

**Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área  
Ambiental I – Porção Capixaba do Rio Doce e Região Marinha e  
Costeira Adjacente**

**ACRS1 – MATERIAL SUPLEMENTAR 1  
AMBIENTE COSTEIRO - TEMA RESTINGA**

**RT-42 /JAN 23**

**RSE2022 PMBA/Fest**

Vitória,  
Janeiro de 2023

## **Coordenação TEMA COSTEIRO**

Diolina Moura Silva

## **Equipe Ecofisiologia e Capacidade de Recuperação**

Adriano Nunes-Nesi

Andréa Bittencourt Moura

Marcos Antonio Baccarin

Wagner Luiz Araújo

### **Pós-Doctor**

Auxiliadora Oliveira Martins

Mariela Mattos da Silva

Sabrina Garcia Broetto

Thais Araujo dos Santos Gasparini

Vanessa Nogueira Soares

### **Técnicos**

Gislane Chaves Oliveira

Mariana Machado Rocha

### **Bolsistas**

Gustavo Henrique Alves Silva (IC)

## **Equipe Florística**

Valquíria Ferreira Dutra

### **Pós-Doctor**

Rodrigo Theofilo Valadares

### **Técnicos**

Aline Delon Firmino

### **Bolsistas**

Cleber dos Santos Loureiro da Victória (IC)

Leo Gasparini de Oliveira (IC)

## **Equipe Fitossociologia**

Oberdan José Pereira

### **Técnicos**

Juliana da Silva Penha

## SUMÁRIO

<b>TEMA: RESTINGA .....</b>	<b>6</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR - ACRS1 .....</b>	<b>6</b>
<b>1 METODOLOGIA DE COLETA E ANÁLISE .....</b>	<b>6</b>
1.1 ÁREA DE ESTUDO E FREQUÊNCIA AMOSTRAL .....	6
1.2 DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS E GRANULOMETRIA.....	8
1.2.1 Análises do solo e tecido vegetal .....	8
1.2.2 Análises do particulado depositado sobre folhas (“Spray”).....	8
1.3 ÍNDICE INTEGRADO DE POLUIÇÃO (IPI) .....	9
1.4 FATOR DE BIOACUMULAÇÃO.....	9
1.5 INVENTÁRIO FLORÍSTICO E DA ESTRUTURA DA VEGETAÇÃO DA RESTINGA.....	9
1.6 OBSERVAÇÕES FENOLÓGICAS .....	13
1.7 ANÁLISES FOTOSSINTÉTICAS .....	13
1.7.1 Fluorescência transiente da clorofila <i>a</i> .....	13
1.7.2 Fotossíntese líquida e trocas gasosas.....	14
1.7.3 Pigmentos fotossintéticos.....	14
1.8 METABÓLITOS PRIMÁRIOS.....	14
1.9 SISTEMA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO.....	14
1.10 ANÁLISE DE SITUAÇÃO DE RISCO E ALERTA DE PERIGO.....	15
1.11 CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO DA VEGETAÇÃO .....	17
1.11.1 Microbiota do solo associado à vegetação .....	17
1.11.2 Estudos <i>ex situ</i> de espécies da restinga .....	18
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>19</b>

## LISTA DE FIGURAS

ACRS1 - Figura 1: Estações amostrais do monitoramento da vegetação da Restinga, Anexo 5 do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática Área Ambiental I (PMBA/Fest-RRDM). A nomenclatura das estações amostrais e as respectivas coordenadas geográficas encontram-se descritas no Quadro 1..... 7

ACRS1 - Figura 2: Aspecto geral das formações vegetais nas estações amostrais. A. Formação Herbácea não Inundável. B. Formação Arbustiva Aberta não Inundável. C. Formação Arbustiva Fechada não Inundável. D Formação Florestal não Inundável.....11

## LISTA DE QUADROS

ACRS1 - Quadro 1: Estações amostrais do monitoramento da vegetação da Restinga, Anexo 5. As coordenadas geográficas (latitude e longitude) das nove estações amostrais de coleta estão apresentadas em UTM Sirgas 2000. ....	6
ACRS1 - Quadro 2: Categorias de risco, segundo a metodologia de análise de Situação de Risco apresentada.....	16

## TEMA: RESTINGA

### MATERIAL SUPLEMENTAR - ACRS1

#### 1 METODOLOGIA DE COLETA E ANÁLISE

##### 1.1 ÁREA DE ESTUDO E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

As estações amostrais para o monitoramento da vegetação da Restinga foram determinadas no Termo de Referência 4 (TR4) que rege o TEMA – Restinga (ACRS1 - Quadro 1 e ACRS1 - Figura 1 ). Em janeiro de 2020 foi acrescentada mais uma estação de amostragem (Ofício SEI nº 1/2020-CTBio/DIBIO/ICMBio), sendo está denominada Estação 9 – Mar Azul (E9).

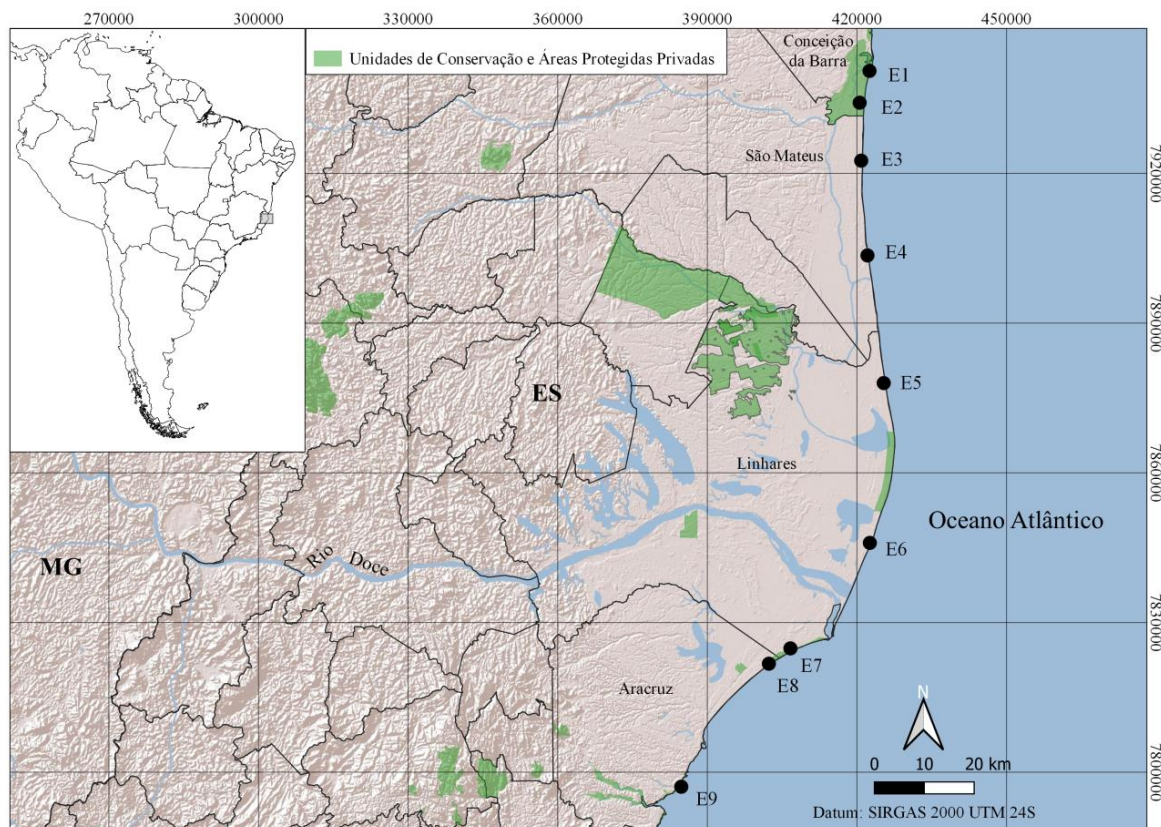
ACRS1 - Quadro 1: Estações amostrais do monitoramento da vegetação da Restinga, Anexo 5. As coordenadas geográficas (latitude e longitude) das nove estações amostrais de coleta estão apresentadas em UTM Sirgas 2000.

