a biomassa seca das raízes, a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre apresentou menor valor médio em relação aos demais tratamentos e a testemunha (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de biomassa fresca (g), biomassa seca (g), número de tubérculos, biomassa seca de tubérculos (g) e biomassa seca de raízes (g) de *Hydrilla verticillata* aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos.

Tratamentos	Biomassa fresca	Biomassa seca	Número de tubérculos	Biomassa seca de tubérculos	Biomassa seca de raízes
Testemunha	4766,26 a	488,22 a	506,50 a	56,81 a	229,78 a
Hidróxido	1357,50 b	142,69 b	49,75 b	5,38 b	62,21 b
Diquat	678,75 c	69,87 c	12,25 bc	1,70 b	39,39 bc
Mistura	0,00 d	0,00 c	2,75 c	0,52 b	4,38 c
CV	12,37	19,75	13,33	19,88	22,83
DMS	441,75	72,49	39,98	6,72	40,24

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

Na análise dos bioindicadores de exposição, para a macroalga filamentosa *Pithophora kewensis* ocorreu diminuição significativa no peso final em todos os tratamentos em relação a testemunha (Tabela 6), que apresenta crescimento de oito vezes em relação a biomassa inicial (5 g) introduzida no mesocosmo (Tabela 6) . Não houve diferença estatística entre os três tratamentos aplicados.

Para a biomassa final de *Azolla caroliniana* + *Lemna minor* ocorreu diferença significativa dos tratamentos em relação à testemunha, sendo os menores valores encontrados com a aplicação de diquat e diquat + 1% de hidróxido de cobre (Tabela 6).

Na análise do número de caramujos *Biomphalaria glabrata* que ocorreram espontaneamente nos mesocosmos (Tabela 6) também ocorreu diferença significativa dos tratamentos quando comparados à testemunha. Não houve diferença estatística significativa entre os três tratamentos testados.

Tabela 6. Valores de biomassa fresca (g) de *Pithophora kewensis*, biomassa fresca (g) de *Azolla caroliniana* e *Lemna minor*, número de *Biomphalaria glabrata*, número de adultos e alevinos de *Hyphessobrycon eques* aos 60 dias após a aplicação dos tratamentos.

Tratamentos	<i>Pithophora kewensis</i>	<i>Azolla + Lemna</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>	Peixes Adultos	Peixes Alevinos
Testemunha	41,69 a	145,13 a	68,50 a	10,00	32,75
Hidróxido	2,90 b	104,47 b	34,25 b	8,50	25,00
Diquat	7,56 b	1,57 c	19,50 b	10,00	26,00
Mistura	1,07 b	1,15 c	34,50 b	8,00	22,50
CV	20,45	20,66	37,34	10,49	20,61
DMS	11,30	40,62	30,73	2,01	11,49

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

O peixe *Hyphessobrycon eques* não foi um bom bioindicador da aplicação, pois no tratamento com diquat e na testemunha não ocorreu mortalidade e foi baixa a mortalidade nos demais tratamentos, não havendo diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha (Tabela 6). O número de alevinos de *Hyphessobrycon eques* foi similar em todos os tratamentos ao final do experimento, não havendo diferença significativa (Tabela 6).

Os valores de clorofila *a* na água aumentaram no 3º dia após a aplicação dos tratamentos e se mantiveram superiores a testemunha em todos os tratamentos durante todo o período estudado (Tabela 7).

Tabela 7. Valores de Clorofila *a* ($\mu\text{g.L}^{-1}$) presentes na água durante o período experimental.

Tratamentos	Dias após a aplicação							
	1	3	7	15	21	30	45	60
Testemunha	1,72	1,63 b	1,84 b	1,91 b	1,75 c	1,99 c	2,06 c	2,02 c
Hidróxido	2,39	2,60 a	3,98 a	4,63 a	5,77 b	8,36 b	14,91 b	23,84 b
Diquat	2,48	2,47 a	4,57 a	5,93 a	6,33 b	7,25 b	12,08 b	15,66 b
Mistura	2,20	2,53 a	4,45 a	5,13 a	17,30 a	25,07 a	31,35 a	41,81 a
CV	19,86	5,56	8,21	12,45	7,83	9,35	7,98	18,30
DMS	1,14	0,33	0,79	1,43	1,59	2,60	3,15	9,97

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

Em 3, 7 e 15 DAA houve diferença significativa dos tratamentos em relação à testemunha. Quando comparados os tratamentos com a aplicação de produtos observou-se que não houve diferença significativa entre eles.

