

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

Material Suplementar Ambiente Costeiro

Tema: Restinga

RT-52/OUT 25

RSE2025 PMBA/FEST-UFES

Vitória,

Outubro de 2025

EQUIPE TÉCNICA

Diolina Moura Silva (coordenador)

Adriano Nunes Nesi

Jairo Pinto de Oliveira

Oberdan José Pereira

Servio Tulio Alves Cassini

Silvia Tamie Matsumoto

Valquíria Ferreira Dutra

Wagner Luiz Araújo

Auxiliadora Oliveira Martins

Francielen Barroso Aragão

Larissa Bernardino Moro

Mariela Mattos da Silva

Rodrigo Theofilo Valadares

Romário de Oliveira Silva Junior

Sabrina Garcia Broetto

Aline Delon Firmino

Bruna Silva Corrêa

Gislane Chaves Oliveira

João Paulo Fernandes Zorzanelli

Juliana da Silva Penha

Mariana Machado Rocha

Rebeca Matos Groner

Vinícius Henrique de Carvalho

Leo Gasparini de Oliveira

Davi Valim Bastos

Emanuel Ferreira de Souza

Gabriel Rosa de Sousa

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL	5
2	METODOLOGIA	5
2.1	COLETA	6
2.1.1	Análises de contaminantes no sedimento, material depositado sobre as folhas (“Spray”) e tecidos vegetais	6
2.1.2	Inventário Florístico e da Estrutura, e Fenologia da vegetação	7
2.1.3	Monitoramento ecofisiológico da vegetação de Restinga	10
2.1.4	Respostas de espécies vegetais à contaminação por elementos minerais e capacidade de recuperação da Restinga	10
2.2	ANÁLISE	12
2.2.1	Contaminação do sedimento, do material depositado sobre as folhas (“Spray”) e dos tecidos vegetais, e granulometria	12
2.2.2	Inventário Florístico, estrutural e fenológico da vegetação.....	13
2.2.3	Análises bioquímicas e alterações celulares da Restinga monitorada	15
2.2.4	Microbiota do sedimento associado à vegetação	16
2.2.5	Identificação da causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação de metais em espécies da Restinga	18
2.2.6	Análise de dados e determinação da Situação de Risco e Alerta de Perigo.....	22
2.2.7	Monitoramento da Restinga via sensoriamento remoto	23
2.2.8	Estratégias para divulgação científica e popularização da ciência para conservação da Restinga	24
2.3	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS	25
2.4	ALTERAÇÕES NA MALHA, FREQUÊNCIA AMOSTRAL E ESCOPO REALIZADAS EM OUTUBRO DE 2024: CONSEQUÊNCIAS PARA AS ANÁLISES DA SÉRIE HISTÓRICA DE INDICADORES	28
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	29
3.1	VITALIDADE DA VEGETAÇÃO	30
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO	50

5	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	54
6	REFERÊNCIAS	55

1 HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

A malha e frequência amostrais do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest-UFES) passou por modificações ao longo do tempo, visando seu aperfeiçoamento para atendimento aos objetivos do Programa. Estas alterações foram orientadas pela Câmara Técnica da Biodiversidade (CTBio) e aprovadas pelo Comitê Interfederativo (CIF), por meio de: (1) Ofício SEI nº 1/2020-CTBio/DIBIO/ICMBio, de outubro de 2019 (para o período de transição), (2) Proposta Técnica de continuidade do monitoramento, apresentadas e aprovadas em 2022, visando o “Novo Ciclo do PMBA/Fest-UFES” e (3) Ofício SEI Nº 32/2024/CTBio/DIBIO/ICMBio, Nota Técnica nº 1/2024-CTBio/DIBIO/ICMBio e Deliberação CIF nº 803, de 08 de agosto de 2024.