Nome da estação	Código	Localidade	Compartimento	Easting	Northing
APA Conceição da Barra	E1	Conceição da Barra	C	422526	7940536
APA Conceição da Barra	E2	Conceição da Barra		420560	7934166
Aldeia do Coco	E3	São Mateus		420873	7922548
Barra Nova	E4	São Mateus		422123	7903558
Pontal do Ipiranga	E5	Linhares		425385	7877966
Cacimbas	E6	Linhares	B	422598	7845937
REBio Comboios	E7	Linhares		406676	7824791
REBio Comboios	E8	Aracruz		402354	7821725
Mar Azul	E9	Aracruz	A	384783	7797055

Considerando a inserção do ecossistema Restinga no Ambiente Costeiro, a área monitorada seguiu a divisão reconhecida pelo Tema Praias de três distintos compartimentos da região compreendida entre os setores dos terraços de abrasão e planície costeira do Rio Doce, principalmente baseados na morfodinâmica da praia (ACRS1 - Quadro 1, ACRS1 - Figura 1). Assim, o Compartimento C abrange as estações amostrais E1 a E5; o compartimento B abrange as estações amostrais E6, E7 e E8, e o Compartimento A restringe-se a estação amostral E9, em Mar Azul, Aracruz.

As campanhas foram realizadas mensalmente de Outubro/2018 a Dezembro/2019, nas oito estações amostrais. Inicialmente foi realizada a delimitação dos polígonos de atividades em cada localidade. A área desses polígonos foi utilizada para a aleatorização dos pontos de amostragem fitossociológica. O método de avaliação da vegetação utilizado em cada estação amostral foi definido de acordo com as características estruturais das comunidades. O método de avaliação da vegetação utilizado em cada estação amostral foi definido de acordo com as características estruturais das comunidades. Paralelamente, foram realizadas coletas para o inventário florístico e avaliações fenológicas usando metodologia usual. A consolidação da identificação das espécies mais comuns e a definição das espécies mais frequentes serviram como indicadores para o critério de escolha das espécies alvo de estudos ecofisiológicos.

ACRS1 - Figura 1: Estações amostrais do monitoramento da vegetação da Restinga, Anexo 5 do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática Área Ambiental I (PMBA/Fest-RRDM). A nomenclatura das estações amostrais e as respectivas coordenadas geográficas encontram-se descritas no Quadro 1.



Inicialmente foram realizadas coletas para o inventário florístico e observações fenológicas (floração e frutificação), após identificação e definição das espécies a serem avaliadas, as análises fotossintéticas tiveram início (Janeiro de 2019). Em Janeiro/2020 uma nova estação amostral foi incluída (Estação 9) no litoral de Aracruz. Nesta localidade (Mar Azul), não houve avaliação fitossociológica uma vez ser esta caracterizada por estar situada em uma região com predomínio de enseadas abrigadas e intercaladas por falésias. A área amostral é caracterizada por conter fitofisionomia herbácea inconspícua, sob frequente abrasamento das ondas. A fitofisionomia arbustiva é fechada e, algumas vezes, tão estreita que pode ser confundida com a fitofisionomia arbórea. Assim, as características peculiares desta estação, principalmente o fraco desenvolvimento da fitofisionomia herbácea, impediram comparações de sua estrutura de comunidades com as outras estações amostrais, sendo realizados somente o inventário florístico e as análises ecofisiológicas.

Os resultados aqui apresentados foram agrupados em cinco intervalos: Outubro de 2018 a Março de 2019 - Período Chuvoso Ano 1; Abril a Setembro de 2019 - Período Seco Ano 1; Outubro de 2019 a Março de 2020 - Período Chuvoso Ano 2, Abril a Setembro de 2021 – Período Chuvoso Ano 3 e Outubro de 2021 a Março de 2022 – Período Chuvoso Ano 4.

As análises ecofisiológicas (campo e laboratoriais) foram realizadas em oito ou nove estações amostrais, três formações (herbáceas, arbustiva e arbórea) e, devido a dificuldades de acesso em



algumas das formações, o número de espécies amostradas variou de duas a cinco. Estatisticamente, são apresentados neste relatório, os resultados de duas espécies por formação: *Ipomoea imperati* e *Canavalia rosea* (herbáceas), *Allagoptera arenaria* e *Guapira pernambucensis* (arbustivas) e *Protium heptaphyllum* e *Manilkara salzmannii* (arbóreas).

Vale ressaltar que a pandemia encontrou a equipe em campo (dia 17/03/2020) faltando as estações amostrais E5 e E6. Este fato paralisou a coleta de dados dessas estações e consequentemente as análises posteriores, que aos poucos, a partir de maio/20, foram retomadas.

## 1.2 DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS E GRANULOMETRIA

### 1.2.1 Análises do solo e tecido vegetal

Amostras de solo coletadas semestralmente foram retiradas em 10 pontos das parcelas de cada formação vegetal (herbácea, arbustiva e arbórea) em proximidade às plantas avaliadas, sendo os primeiros 20 cm amostrados com trado coletor. Para a análise das plantas, folhas completamente expandidas foram coletadas e secas em estufa a 60 °C por 72 h ou até peso constante. A quantificação analítica foi realizada pelos laboratórios: (1) Laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo (LEA/UFES) para análise de elementos químicos por decomposição pseudo-total (USEPA 3051A, 2007), e (2) ao Laboratório de Análises do Solo, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (DPS/UFV), para análise de nutrientes biodisponíveis (Fe, Mn, Cu e Zn por extrator de Mehlich-1) e granulometria no sedimento (RAIJ et al., 2001) e no tecido vegetal (SARRUGE e HAAG, 1974). A caracterização do solo das áreas costeiras de Restinga monitoradas pelo PMBA/Fest-RRDM se baseou na análise das concentrações dos elementos químicos Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, V e Zn. Dentre eles, os níveis de elementos totais presentes no solo (USEPA 3051, 1994) apresentados no Estudo de Impacto Ambiental do Terminal Portuário de Uso Múltiplo da Nutripetro – EIA-Nutripetro, realizado em 2013 (PSG, 2013), foram usados como principal fonte de referência.

### 1.2.2 Análises do particulado depositado sobre folhas (“Spray”)

Folhas das espécies selecionadas nas três formações vegetais foram lavadas com 50 mL de água ultrapura e o líquido recolhido em tubos falcon 50 mL, às quais foram adicionadas HNO<sub>3</sub> (concentração final 2%) e as mesmas armazenadas até seu envio ao Laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo (LEA/UFES) para quantificação da fração total de elementos químicos (USEPA 3030, 2004).