A partir do 21º dia após a aplicação, o tratamento com a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre apresentou os maiores valores de clorofila *a* até o término do experimento. Neste mesmo período, os tratamentos com a aplicação isolada de diquat e hidróxido de cobre também foram superiores à testemunha, não havendo diferença estatística entre os dois tratamentos. A morte da planta elevou os teores de clorofila *a* presentes na água dos mesocosmos ao decorrer dos dias do experimento.

Os valores da demanda bioquímica de oxigênio aumentaram a partir do 3º dia após a aplicação de todos os tratamentos, mantendo-se estatisticamente superiores a testemunha até o final do período experimental (Tabela 8).

Os maiores valores de DBO foram observados no 30º dia após a aplicação dos tratamentos, com $7,25 \text{ mg.L}^{-1}$ para o diquat e $7,5 \text{ mg.L}^{-1}$ para a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre (Tabela 8).

Tabela 8. Valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) em mg.L⁻¹ da água dos mesocosmos após a aplicação dos tratamentos.

Tratamentos	Dias após a aplicação								
	1	3	7	11	15	21	30	45	60
Testemunha	2,25	1,75 c	2,25 c	2,50 b	2,00 c	2,25 c	2,00 c	2,75 c	3,00 b
Hidróxido	2,00	2,25 bc	3,50 bc	3,50 b	4,25 b	5,25 b	5,00 b	5,25 b	5,00 a
Diquat	2,75	3,25 a	4,50 ab	5,50 a	7,00 a	7,00 ab	7,25 a	6,75 ab	6,00 a
Mistura	2,50	3,00 ab	5,75 a	6,75 a	7,00 a	7,50 a	7,50 a	7,00 a	6,75 a
CV	19,22	16,90	22,24	15,17	16,87	17,01	12,73	13,27	16,46
DMS	0,95	0,90	1,86	1,45	1,79	1,96	1,45	1,51	1,79

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

Em 11, 15 e 30 DAA os valores obtidos para os tratamentos diquat e mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre demonstram o aumento da DBO (Tabela 8). Os valores da DBO dos dois tratamentos foram estatisticamente superiores aos demais observados. Aos 60 DAA todos os tratamentos apresentaram valores de DBO superiores à testemunha, não havendo diferença entre os tratamentos (Tabela 8).

Os valores de demanda química de oxigênio (DQO) aumentaram após o 7º dia da aplicação dos tratamentos (Tabela 9). Todos os tratamentos apresentaram valores estatisticamente superiores à testemunha nas avaliações realizadas do 7º ao 60º dia após a aplicação.

Nas avaliações realizadas no 21º, 30º, 45º e 60º dia após a aplicação, os tratamentos com diquat e mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre foram superiores ao hidróxido de cobre aplicado de forma isolada e a testemunha (Tabela 9).

Tabela 9. Valores da demanda química de oxigênio (DQO) em mg.L^{-1} da água dos mesocosmos após a aplicação dos tratamentos.

Tratamentos	Dias após a aplicação								
	1	3	7	11	15	21	30	45	60
Testemunha	6,00	6,75	6,75 b	7,00 b	6,75 c	7,50 c	7,75 c	6,00 c	6,50 c
Hidróxido	7,00	8,50	12,00 a	13,25 a	14,00 b	13,25 b	12,75 b	12,25 b	11,0 b
Diquat	6,75	8,00	12,75 a	13,00 a	15,75 ab	16,00 a	15,25 a	14,50 a	14,00 a
Mistura	6,50	8,25	13,25 a	14,25 a	17,25 a	16,75 a	14,75 a	14,25 a	13,75 a
CV	10,55	10,69	9,03	11,78	9,67	6,99	6,05	6,26	8,75
DMS	1,45	1,76	2,12	2,93	2,72	1,96	1,60	1,54	2,07

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV = coeficiente de variação; DMS = diferença mínima significativa.