As modificações implementadas encontram-se nos seguintes Materiais Suplementares, os quais contemplam todo o período de execução do PMBA/Fest-UFES: 1) MS – Malha amostral, que apresentam as estações amostrais executadas ao longo do tempo por todos os Anexos/Temas, separados por cada marco temporal histórico mencionado acima (“Ano 1”, “Transição”, “Novo Ciclo” e “Deliberação 803”); 2) Frequência amostral, o qual contempla o histórico da periodicidade amostral (seguindo os mesmos Anexos/Temas contemplados no item 1) e 3) MS – Mapas históricos das malhas amostrais, que apresenta os mapas das malhas amostrais (incluindo as estações) executadas por todos os Anexos/Temas.

Segue o detalhamento temporal, como forma de esclarecer a execução dentro dos marcos históricos: “Ano 1” (setembro de 2018 e setembro de 2019); “Transição” (outubro de 2019 e julho de 2022); “Novo Ciclo” (agosto de 2022 a setembro de 2024) e “Deliberação 803” (outubro de 2024 a março de 2026). O grupo da Ecotoxicologia é uma exceção a esta historicidade, pois iniciou a amostragem referente ao “Novo Ciclo” em janeiro de 2023 e segue com a “Deliberação 803”, na periodicidade já informada.

2 METODOLOGIA

A metodologia apresentada contempla o escopo em vigência no momento de entrega deste relatório, ou seja, as amostragens e análises previstas para o Novo Ciclo do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática – PMBA/Fest-UFES submetidas à Fundação Renova através do FORMULÁRIO DE APRESENTAÇÃO DE PLANO DE TRABALHO em agosto de 2022 (e dezembro de 2022 para o Tema Ecotoxicologia) e na Deliberação CIF nº 803, de 08 de agosto de 2024. Após a descrição da metodologia implementada, será apresentado um breve descritivo sobre as modificações metodológicas (parâmetros, análise de parâmetros ou grupo de parâmetros, dentre outros) que ocorreram ao longo da evolução do PMBA/Fest-UFES a fim de determinar os indicadores.

2.1 COLETA

2.1.1 Análises de contaminantes no sedimento, material depositado sobre as folhas (“Spray”) e tecidos vegetais

Coleta de sedimentos: as amostras de sedimentos foram coletadas semestralmente, respeitando a periodicidade estabelecida pelo monitoramento (período seco/chuvoso). A abrangência incluiu as três formações vegetais (herbácea, arbustiva e arbórea) amostradas em cada estação do Tema Restinga. Para o novo escopo e malha amostral do tema, vigente a partir de outubro de 2024, foram excluídas as análises da formação arbórea, bem como da estação de Barra Nova (E4). Considerando a inserção do ecossistema Restinga no Ambiente Costeiro, a área monitorada seguiu a divisão reconhecida pelo Tema Praias e adotada por todos os temas deste ambiente. Assim, o litoral compreendido entre os setores dos terraços de abrasão e planície costeira do rio Doce foi compartimentalizado em três compartimentos, A, B, e C, sendo o compartimento B ainda subdividido em B e B', em vista de suas diferenças de amplitude topográfica. Para o Tema Restinga, as estações monitoradas se localizam no Compartimento C, com estações amostrais entre a Área de Proteção Ambiental de Conceição da Barra e Degredo (E1, E3, E4 e E10); no Compartimento B', abrangendo as estações amostrais de Cacimbas (E6) e Reserva Biológica de Comboios (E7); e no Compartimento A, que se restringe a estação amostral E9, em Mar Azul, Aracruz. O critério de escolha das coletas de sedimento incluiu 10 pontos estabelecidos próximos às plantas monitoradas pelos estudos ecofisiológicos. Foram coletadas amostras de 0-20 cm de profundidade com auxílio de pás de plástico, suficientes para análise em triplicata. As amostras foram secas em estufa a 60°C por 72 h ou até peso constante.