### 1.3 ÍNDICE INTEGRADO DE POLUIÇÃO (IPI)

Para acessar os níveis de contaminação dos elementos minerais presentes no sedimento da restinga avaliado neste monitoramento foi calculado o Índice integrado de poluição (IPI) que deriva do índice de poluição utilizado para diagnóstico de solos (WEI e YANG, 2010). O cálculo do PI é a razão entre a concentração de um elemento e a concentração do elemento segundo uma referência. A partir daí, o IPI é obtido pela média dos PIs de todos os elementos avaliados sendo possível, dessa maneira, classificar o solo do ambiente em quatro níveis distintos de poluição: baixo ( $IPI \leq 1$ ), médio ( $1 < IPI \leq 2$ ), alto ( $2 < IPI \leq 5$ ) e extremamente alto ( $IPI > 5$ ).

Para a análise do IPI os dados foram avaliados utilizando-se valores norteadores preconizados no (1) Estudo de Impacto Ambiental do Terminal Portuário de Uso Múltiplo da Nutripetro - EIA-Nutripetro - realizado em 2013 (PSG, 2013); (2) os valores de referência de qualidade (VRQ) descritos por Paye et al., (2010) para solos do ES típicos de restinga e (3) as concentrações de minerais presentes na crosta terrestre em porções rochosas sedimentares do tipo arenito, como reportado por Turekian e Wedepohl (1961), estrutura característica do solo da restinga deste monitoramento. Os resultados foram expressos em mapas temáticos com colorações referentes aos intervalos de classificação de poluição definidos.

### 1.4 FATOR DE BIOACUMULAÇÃO

Para determinar a relação entre a concentração individual de elementos no sedimento e nas plantas selecionadas, o fator de bioacumulação (BAF- *Bioaccumulation Factor*) foi usado seguindo a fórmula proposta por Usman et al. (2012):

$$BAF = \frac{C_{folha}}{C_{sedimento}}$$

Onde:  $C_{folha}$  é a concentração do metal na folha em  $\mu\text{g/g}$  e  $C_{sedimento}$  é a concentração do referido metal no sedimento ( $\mu\text{g/g}$ ).

### 1.5 INVENTÁRIO FLORÍSTICO E DA ESTRUTURA DA VEGETAÇÃO DA RESTINGA

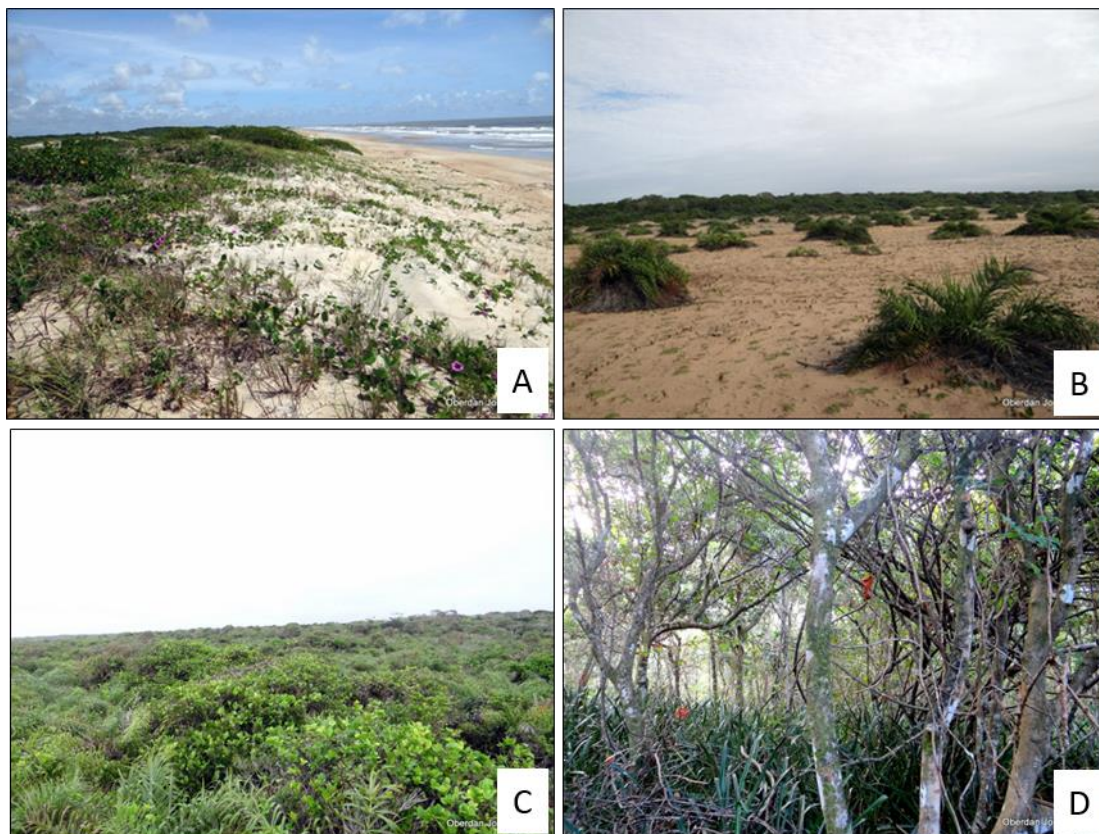
O monitoramento foi realizado nas nove estações amostrais (ACRS1 - Quadro 1, ACRS1 - Figura 1). Na estação amostral 9 (E9) a restinga é pouco desenvolvida e sob influência da aproximação da Formação Barreiras junto à costa. Esse fraco desenvolvimento da restinga e a influência da maré alcançando a tipologia arbustiva extremamente fechada impossibilitou a análises fitossociológicas. Assim, na Estação 9, foram apresentados os resultados do inventário florístico e das análises ecofisiológicas.

Em cada uma das Estações Amostrais, o inventário florístico foi realizado por meio de caminhamento aleatório, nas áreas das linhas e parcelas, marcadas em formação herbácea (halófila-psamófila, (ACRS1 - Figura 2A), arbustiva (aberta não inundável, ACRS1 - Figura 2B, ou fechada não inundável, ACRS1 - Figura 2C) e arbórea (formação florestal, ACRS1 - Figura 2D) e fora delas. Espécimes férteis observados foram coletados, de um indivíduo por espécie, em cada fitofisionomia, em todas as áreas, durante 12 meses (outubro/2018 a setembro/2019). Nos meses seguintes, as coletas se restringiram às espécies ainda não amostradas ou à complementação de material botânico de espécies já coletadas. Para cada espécime, foram coletados, sempre que possível, cinco ramos férteis (com folhas, flores e/ou frutos). Além disso, foram compiladas informações sobre a planta, como o hábitat, os estádios de floração e de frutificação e outras observações ecológicas ou morfológicas pertinentes. Foram anotadas as coordenadas geográficas, com o auxílio de um GPS, e realizada a documentação fotográfica.

Para a análise fitossociológica, na formação herbácea para acompanhar a dinâmica da vegetação no espaço e tempo. Nessa formação, utilizou-se o método de parcelas alternadas de Mueller-Dombois e Ellenberg (1974), consistindo em parcelas de 1 m<sup>2</sup>, lançadas ao longo de uma linha perpendicular ao mar, obedecendo a alternância de lados e intervalos de 1 m. Em cada área foram estabelecidas dez linhas distanciadas entre si em 50 metros. Em cada parcela foram estimados visualmente os percentuais de área nua (AN) e área com cobertura vegetal (CV) das espécies encontradas de acordo com Brower e Zar (1977). Os comprimentos dos transectos variaram conforme a distância entre o primeiro vestígio de vegetação e a transição com outro tipo de vegetação.