4.3.2.1 Variáveis de qualidade da água do experimento 2

A temperatura média da água durante o experimento foi de $15,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ no período da manhã (8:00 h) e de $17,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ no período da tarde (18:00 h). As temperaturas mais altas registradas foram de $19,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ no período da manhã e $21,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ no período da tarde (7 DAA). As temperaturas médias mais baixas foram observadas aos 45 DAA, com valores de $13,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ no período da manhã e $15,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ no período da tarde.

No período da manhã a testemunha apresentou em média $9,0\text{ mg.L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido, enquanto que os demais tratamentos apresentaram menores teores médios de oxigênio dissolvido (Figura 9). O tratamento com diquat apresentou valores médios de $6,1\text{ mg.L}^{-1}$, enquanto que para o tratamentos hidróxido de cobre o valor foi de $6,6\text{ mg.L}^{-1}$. O tratamento de diquat + 1% de hidróxido de cobre apresentou $5,8\text{ mg.L}^{-1}$, o menor valor de oxigênio dissolvido para o período estudado (Figura 9).

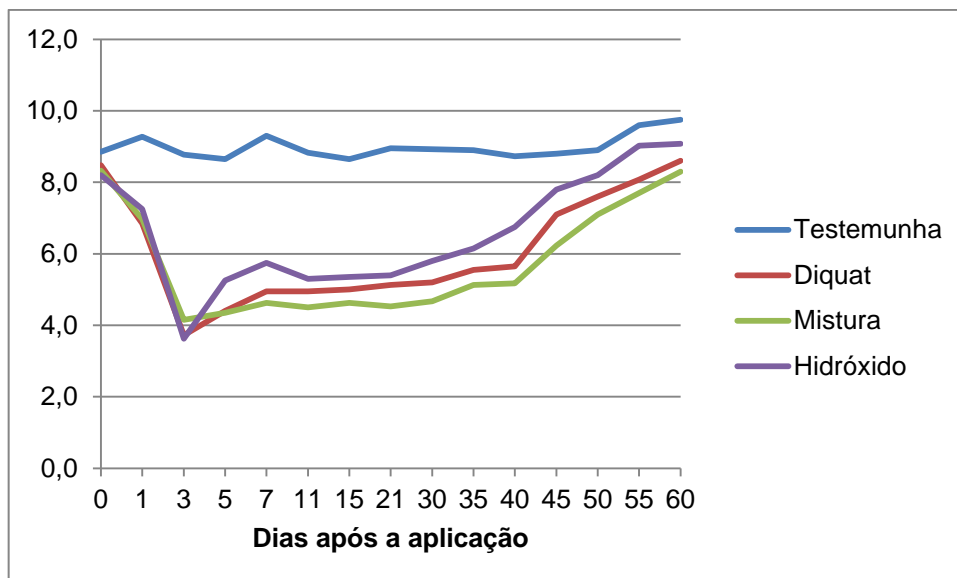


Figura 9. Valores de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) dos tratamentos no período da manhã.

No terceiro dia após a aplicação houve uma diminuição no teor de oxigênio dissolvido, sendo o menor valor registrado de $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$ no tratamento com o hidróxido de cobre. No tratamento com Diquat o valor observado foi de $3,7 \text{ mg.L}^{-1}$ e para mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre o valor de $4,2 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto que na testemunha o valor foi de $8,8 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 9).

Ao longo dos dias do experimento o nível de oxigênio foi sendo restabelecido, finalizando aos 60 dias após a aplicação em $8,3 \text{ mg.L}^{-1}$ no tratamento com a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre, $8,6 \text{ mg.L}^{-1}$ no tratamento com diquat e $9,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para o hidróxido de cobre, todos valores abaixo da testemunha com $9,8 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 9).