Análises do material depositado sobre as folhas (“Spray”): as coletas foram realizadas nas estações amostrais definidas em função do posicionamento na compartimentação e morfodinâmica de região costeira do Espírito Santo. Folhas das espécies selecionadas nestas estações e nas três formações vegetais foram lavadas com 50 mL de água ultrapura e o líquido recolhido em tubos Falcon 50 mL, com adição de HNO₃ a 2% (v/v) para conservação. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o envio para as análises químicas (Laboratório de Espectrometria Atômica/UFES).

Coleta de estruturas vegetais: espécies-chave selecionadas nas estações amostrais foram analisadas, com tratamentos compostos por cinco indivíduos. As espécies escolhidas estão entre as com maior valor de importância, elencadas previamente pelos estudos fitossociológicos e que melhor representam as comunidades de cada estação. Os órgãos coletados de um mesmo indivíduo foram agrupados para obtenção de material suficiente para análise em triplicata. As amostras vegetais coletadas foram secas em estufa a 60°C por 72 h ou até peso constante.

Coleta de recursos florais: a análise de estruturas reprodutivas e recompensas florais considerou a amostragem de pólen e mel, as quais permitiram a determinação da origem floral e presença de pólen das espécies mais frequentes encontradas nas estações amostrais de acordo com cada localidade de produção. As amostras foram coletadas na Comunidade Quilombola de Degredo, município de Linhares, próximo à área amostral de monitoramento da Restinga em Degredo (E10). O critério de escolha considerou o posicionamento intermediário das colônias em relação aos Compartimentos B e

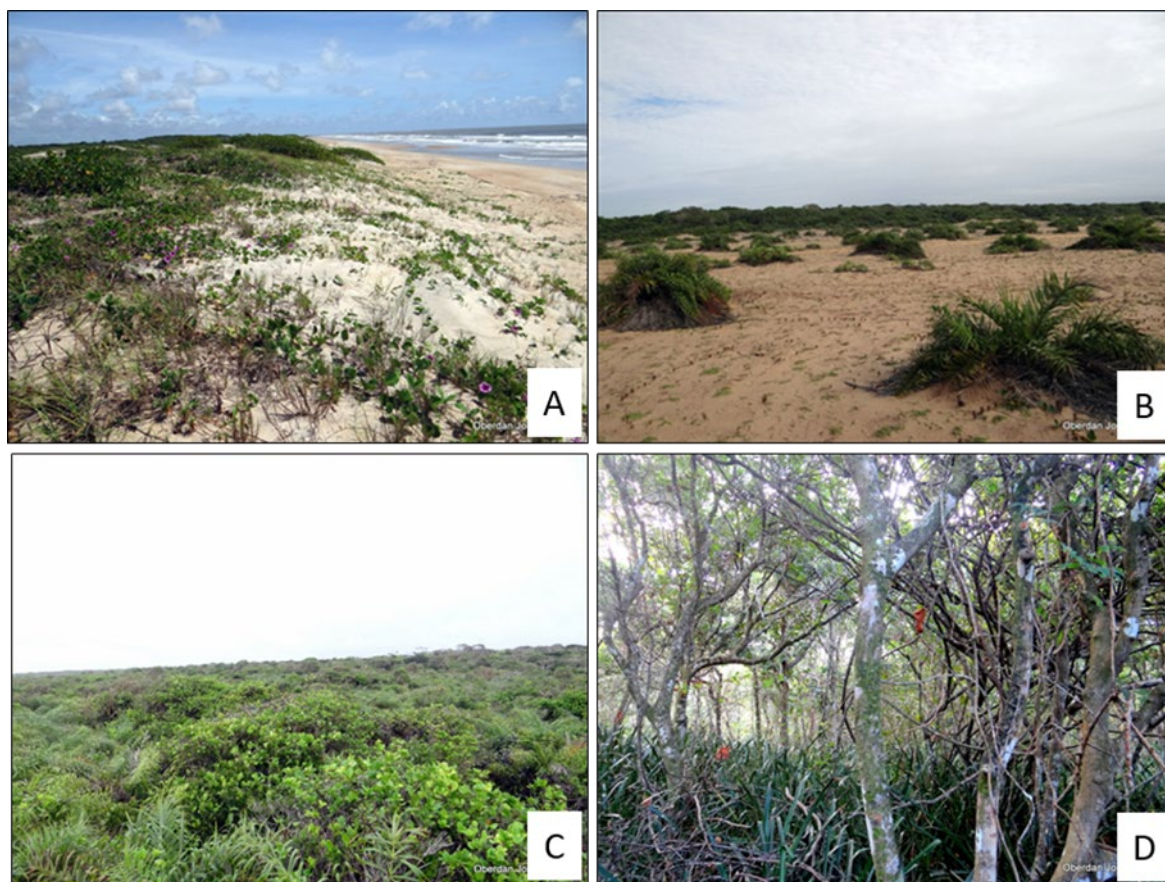
C, posicionamento que abrange o ecossistema Restinga, incluindo as três fitofisionomias estudadas no PMBA/Fest-UFES (herbácea, arbustiva e arbórea). Como a área de forrageamento das abelhas abrange um raio de três quilômetros no entorno da colmeia e, as colônias distam cerca de 2,8 km da linha da costa, a escolha deste setor atendeu aos critérios de avaliação de uso dos recursos no ecossistema estudado. Um total de três colmeias de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) foram coletadas em cinco propriedades, totalizando 15 amostras para cada período. As amostras de pólen foram coletadas com o auxílio de coletores de pólen de plástico instalados na entrada das colmeias e pools de amostras de mel foram coletados diretamente dos favos. Estas amostras foram acondicionadas em tubos falcon esterilizados, acondicionadas a 22°C e encaminhadas para o Laboratório de Taxonomia de Fanerógamas (LABTAX) da Universidade Federal do Espírito Santo, para processamento e inventário polínico. Após processamento, alíquotas de 1g de pólen e mel foram encaminhadas em triplicata ao Laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química (LEA/UFES), para a determinação de elementos químicos.