No levantamento da estrutura da vegetação na formação arbustiva foi utilizado o método de intercepto de linha (MUELLER-DOMBOIS e ELLENBERG 1974). Foram demarcadas sete linhas (orientadas por bússola) por toda extensão da vegetação, no sentido mar – continente, com uma distância de 50 m entre elas. A extensão da linha variou de acordo com a largura da faixa de vegetação analisada. Os indivíduos lenhosos e herbáceos com altura igual ou superior a 50 cm que interceptaram as linhas foram incluídos na amostragem. Para cada indivíduo foram tomadas: a extensão do indivíduo interceptado pela projeção da linha e sua altura. Lianas e herbáceas menores que 50 cm foram anotadas apenas a sua presença.

ACRS1 - Figura 2: Aspecto geral das formações vegetais nas estações amostrais. A. Formação Herbácea não Inundável. B. Formação Arbustiva Aberta não Inundável. C. Formação Arbustiva Fechada não Inundável. D Formação Florestal não Inundável.



A estrutura da vegetação na formação arbórea foi avaliada segundo metodologia sugerida por Gentry (1991), sumarizado por Phillips e Miller (2002) e enquadrado no Programa de Amostragem Rápida (HIGGINS e RUOKOLAINEN 2004). Tal metodologia é considerada eficiente para a estimativa da diversidade, pois inclui plantas jovens, árvores, arbustos, trepadeiras e hemiepífitas que geralmente não são amostrados em parcelas de árvores (CLINEBELL et al. 1995). A amostragem foi realizada ao longo de três transectos de 2 x 50 m, totalizando 0,03 ha, estabelecidos perpendicularmente a uma linha base, distantes 50 m entre si, e 50 m da borda da floresta, para minimizar o efeito de borda e evitar a sobreposição de áreas amostradas. A amostragem foi realizada em duas faixas de 1 m ao longo de cada linha mestra (50m) orientada com bússola. Nos transectos foram incluídos todos os indivíduos com DAP (Diâmetro à Altura do Peito) igual ou superior a 2,54 cm. A altura de cada indivíduo foi estimada visualmente, tomada com o auxílio de uma tesoura de alto poda (10m), sempre pelo mesmo membro da equipe. Os indivíduos mortos também foram amostrados. Os indivíduos perfilhados acima do solo e abaixo da altura do peito (1,30 m) foram incluídos quando um dos seus ramos obedecia ao critério de inclusão, sendo anotado o CAP (Circunferência à Altura do Peito) de todas as ramificações para o cálculo da área basal.

Para as três formações, foram calculados os parâmetros de frequência absoluta (FA), frequência relativa (FR), dominância absoluta (DoA), dominância relativa (DoR) e valor de importância (VI) de cada espécie encontrada (BROWER e ZAR, 1984). Os índices de Densidade Linear e Cobertura Linear são

resultantes do número de indivíduos amostrados (N) e intercepto total (L), respectivamente, divididos pelo tamanho da amostragem (1000 m), sendo seus valores proporcionais e, portanto, desnecessários e suprimidos. O parâmetro de Frequência Absoluta (FA) está relacionado à porcentagem de ocorrência da espécie na unidade amostral e o Valor de Importância (VI) é resultante da somatória dos valores relativos de Frequência Relativa e Dominância Relativa para a formação herbácea e Densidade Linear, Cobertura Linear e Frequência para a formação arbustiva e florestal.

Para análise de similaridade utilizou-se o Índice de Similaridade de Jaccard, em que as interpretações se deram pela média de grupo. Essa análise foi realizada pelo programa PAST ver. 2.17. Assumiu-se que o índice de similaridade de Jaccard indica alta similaridade quando acima de 0,50 (MIRANDA e CARVALHO, 2009). Com o objetivo de classificar as espécies vegetais no que se refere a forma de vida, foi adotado o critério de classificação quanto à forma de vida apresentado por Müller-Bombois e Ellenberg (1974).

Após a coleta, os espécimes, devidamente numerados, foram colocados em sacos de polietileno transparente, e posteriormente preparados para prensagem. A prensagem foi realizada ao final do dia, acondicionando as amostras em folhas de jornal, que foram dispostas entre folhas de papelão corrugado e alumínio corrugado e, posteriormente amarradas com a corda entre os dois lados da prensa de madeira (FIDALGO e BONONI, 1989). Frutos de grandes dimensões foram acondicionados em sacos de papel. As prensas montadas e os sacos contendo os frutos foram colocados para secagem em estufa de lâmpada, por aproximadamente cinco dias. Após secagem, o material foi encerrado em sacos plásticos e levados ao freezer para descontaminação, por sete dias. Após a descontaminação, as exsicatas foram montadas e depositadas no Herbário VIES (CCHN/UFES) e no Herbário SAMES (CEUNES/UFES). Duplicatas foram enviadas aos Herbários RB, do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, e VIC, da Universidade Federal de Viçosa.

A identificação das espécies foi realizada por meio de chaves analíticas, diagnoses, descrições, ilustrações presentes na literatura, tipos nomenclaturais e consulta às coleções depositadas no Herbário CVRD, SAMES, VIES e VIC e nos herbários virtuais REFLORE e INCT. Quando necessário, especialistas foram consultados para confirmação da identidade de espécimes. Todas as exsicatas foram digitalizadas e encontram-se disponibilizadas ao público em geral nos herbários virtuais REFLORE e INCT ou podem ser consultadas pelo site do Herbário VIES (<http://herbario.ufes.br/consulta-ao-acervo>) e SAMES (<http://sames.jbrj.gov.br/v2/consulta.php>). A lista de espécies inventariadas está apresentada de acordo com a classificação do APG IV (2016), e apresenta informações sobre endemismo e raridade, de acordo com literatura específica (FLORA DO BRASIL 2020, em construção; GIULIETTI et al., 2009; DUTRA et al., 2015); e estado de ameaça, de acordo com o Livro Vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI e MORAES, 2013), a lista das Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção no Estado do Espírito Santo (SIMONELLI e FRAGA, 2007) e a Lista Revisada das Espécies Ameaçadas do Espírito Santo (FRAGA et al., 2019). Espécies exóticas, naturalizadas e potencialmente invasoras seguiram o conceito de Moro et al. (2012) e foram identificadas conforme literatura usual (I3N, 2020).



## 1.6 OBSERVAÇÕES FENOLÓGICAS

Os dados coletados durante o Ano 1 permitiram definir a sazonalidade de desenvolvimento da vegetação, mesmo sob efeito de condições climáticas durante anos superúmidos (2018-2019). Assim, a coleta de dados fenológicos foi realizada mensalmente. Foram marcados cinco indivíduos de espécies previamente definidas como as mais importantes pelo estudo fitossociológico, também avaliadas nos estudos ecofisiológicos. Observações complementares em indivíduos não marcados foram realizadas em cada comunidade, para melhorar a interpretação dos dados e capturar efeitos isolados (e.g. fitossanidade).

Foram tomados dados fenológicos vegetativos e reprodutivos avaliados sob critérios coerentes com a bibliografia (MORELLATO et al., 1989). Assim, o período de (i) brotamento foi definido como aquele que se iniciava com o aparecimento de pequenas folhas membráceas, brilhantes e com coloração verde clara, alaranjada, amarelada ou avermelhada. A (ii) caducifolia foi definida como o período com queda de folhas perceptível pela presença de ramos nus ou copas parcialmente falhadas, folhas com coloração amarronzada e enroladas e finalmente, a presença de folhas da espécie acumuladas sob a árvore. A floração foi definida como aquele em que as flores estavam com botões ou abertas (antese). O período de frutificação foi definido como aquele em que os frutos estavam totalmente formados, maduros e prontos para a dispersão. Estes critérios de avaliação são coerentes com o escopo do programa e permitem comparações entre áreas contidas no “hotspot” e àquelas situadas acima de Degredo – Linhares.