No período da tarde a testemunha apresentou em média $10,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido, enquanto que os demais tratamentos apresentaram menores teores médios de oxigênio dissolvido (Figura 10). O tratamento com diquat apresentou valores médios de $6,7 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto que para o tratamentos hidróxido de cobre o valor foi de $7,4 \text{ mg.L}^{-1}$. O tratamento de diquat + 1% de hidróxido de cobre apresentou o menor valor de oxigênio dissolvido, $6,3 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 10).

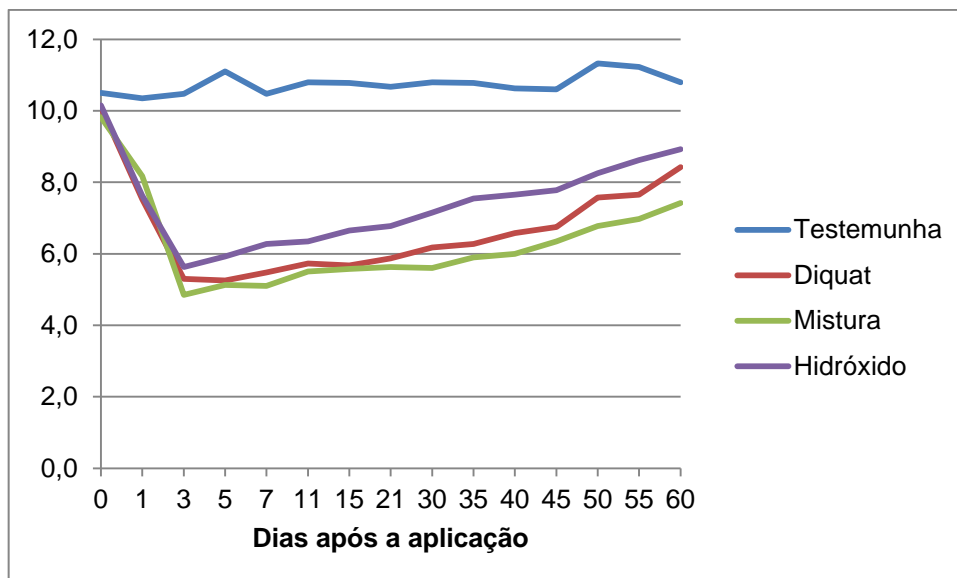


Figura 10. Valores de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}) dos tratamentos no período da tarde.

No terceiro dia após a aplicação houve uma diminuição no teor de oxigênio dissolvido, sendo o menor valor registrado de $4,9 \text{ mg.L}^{-1}$ no tratamento com a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre (Figura 10). No tratamento com diquat o valor observado foi de $5,3 \text{ mg.L}^{-1}$ e para o hidróxido de cobre $5,6 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto que na testemunha o valor foi de $10,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 10).

O nível de oxigênio foi sendo restabelecido ao longo dos dias, finalizando aos 60 dias após a aplicação em $7,4 \text{ mg.L}^{-1}$ no tratamento com a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre, $8,4 \text{ mg.L}^{-1}$ no tratamento com diquat e $8,9 \text{ mg.L}^{-1}$ para o hidróxido de cobre. Todos os valores anteriores estão abaixo da testemunha, com $10,8 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 10). Analisando-se os dois períodos observou-se que os maiores valores de oxigênio dissolvido foram registrados no período da tarde.

No período da manhã, o valor médio de condutividade elétrica da testemunha foi de $150,3 \mu\text{s.cm}^{-1}$ (Figura 11). Todos os demais tratamentos testados causaram a elevação da condutividade elétrica da água dos mesocosmos, com destaque para a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre que apresentou os maiores valores médios de condutividade elétrica de $211,1 \mu\text{s.cm}^{-1}$ durante os 60 dias do experimento (Figura 11).