2.1.2 Inventário Florístico e da Estrutura, e Fenologia da vegetação

O monitoramento das estações amostrais da Restinga reveste-se de extrema importância para a validação dos indicadores de impacto do Material Ligado ao Desastre (MLD) de Mariana/MG via salsugem. O monitoramento foi realizado nas sete estações amostrais, estabelecidas para o Plano de Trabalho de 2022 do Tema Restinga, até setembro de 2024. A partir de outubro de 2024, o monitoramento foi realizado em seis estações amostrais, visto que a estação de Barra Nova (E4) deixou de ser monitorada. Especificamente, na estação amostral Mar Azul/Aracruz (E9) a Restinga é pouco desenvolvida e sob influência da aproximação da Formação Barreiras junto à costa, resultando em uma distribuição diferenciada da vegetação, implicando em logística diferencial em relação às demais estações amostrais.

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, Figura 1A), arbustiva (aberta não inundável, Figura 1B, ou fechada não inundável, Figura 1C) e arbórea (formação florestal, Figura 1D) e fora delas. Espécimes férteis observados foram coletados, de um indivíduo por espécie, em cada fitofisionomia, em todas as áreas, durante outubro/2018 a julho/2024. 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.

Figura 1: Aspecto geral das formações vegetais nas estações amostrais do Tema Restinga, monitoradas ao longo da região costeira do Espírito Santo, no âmbito do PMBA/Fest-UFES. A. Formação Herbácea não Inundável. B. Formação Arbustiva Aberta não Inundável. C. Formação Arbustiva Fechada não Inundável. D Formação Florestal não Inundável.



O material coletado, prensado e inicialmente seco em campo, foi transportado ao Herbário VIES, em Vitória, onde continuou o processo de secagem até o período completo de cinco dias, após o qual foi encerrado em sacos plásticos, levados ao freezer para descontaminação por sete dias. Após a descontaminação, as exsicatas foram montadas, identificadas e depositadas no Herbário VIES e no Herbário SAMES, da Universidade Federal do Espírito Santo.