Foram definidas as síndromes de dispersão da maioria das espécies amostradas no estudo. Usando os critérios definidos por Kuhlmann e Ribeiro (2016a, 2016b) e Peres e Fagg (2011) foi possível classificar mais de 90% das espécies amostradas.

## 1.7 ANÁLISES FOTOSSINTÉTICAS

### 1.7.1 Fluorescência transiente da clorofila *a*

As espécies selecionadas para análises ecofisiológicas foram monitoradas mensalmente *in situ* quanto aos seus aspectos fotossintéticos nas primeiras horas da manhã (entre 7 e 11 horas, horário solar) por meio de análises da fluorescência transiente da clorofila *a* em folhas jovens totalmente expandidas, utilizando-se um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hansatech Instruments®, King's Lynn, Norfolk, UK). Os sinais de fluorescência foram registrados a cada 10  $\mu$ s durante 1 s de iluminação (3000  $\mu$ mol fótons  $m^{-2} s^{-1}$ ), seguindo orientações de Strasser e Strasser (1995) e Strasser et al. (2000; 2004).

### 1.7.2 Fotossíntese líquida e trocas gasosas

Para as análises de assimilação fotossintética, os parâmetros de trocas gasosas foram obtidos nas mesmas folhas utilizadas para medições de fluorescência, sendo submetidas à radiação fotossinteticamente ativa artificial saturante ( $1.300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), e em concentração de  $\text{CO}_2$  ambiente, por meio de um analisador portátil de gás a infravermelho (IRGA, modelo LCPro T System, ADC BioScientific Ltd., England). A taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a taxa de transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) foram estimadas pelo equipamento e utilizadas para calcular a razão  $A/g_s$ .

### 1.7.3 Pigmentos fotossintéticos

As mesmas folhas usadas na determinação de fluorescência da clorofila e trocas gasosas foram coletadas logo após as medidas, congeladas em nitrogênio líquido e levadas ao laboratório, onde foram armazenadas à  $-80^\circ\text{C}$  para análises bioquímicas futuras.

Parte do material vegetal foi liofilizado e 10 mg foram macerados e extraídos em metanol, água e clorofórmio, conforme previamente descrito (LISEC et al., 2006). Os teores de pigmentos foram determinados nos extratos, conforme previamente descrito (WELLBURN, 1994).

## 1.8 METABÓLITOS PRIMÁRIOS

Após determinação de pigmentos, ainda na fração solúvel em metanol, foram quantificados os teores de glicose, frutose e sacarose (FERNIE et al., 2001), aminoácidos totais (YEMN e COCKING, 1955), prolina (CARILLO e GIBON, 2011) e malato (NUNES-NESI et al., 2007). Já na fração insolúvel, foram determinados os conteúdos de amido (FERNIE et al., 2001) e de proteínas solúveis (BRADFORD, 1976).

## 1.9 SISTEMA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO

Para análise de enzimas do sistema antioxidante foi utilizada metodologia descrita por Lima et al., (2002) e Pinheiro et al., (2004), com modificações. Amostras de folha de espécies selecionadas em cada formação da restinga foram homogeneizadas em um meio de extração gelado contendo tampão fosfato de potássio, EDTA, DTT, ácido ascórbico e PVPP. Para o indicador SOD, a medida da atividade total da dismutase do superóxido (SOD; EC 1.15.1.1), corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do corante azul de nitro-tetrazólio a 560 nm, sendo expressa em  $\text{U min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$ .

A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi estimada pela medição da taxa de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 240 nm, sendo que cada U corresponde a  $1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$  para a CAT, enquanto a

atividade total da peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) foi determinada pelo declínio da absorvância a 290 nm, e cada U representa à oxidação de 1  $\mu\text{mol}$  ascorbato  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  MF. E finalmente, a atividade da redutase da glutatona (GR; EC 1.8.1.7) foi estimada pela determinação da taxa de oxidação do NADPH a 340 nm, sendo 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  MF equivalente a 1 U.

Os teores de ascorbato e dehidroascorbato foram determinados conforme previamente descrito por Kampfenkel et al., (1995).

Para a análise de danos oxidativo foi utilizado o método de quantificação de aldeído malônico (Malondialdeído - MDA) via substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Cakmak e Host et al., (1991) e Lima et al., (2002), com modificações.

## 1.10 ANÁLISE DE SITUAÇÃO DE RISCO E ALERTA DE PERIGO

A determinação do nível de contaminação do ambiente frente a presença de metais no solo foi calculada com base no que já foi proposto para outros índices ecológicos citados na literatura, tais como o índice de geoacumulação (Igeo) (RAHMAN et al., 2012), o índice de risco ecológico potencial (RI) (HAKANSON, 1980), o índice de poluição (PI) (WEI e YANG 2010), o fator de enriquecimento (EF) (SAKAN et al., 2009) e o índice de resposta integrada do biomarcador (IBR) (BELIAEFF e BURGEOT, 2002; SANCHEZ et al., 2013). Estes índices estão relacionados às concentrações dos elementos ou à resposta de indicadores e têm como base valores de referência de regiões não impactadas, de dados pretéritos ou mesmo de valores preconizados por órgãos de controle ambiental. Além disso, estes índices categorizam os resultados dentro de classes que indicam a magnitude do impacto nas áreas analisadas. Desse modo, embasados nessas premissas, foram gerados dois índices denominados Situação de Risco e Alerta de Perigo.

O cálculo da SITUAÇÃO DE RISCO foi realizado baseando-se em uma comparação espaço-temporal que levou em consideração a estação amostral e os períodos de coleta de dados. Em virtude da ausência de informações pretéritas robustas que pudessem ser utilizadas como comparativo das concentrações de metais no ambiente, ou de índices que não se utilizem de pontos “controle” para seu cálculo, o índice “Situação de risco” determina a variação intrínseca de cada parâmetro correspondente aos períodos de avaliação.

Primeiramente os parâmetros foram submetidos ao cálculo da SITUAÇÃO DE RISCO como descrito na sequência abaixo:

$$(1) \frac{V_{max} - V_{min}}{3} = X$$

Sendo:

$V_{max}$  = valor máximo do parâmetro;  
 $V_{min}$  = valor mínimo do parâmetro  
 $X$  = terça parte da variação de valores.



O valor de  $X$  foi então usado para o cálculo das equações 2, 3 e 4, obtendo-se os intervalos  $y_1$ ,  $y_2$  e  $y_3$ :

$$(2) y_1 = V_{min} + X$$

$$(3) y_2 = y_1 + X$$

$$(4) y_3 = y_2 + X$$

Onde se assume que:  $y_1$ ,  $y_2$ , e  $y_3$  representam os limites máximos para três categorias de risco (ACRS1 - Quadro 1).

ACRS1 - Quadro 2: Categorias de risco, segundo a metodologia de análise de Situação de Risco apresentada.

Equação	Categoria
$V_{min} \leq V \leq y_1$	A
$y_1 < V \leq y_2$	B
$y_2 < V \leq y_3$	C

Sendo,  $V$  o valor do parâmetro em uma dada estação e fisionomia.

Para cada indicador biótico foram determinadas três categorias de Situação de Risco: Alto, Moderado e Baixo. A classificação de cada indicador baseou-se no efeito biológico da presença do metal.