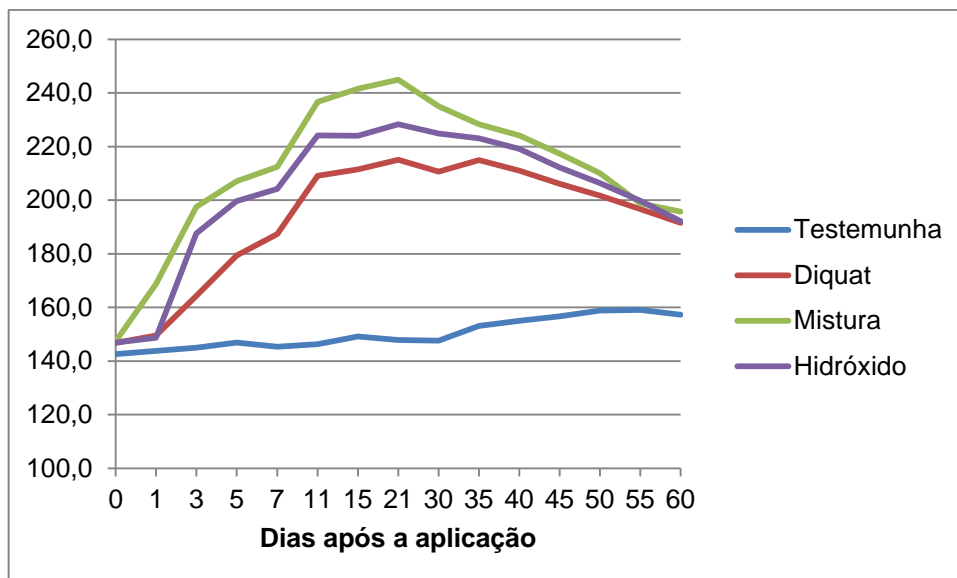


Figura 11. Valores de condutividade elétrica ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) dos tratamentos no período da manhã.

Os tratamentos com diquat ($193 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) e hidróxido de cobre ($202,7 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) isolados também apresentaram valores médios de condutividade elétrica superiores aos da testemunha (Figura 11).

No 15° e 21° dia após a aplicação dos tratamentos foram registrados os maiores valores de condutividade elétrica para o período da manhã, com os valores de $241,6 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ e $245 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ respectivamente para o tratamento com a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre (Figura 11).

Comportamento semelhante foi observado o período da tarde, onde o valor médio de condutividade elétrica da testemunha foi de $151,4 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Figura 12). Todos os demais tratamentos testados causaram a elevação da condutividade elétrica da água dos mesocosmos, com destaque para a mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre que apresentou os maiores valores médios de condutividade elétrica de $212,4 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ durante os 60 dias do experimento. Os tratamentos com diquat ($194 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) e hidróxido de cobre ($201,6 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) isolados também apresentaram valores médios de condutividade elétrica superiores aos da testemunha (Figura 12).

No 15° e 21° dia após a aplicação dos tratamentos foram registrados os maiores valores de condutividade elétrica para o período da tarde, com valores

próximos a $244 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ no tratamento mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre (Figura 12).

Todos os tratamentos tiveram seus valores de condutividade elétrica reduzidos nas avaliações a partir do 30º dia após a aplicação dos tratamentos (Figura 12).