Para o acompanhamento da dinâmica da vegetação no espaço e tempo, **o levantamento da estrutura da comunidade da formação herbácea** foi realizado inicialmente em duas amostragens, a primeira em outubro/novembro/2018 (período Chuvoso Ano 1) e a segunda em maio/2019 (período Seco Ano 1). Como não foram encontradas diferenças significativas entre os períodos de avaliação, a periodicidade de amostragem exigiu intervalos mais longos a fim de se obter diferenças diagnosticáveis. Desta forma, outras quatro avaliações foram efetuadas em fevereiro/2021 (período Chuvoso Ano 3), janeiro/2022 (período Chuvoso Ano 4), abril/2023 (período Seco Ano 5) e janeiro/2024 (período Chuvoso Ano 6). Nessa formação, utilizou-se o método de parcelas alternadas de Müeller-Dombois e Ellenberg (1974), consistindo em parcelas de 1 m², 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 formação.

No levantamento da **estrutura da vegetação na formação arbustiva**, foi utilizado o método de intercepto de linha (MÜELLER-DOMBOIS e ELLENBERG 1974). A coleta foi inicialmente realizada em outubro/novembro/2018 (período Chuvoso Ano 1), entretanto, mudanças na estrutura desta vegetação demandam tempo para serem capturadas, exigindo que as avaliações futuras abranjam mais tempo. Assim, as avaliações seguintes foram efetuadas em abril/2021 (período Seco Ano 3), maio/2022 (período Seco Ano 4), abril/2023 (período Seco Ano 5), janeiro/2024 (período Chuvoso Ano 6) e janeiro/2025 (período Chuvoso Ano 7). 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 obtidas: a extensão do indivíduo interceptado pela projeção da linha e sua altura. Lianas e herbáceas menores que 50 cm foram anotadas apenas quanto à sua presença.

A **estrutura da vegetação na formação arbórea** foi avaliada segundo metodologia sugerida por Gentry (1991), resumida por Phillips e Miller (2002) e enquadrada 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, geralmente não amostrados em parcelas de árvores (CLINEBELL *et al.* 1995). A amostragem foi realizada anualmente e 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 sedimento e abaixo da altura do peito (1,30 m) foram incluídos quando um dos seus ramos obedecia ao critério de inclusão, sendo anotado a CAP (Circunferência à Altura do Peito) de todas as ramificações para o cálculo da área basal. A amostragem inicial da comunidade foi realizada em outubro e novembro/2018 (período Chuvoso Ano 1), contudo, maiores intervalos foram necessários para captura de possíveis mudanças estruturais. Assim, as avaliações posteriores foram efetuadas anualmente, em julho e agosto/2021 (período Seco Ano 3), outubro/2022 (período Chuvoso Ano 5) e outubro/2023 (período Chuvoso Ano 6). Para o novo escopo, vigente a partir de outubro de 2024, foram excluídas as análises da formação arbórea.

A coleta de **dados fenológicos da vegetação** da Restinga durante o Ano 1 permitiu definir a sazonalidade de desenvolvimento da vegetação, mesmo sob efeito de condições climáticas durante anos superúmidos (2018-2019). Devido a necessidade de ajustes associados a periodicidade de coletas (ora mensal/trimestral), a média da intensidade de floração e frutificação foi definida

semestralmente, dentro da periodicidade chuvoso e seco. A coleta de dados foi efetuada através de observações diretas de ao menos cinco indivíduos, previamente marcados, das espécies com maior valor de importância, definidos pelo estudo fitossociológico, bem como de espécies auxiliares como ameaçadas de extinção ou raras. O registro fotográfico dos indivíduos avaliados foi obtido, gerando uma matriz de presença e ausência dos estágios fenológicos de cada espécie. Observações complementares em indivíduos não marcados foram realizadas em cada comunidade, a fim de melhorar a interpretação dos dados e capturar efeitos isolados (e.g. fitossanidade).