A determinação prévia das categorias (A, B e C) se baseia em condições fisiológicas específicas e nas interpretações matemáticas do parâmetro (correlação e análise de componentes principais - PCA) obtidas anteriormente. Nos casos em que é sabido que valores elevados do parâmetro são fisiologicamente bons e valores baixos são um indicativo de estresse ou ineficiência do sistema, diz-se que o parâmetro é inversamente proporcional aos teores de metais. Portanto, a categoria A, que possui os valores mais baixos, é considerada de alto risco, B de risco moderado e C de baixo risco.

Inversamente, os parâmetros nos quais a relação com o aumento de metais é diretamente proporcional, ou seja, com valores elevados do parâmetro, a categoria C é a de Situação de alto risco, B de Situação de risco moderado e A de Situação de baixo risco. Esta avaliação, baseada na proporcionalidade do efeito biológico com a concentração de metais, acompanha o mesmo raciocínio proposto por Beliaeff e Burgeot (2002) nas proposições acerca do cálculo do índice de resposta integrada do biomarcador (IBR), que utiliza regiões não impactadas como controle.

O ALERTA DE PERIGO é um índice arbitrário obtido a partir da integração dos dados resultantes da situação de Risco dos Indicadores. É determinado a partir do cálculo da frequência com que os indicadores encontram-se em situação de risco em uma determinada estação e formação. Quando mais de 50% dos indicadores se encontra em alto risco em um determinado ponto de coleta, assume-se que aquele ponto esteja em perigo, como pode ser representado a seguir:

Dessa forma, se em uma estação/formação:

$\frac{\text{n}^\circ \text{ de indicadores em Situação de risco ALTO}}{\text{número de indicadores}} * 100 \geq 50\%$ , há um Alerta de Perigo local.

## 1.11 CAPACIDADE DE RECUPERAÇÃO DA VEGETAÇÃO

A fim de avaliar a Capacidade do Ecossistema Restinga em se recuperar após os possíveis impactos ocasionados pela contaminação, resultado do Rompimento da Barragem de Mariana, diferentes aspectos relacionados a parâmetros reprodutivos e de sobrevivência foram avaliados:

### 1.11.1 Microbiota do solo associado à vegetação

Para Microbiota produtora de sideróforos, amostras de sedimento contendo raízes das espécies selecionadas das três formações vegetais foram coletadas, identificadas, refrigeradas e transportadas para o Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Após o recebimento, as amostras foram pesadas e classificadas quanto à sua composição. Para o isolamento de bactérias presentes no solo, na rizosfera e endofíticos foi utilizada a metodologia proposta por Romeiro (2007). As unidades formadoras de colônias (UFC) formadas na superfície das placas de isolamento foram contadas 72 h após o processamento das amostras. A avaliação qualitativa da produção de sideróforos foi avaliada pelo halo alaranjado ou amarelado produzido por esses microrganismos no meio de cultivo. Nessa seleção foram atribuídas notas de zero (sem produção de halo) a quatro (maiores halos observados).

Os isolados de cada formação vegetal, com as melhores avaliações no ensaio qualitativo para a produção de sideróforos, foram avaliados quantitativamente no que diz respeito à produção de sideróforos. Para tanto, os isolados bacterianos testados foram repicados para placa de Petri contendo meio de cultivo Tryptic Soy Agar (TSA) com adição de corante CAS. Os halos indicadores da produção de sideróforos foram mensurados em milímetros (mm) com o auxílio de um paquímetro digital após 120 h de incubação em BOD regulada a  $27 \pm 2$  °C. Nesta etapa foram realizadas avaliações com 4 repetições em delineamento experimental inteiramente casualizado e os resultados submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott.

Os isolados com melhor desempenho na avaliação quantitativa, foram selecionados para avaliações de outros parâmetros de interesse para mitigação, tais como solubilização de fosfato, quitinase e salinidade (crescimento em meio salino). Os isolados selecionados foram repicados em meio TSA e incubados em BOD regulada à temperatura de  $27 \pm 2$  °C até o crescimento bacteriano cobrir toda a superfície do meio. Após, o foram obtidos discos de cada isolado selecionado para as avaliações a seguir:

Para avaliação da solubilização de fosfato, discos dos isolados bacterianos foram repicados em placas de Petri contendo o meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) (NAUTIYAL, 1999) ajustado para pH 6.0 e também para pH 5.0. O meio de cultura NBRIP contém fonte insolúvel de P na forma de fosfato tricálcio que na presença de cloreto de cálcio e substâncias liberadas pelos microrganismos, como ácidos orgânicos e enzimas no meio circundante, sofre processo de solubilização (NAUTIYAL, 1999). A avaliação ocorreu após cinco dias de incubação em BOD regulada

à temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$ , quando foi verificada a presença ou ausência de halo translúcido ao redor das colônias com o indicador de solubilização de fosfato.

Para avaliação da produção de quitinase discos dos isolados bacterianos foram repicados em placas de Petri contendo meio de cultura contendo quitinase como única fonte de carbono. Cinco isolados por placa foram dispostos de forma uniforme e equidistantes. Um isolado produtor de quitinase (coleção do laboratório de Bacteriologia Vegetal da UFPel), utilizado como controle, foi disposto no centro da placa. As placas foram armazenadas em estufa à  $28^\circ\text{C}$  por 5 dias. Os isolados foram avaliados quantitativamente, medindo-se o diâmetro do halo de degradação do meio de cultivo ao redor da colônia. A revelação do halo foi realizada adicionando 1 ml do reagente lugol 1% às placas contendo os isolados (KASANA et al., 2008, com modificações).

A fim de determinar a diversidade genética dos microrganismos presente nos solos das restingas monitoradas, o sequenciamento genético de isolados bacterianos selecionados foi realizada através da extração de DNA de 75, seguida pela amplificação do gene rRNA 16s.

Para as etapas futuras do projeto estão previstas as análises para detecção de genes para fixação de  $\text{N}_2$ , produção de auxinas, produção de ACC Deaminases e produção de compostos voláteis. Essas análises visam a caracterização do potencial mitigatório de bactérias produtoras de sideróforos isoladas de solo e/ou raízes de espécies de Restinga das diferentes fitofisionomias.

#### 1.11.2 Estudos *ex situ* de espécies da restinga

Visto a escassez de informações da literatura sobre a propagação das espécies de restinga, o principal desafio dos estudos *ex-situ* tem sido estabelecer protocolos de propagação por estaquia, desenvolvimento e viabilização de mudas tanto para a reintrodução dessas espécies por meio de replantio em áreas negativamente afetadas pela ação antrópica, quanto também para experimentos/pesquisas que possibilitem um maior entendimento do efeito dos metais no aspectos funcionais das plantas de regiões atingidas por derrame de rejeitos de mineração. Desse modo, a propagação vegetativa apresenta-se como um método sólido e coerente para atingir tais objetivos (BERNARDES et al., 2017).

As coletas de material botânico usado para estaqueamento foram coletadas nas estações amostrais da Restinga monitoradas, sendo coletadas pelo menos dez amostras botânicas de indivíduos adultos de cada espécie, das três formações vegetais: herbácea, arbustiva e arbórea. A poda para coleta *in situ* foi realizada na região apical dos ramos laterais/estolões durante as primeiras horas da manhã, e as estacas semi-preparadas em campo, tendo sua base cortada em bisel, e em seguida foram acondicionadas em sacos plásticos com água.

Os experimentos foram instalados em casa de vegetação da área experimental do Setor de Botânica da UFES, campus Goiabeiras. Na casa de vegetação, a intensidade luminosa, a temperatura e a

umidade foram controladas. O controle de temperatura foi feito por meio de um sistema de refrigeração intermitente, em que o sistema era acionado sempre que a temperatura atingisse 33 °C.