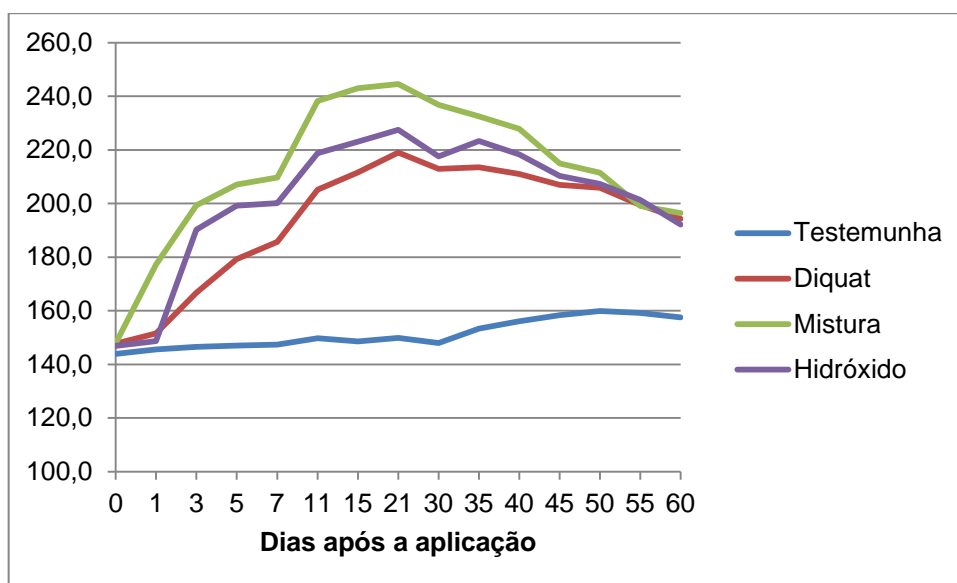


Figura 12. Valores de condutividade elétrica ($\mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$) dos tratamentos no período da tarde.

Comparando-se os dois períodos, observou-se que não houve diferença significativa nos valores de condutividade elétrica da água entre as leituras realizadas no período da manhã (8:00 h) e no período da tarde (18:00 h).

Após a aplicação dos tratamentos houve uma leve diminuição no pH da água das parcelas onde ocorreram a aplicação dos tratamentos em relação a testemunha (Figura 13). O valor de pH da testemunha manteve-se entre 9 e 9,5 durante o período estudado (Figura 13) enquanto os demais tratamentos apresentaram valores de pH inferiores a 9,0

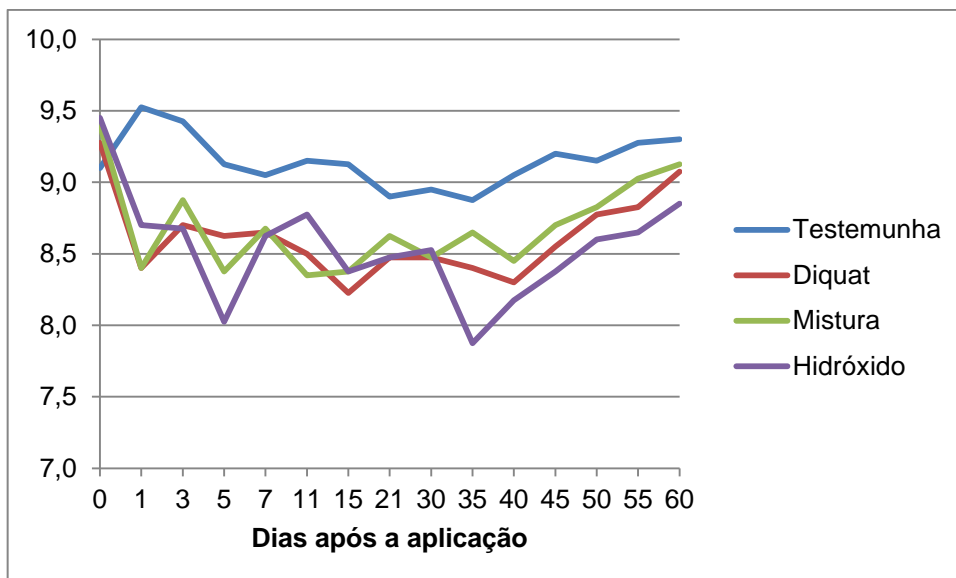


Figura 13. Valores de pH dos tratamentos no período da manhã.

Os valores de pH obtidos durante o experimento demonstram uma leve queda nos valores nos três tratamentos testados. No período da manhã (Figura 13) os valores de pH variaram entre 8 a 9 e no período da tarde entre 9 a 10 (Figura 14).

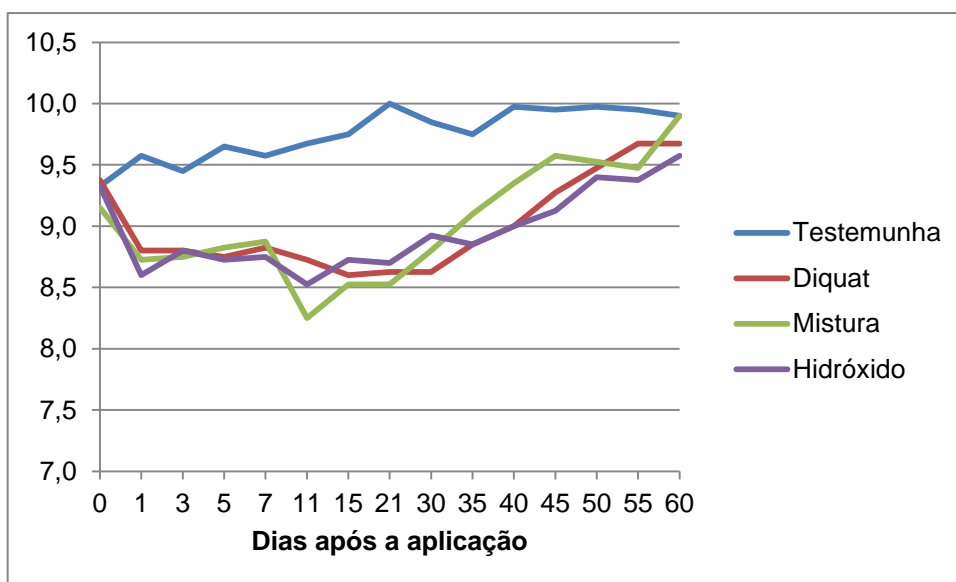


Figura 14. Valores de pH dos tratamentos no período da tarde.

4.4 Conclusões

Todos os tratamentos foram eficazes no controle da macrófita *Hydrilla verticillata* nas condições de microcosmos e mesocosmos, sendo o tratamento mistura de diquat + 1% de hidróxido de cobre o mais eficiente, com alterações nas variáveis da qualidade da água.

4.5 Referências

BRASIL. **Resolução CONAMA nº 20, de 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação de águas doces, salobras e salinas.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p. 11.356, 30 jul. 1986.

CARDOSO, L.R. MARTINS, D. TERRA, M.A. **Sensibilidade a herbicidas de acessos de aguapé coletados em reservatórios do Estado de São Paulo.** Planta Daninha, Viçosa, v. 21, p. 61-67, 2003.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Norma técnica CETESB L5.306. Determinação de pigmentos fotossintetizantes – clorofila A, B e C e feofitina A: método de ensaio.** 22p. 1990.

MARCONDES, D.A.S., VELINI, E.D., MARTINS, D., TANAKA, R.H., CARVALHO, F.T., CAVENAGHI, A.L., BRONHARA, A.A. **Eficiência do fluridone no controle de plantas aquáticas submersas e efeitos sobre algumas características ambientais.** Planta Daninha, v. 20, p. 73-81, 2002.

NEVES, T. FOLONI, L.L. PITELLI, R.A. **Controle químico do aguapé (*Eichhornia crassipes*).** Planta Daninha, v. 20, p. 89-97, 2002.

PITELLI, R.A. MARTINS, D. VELINI, E.D. Interferência e controle de macrófitas aquáticas. In: VARGAS, L. ROMAN, E.R. **Manual de manejo de controle de plantas daninhas**. Passo Fundo, Embrapa, p. 299-328. 2008.

POMPEO, M.L.M. As macrófitas aquáticas em reservatórios tropicais: aspectos ecológicos e propostas de monitoramento e manejo. In: POMPEO, M. L. M (ed). **Perspectivas da Limnologia no Brasil**. São Luís: Gráfica e Editora União, 198p. 1999.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. de. **Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows - ASSISTAT. 7.6 Beta**. (2012).

TANAKA, R.H., VELINI, E.D., MARTINS, D., BRONHARA, A.A., SILVA, M.A.S., CAVENAGHI, A.L., TOMAZELA, M.S. **Avaliação de herbicidas no controle de egéria em laboratório, caixa d'água e represa sem fluxo d'água**. Planta Daninha, v. 20, p. 73-81, 2002.