Para as espécies herbáceas, testes iniciais quanto ao restabelecimento/rebrotamento das plantas em cultivo protegido após propagação por estaquia foram realizados com quatro espécies herbáceas *Blutaparon portulacoides*, *Canavalia rosea*, *Ipomoea imperati*, *Ipomoea pes-caprae*, coletadas nas restingas monitoradas do litoral norte do Estado do Espírito Santo durante o período chuvoso (verão) e seco (inverno) do ano 2021.

As estacas obtidas em campo foram cortadas posteriormente em pedaços de 10 cm preservando-se três folhas por estaca, plantadas em bandejas de polietileno contendo areia lavada e esterilizada, sem enraizadores e mantidas sobre bancadas a uma altura de 1,30 m do solo, sendo protegidas com tela termorrefletora, com 50% de transparência. As estacas foram inseridas cerca de 10 a 15 cm no substrato. Foram observadas brotações, queda de folhas, mortalidade das estacas, diâmetro (m) e comprimento (cm) dos estolões.

Ensaio com espécies arbustivas e arbóreas também foram realizados, em espécies de interesse como *Annona acutifolia*, *Chrysobalanus icaco*, *Coccoloba alnifolia*, *Eugenia astringens*, *Guapira pernambucensis*, *Jacquinia armillaris*, *Manilkara bella*, *Manilkara salzmännii*, *Psidium cattleianum* e *Schinus terebinthifolius*, as quais também foram obtidas por estaquia em julho, agosto e outubro de 2022 e encontram-se sob avaliação.

Na área experimental, as estacas coletadas tratadas com fertilizante FORTH Enraizador®, de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, as estacas foram plantadas em vasos de 5 kg contendo substrato contendo terra, areia e substrato orgânico comercial Terra Vegetal -Nutri&Verde® na proporção 1:1:1, respectivamente, sendo colocadas 4 estacas por vaso. Foram observadas número de brotações, número de folhas, mortalidade e enraizamento de estacas.

## REFERÊNCIAS

APG IV - THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p.1-20, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/boj.12385>. Acesso em: 14 nov. 2020.

BELIAEFF B, BURGEOT T. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.21, p.1316-1322, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>. Acesso em: 14 nov. 2020.

BERNARDES JÚNIOR, E.J.; VALE, L.S.; SOUSA, C. Indução ao enraizamento de estacas de *Capsicum baccatum* L. var. pendulum com ácido indolbútrico. Enciclopedia Biosfera, [S. I.], v. 14, n.

25, 2017. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/888>. Acesso em: 05 dez. 2022.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248–254, 1976. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Acesso em: 14 nov. 2020.

BROWER, J.E., ZAR, J.H. **Field and Laboratory Methods for General Ecology**. 2nd Ed. Boston: Brown Publishers. 226p. 1984.

BROWER, J.E.; ZAR, J.H. **Field and Laboratory Methods for General Ecology**. Dubuque. Iowa: William C. Brown Company Publishers, 320p. 1977.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities on root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, v.83, p.463-468, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>. Acesso em: 14 nov. 2020.

CARILLO, P.; GIBON, Y. PROTOCOL: Extraction and determination of proline. **Prometheus Wiki**. 2011. Disponível em: <http://prometheuswiki.org/tiki-index.php?page=Extraction+and+determination+of+proline>. Acesso em: 14 nov. 2020.

CLINEBELL, R.R., PHILLIPS, O.L., GENTRY, A.H., STARK, N., ZUURING, H. Prediction of neotropical tree and liana species richness from soil and climatic data. **Biodiversity and Conservation**, v.4, p.56-90, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00115314>. Acesso em: 14 nov. 2020.

DUTRA, VALQUIRIA FERREIRA; ALVES-ARAÚJO, ANDERSON; CARRIJO, TATIANA TAVARES. Angiosperm checklist of Espírito Santo: using electronic tools to improve the knowledge of an Atlantic Forest biodiversity hotspot. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1145-1152, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566414>. Acesso em: 14 nov. 2020.

FERNIE, A.R., ROSCHER, A., RATCLIFFE, R.G., AND KRUGER, N.J. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, v.212, p.250–263, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s004250000386>. Acesso em: 14 nov. 2020.

FIDALGO, O.; BONONI, V.L.R. **Técnicas de coleta, preservação e herborização do material botânico**. São Paulo: Instituto de Botânica, 1989.

FLORA do Brasil 2020 em construção. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 21 mai. 2020.

FRAGA, C.N.; CHAVES, G.F.; SILVA, J.P.; FORMIGONI, M.H.; RIBEIRO, R. S.; REIS, J C. L.; CAPELLÃO, R.T. **Espécies Ameaçadas do Espírito Santo**. Santa Teresa. Disponível em: <http://tempustecnologia.com/site/>. Acesso em: 20 ago. 2019.

GENTRY, A.H. The distribution and evolution of climbing plants. In: Putz, F.E.; Mooney, H.A. (Eds.). **The Biology of Vines**. Cambridge: Cambridge University Press, p.3-49, 1991.

GIULIETTI, A.M.; RAPINI, A.; ANDRADE, M.J.G.; QUEIROZ, L.P. & SILVA, J.M.C. **Plantas raras do Brasil**. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2009.

HAKANSON, L. An ecological risk index for aquatic pollution control. a sedimentological approach. **Water Research**, v.14, n.8, p.975-1001, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(80\)90143-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(80)90143-8). Acesso em: 14 nov. 2020.

HIGGINS, M.A., RUOKOLAINEN, K. Rapid Tropical Forest Inventory: A comparison of techniques based on inventory data from Western Amazonia. **Conservation Biology**, v.18, p.799–811, 2004.

I3N. 2020. **Base de dados de espécies exóticas invasoras do Brasil**. Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental, Florianópolis-SC. Disponível em: <http://bd.institutohorus.org.br>. Acesso em: 15 mai. 2020.

KAMPFENKEL, K.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Effects of Iron Excess on *Nicotiana plumbaginifolia* Plants: Implications to Oxidative Stress. **Plant Physiology**, v.107, p.725-735, 1995. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/107/3/725.full.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2020.

KASANA, R.C., SALWAN, R., DHAR, H., DUTT, S., GULATI, A. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*. 2008 57(5):503-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>. Epub 2008 Sep 23. PMID: 18810533.

KUHLMANN, M.; RIBEIRO, J.R. Evolution of seed dispersal in the Cerrado biome: ecological and phylogenetic considerations. **Acta Botanica Brasilica**, v.30, n.2, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-33062015abb0331>. Acesso em: 14 nov. 2020.

KUHLMANN, M.; RIBEIRO, J.R. Fruits and frugivores of the Brazilian Cerrado: ecological and phylogenetic considerations. **Acta Botanica Brasilica**, v.30, n.3, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-33062016abb0192>. Acesso em: 14 nov. 2020.

LIMA, A. L. S.; DAMATTA, F. M.; PINHEIRO, H. A.; TOTOLA, M. R.; LOUREIRO, M. E. Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. **Environmental and experimental botany**, v.47, n.3, p.239-247, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00130-7](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00130-7). Acesso em: 14 nov. 2020.

LISEC, J.; SCHAUER, N. KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**. v.1, p.387–396, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.59>. Acesso em: 14 nov. 2020.

MARTINELLI, G.; MORAES, A.A. **Livro vermelho da flora do Brasil**. 1ed., Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1100p. 2013.



MIRANDA, T.O.; CARVALHO, S.M. Levantamento quantitativo e qualitativo de indivíduos arbóreos presentes nas vias do bairro da ronda em Ponta Grossa-PR. **REVSBAU**, Piracicaba – SP, v.4, n.3, p.143 – 157, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5380/revsbau.v4i3.66436>. Acesso em: 14 nov. 2020.

MORELLATO, L.P.C., RODRIGUES, R.R., LEITÃO FILHO, H.F.; JOLY, C.A. Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semi-decídua na Serra do Japi, Jundiaí. **Revista Brasileira de Botânica**, v.12, p.85-98, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002000200012>. Acesso em: 14 nov. 2020.

MORO, M.F.; SOUZA, V.C.; OLIVEIRA-FILHO, A.T.; QUEIROZ, L.P.Q.; FRAGA, C.N.; RODAL, M.J.N.; ARAÚJO, F.S.; MARTINS, F.R. Alienígenas na sala: o que fazer com espécies exóticas em trabalhos de taxonomia, florística e fitossociologia? **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.4, p.991-999, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062012000400029>. Acesso em: 14 nov. 2020.

MÜELLER-DOMBOIS, D.; ELLENBERG, H. **Aims and methods of vegetation ecology**. New York: John Wiley and Sons Inc., 547p. 1974.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v.170, p. 265-270, 1999.

NUNES-NESE, A., CARRARI, F., GIBON, Y., SULPICE, R., LYTOVCHENKO, A., FISAHN, J., RATCLIFFE, R.G., SWEETLOVE, L.J., AND FERNIE, A.R. Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. **The Plant Journal**, v.50, p.1093–1106, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2007.03115.x>. Acesso em: 14 nov. 2020.

PAYE, H. DE S., DE MELLO, J.W.V., ABRAHÃO, W.A.P., FILHO, E.I.F., DIAS, L.C.P., CASTRO, M.L.O., DE MELO, S.B., FRANÇA, M.M., Valores de referência de qualidade para metais pesados em solos no estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, n.6, p. 2041–2051, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832010000600028>. Acesso em: 31 mai. 2020.

PERES, M.K.; FAGG, C.W. Chave interativa para diásporos do cerrado do Jardim Botânico de Brasília, DF, atrativos para Fauna. **Heringeriana**, v.5, n.2, p.32-46, 2011. Disponível em: <http://revistas.jardimbotanico.ibict.br/index.php/heringeriana/article/download/23/27>. Acesso em 14 nov. 20.

PHILLIPS, O.; MILLER, J.S. Global patterns of plant diversity: Alwyn H. Gentry's forest transect data set. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v.89, p.1-319, 2002.

PINHEIRO, H. A.; DAMATTA, F. M.; CHAVES, A. R.; FONTES, E. P.; LOUREIRO, M. E. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant science**, v. 167, n.6, p.1307-1314, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.06.027>. Acesso em: 14 nov. 2020.



PSG; NUTRIPETRO. **Estudo de Impacto Ambiental: Terminal Portuário de Uso Múltiplo da Nutripetro**. Vitória, PSG EQUILIBRIUM DO BRASIL LTDA, 2013. Disponível em: <https://iema.es.gov.br/Media/iema/CQAI/EIA/2013/Nutripetro/EIA%20-%20Nutripetro.pdf>. Acesso em: 04 nov. de 2020.

RAHMAN, S.H.; KHANAM, D.; ADYEL, M.; SHAHIDUL ISLAM, M.; AMINUL AHSAN, M.; AHEDUL AKBOR, M. Assessment of heavy metal contamination of agricultural soil around Dhaka Export Processing Zone (DEPZ), Bangladesh: Implication of Seasonal Variation and Indices. **Applied Sciences**, v.2, n.3, p.584-601, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app2030584>. Acesso em 14 nov. 2020.

RAIJ, B. VAN, DE ANDRADE J.C., CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A., **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 285p. 2001. Disponível em: [http://lab.iac.sp.gov.br/Publicacao/Raij\\_et\\_al\\_2001\\_Metod\\_Anal\\_IAC.pdf](http://lab.iac.sp.gov.br/Publicacao/Raij_et_al_2001_Metod_Anal_IAC.pdf). Acesso em: 14 nov. 2020.

ROMEIRO, S.R. Isolamento de Agentes de Biocontrole. In: ROMEIRO, S.R. (Org.). **Controle Biológico de Doenças em Plantas – Procedimentos**. Viçosa: Ed. Viçosa, 2007, p.71-81.

SAKAN, S.; ĐORĐEVIĆ, D.; MANOJLOVIĆ, D.; PREDRAG, P. Assessment of heavy metal pollutants accumulation in the Tisza river sediments. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.3382–3390, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.05.013>. Acesso em: 14 nov. 2020.

SANCHEZ W, BURGEOT T, PORCHER J. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science Pollution Research**, v.20, p.2721-2725, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>. Acesso em: 14 nov. 2020.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análise química de plantas**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 56p. 1974.

SILVA, E., GUILHERME, M. D. F., OLIVEIRA, H., VIANA, Z., & SANTOS, V. L. Caracterização morfológica e efeitos ecotoxicológicos do chumbo na germinação de sementes de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Arq. Inst. Biol.**, p. 1-7, 2017.

SIMONELLI, M.; FRAGA, C.N. **Espécies da flora ameaçadas de extinção no estado do Espírito Santo**. Vitória: Ipema, 2007.

STRASSER, B.J., STRASSER, R.J. Measuring Fast Fluorescence Transients To Address Environmental Questions: The Jip-Test. In: P. Mathis, (Ed.) **Photosynthesis: From Light To Biosphere**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p.977– 980, 1995.

STRASSER, R.J., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI-MICHAEL, M. The Fluorescence Transient As A Tool To Characterise And Screen Photosynthetic Samples. In: M. Yunus, U. Pathre, And P. Mohanty, Eds. (Eds.), **Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation And Adaptation**. London: Taylor & Francis. v. 25, p 443–480. 2000. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/252250818> The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Acesso em: 14 nov. 2020.

STRASSER, R.J., TSIMILLI-MICHAEL M., SRIVASTAVA, A. Analysis Of The Fluorescence Transient. In: C. George C., C, Papageorgiou And C., Govindjee, (Eds.) **Chlorophyll Fluorescence: A Signature Of Photosynthesis**. Advances In Photosynthesis And Respiration Series. Dordrecht: Springer. p.321-362, 2004.

TUREKIAN. K.K.; WEDEPOHL, K.H. Distribution of the Elements in Some Major Units of the Earth's Crust. **Geological Society of America Bulletin**, v.72, n.2, p.175–192, 1961. Disponível em: [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(1961\)72\[175:DOTEIS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(1961)72[175:DOTEIS]2.0.CO;2). Acesso em: 14 nov. 2020

U.S. EPA. 1994. Method 3051 (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils, UnitedStates Environmental Protection Agency, Washington, DC.

U.S. EPA. **Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils**. Revision 1. Washington, DC, 2007.

USMAN, A.R., LEE, S.S., AWAD, Y.M., LIM, K.J., YANG, J.E., OK, Y.S. Soil pollution assessment and identification of hyperaccumulating plants in chromated copper arsenate (CCA) contaminated sites, Korea. **Chemosphere**, v.87, n.8, p.872-878, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.028>. Acesso em: 14 nov. 2020.

WEI, B.; YANG, L. A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agriculture soils from China. **Microchemical Journal**, v.94, n.2, p.99–107, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.09.014>.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**. v.144, n3, p.307-313, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2). Acesso em: 14 nov. 2020.

YEMM, E.M. COCKING, E.C.The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v.80, p.209-213, 1955. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/AN9558000209>. Acesso em: 14 nov. 2020.