2.1.3 Monitoramento ecofisiológico da vegetação de Restinga

Para a continuidade do monitoramento das **respostas ecofisiológicas** da vegetação de Restinga, as análises (campo e laboratoriais) foram realizadas nas sete 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 por formação. 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).

Cinco indivíduos de cada espécie de interesse foram avaliados trimestralmente *in situ* nos polígonos amostrais já monitorados. Indivíduos das três formações vegetais foram analisados quanto a **produtividade primária** nas primeiras horas da manhã (entre 7 e 11 horas, horário solar), por meio da análise da Cinética de Emissão da Fluorescência Rápida (STRASSER *et al.*, 2010, LI *et al.*, 2014, BACARIN *et al.*, 2016, CHEN *et al.*, 2016, KALAJI *et al.*, 2016), utilizando-se um fluorômetro portátil (Handy-PEA, Hansatech Instruments®, King's Lynn, Norkfolk, UK). Somados a isso, semestralmente, para as análises de assimilação fotossintética, as trocas gasosas foram estimadas utilizando-se um analisador de gases no infravermelho, portátil, (IRGA, modelo LCPro T, ADC BioScientific Ltd., England), sendo submetidas à radiação fotossinteticamente ativa artificial saturante ($1.300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e em concentração de CO_2 ambiente.

Para as **análises laboratoriais** relacionadas aos aspectos ecofisiológicos, amostras vegetais foram coletadas semestralmente com tratamentos compostos por cinco indivíduos, congeladas em nitrogênio líquido (N_2) e armazenadas em laboratório a temperatura de -80°C .

2.1.4 Respostas de espécies vegetais à contaminação por elementos minerais e capacidade de recuperação da Restinga

2.1.4.1 Coleta de sedimento e material vegetal para ensaios *in vitro*

Microbiota do sedimento: Para a avaliação de microrganismos promotores de crescimento vegetal e características de interesse a fitorremediação, amostras de sedimento contendo raízes das espécies selecionadas foram coletadas nas diferentes formações vegetais. No caso das espécies herbáceas, o sedimento nas imediações das plantas foi regado com água ultrapura e o sedimento imediatamente adjacente e aderido às raízes das plantas foi amostrado juntamente com o material vegetal. Nas plantas arbustivas e arbóreas, após a rega, amostras de sedimento e raízes presentes na projeção da copa

dos indivíduos das espécies de interesse foram coletadas nos primeiros 20 cm do substrato, atentando-se para a presença de sedimento aderido às raízes (rizosférico). Em seguida, as amostras foram identificadas e armazenadas sob refrigeração até transporte ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Após o recebimento, as amostras foram pesadas e classificadas quanto à sua composição.

Ensaio com extrato solubilizado: A coleta de sedimento, para análise dos efeitos dos elementos químicos presentes no sedimento das estações amostrais da Restinga, foi realizada concomitantemente à amostragem para as análises de contaminação do sedimento. Amostras foram coletadas ao longo da seção transversal da formação vegetal de cada estação, com o auxílio de pazinhas de plástico, e acondicionadas em embalagens plásticas do tipo zip-lock.

2.1.4.2 Estudos *ex situ* de espécies da Restinga

Considerando a escassez de informações da literatura sobre a **propagação das espécies de Restinga**, o principal desafio dos estudos *ex situ* foi 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 nos aspectos funcionais das plantas de regiões atingidas pelo MLD. Desse modo, a propagação vegetativa apresenta-se como um método sólido e coerente para atingir tais objetivos (BERNARDES *et al.*, 2017).

O material botânico usado para estaqueamento foi coletado nas estações amostrais de Restinga monitoradas no âmbito do PMBA/Fest-UFES, nas quais pelo menos dez amostras botânicas de indivíduos adultos de cada espécie foram coletadas, 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 semipreparadas 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, *Blutaparon portulacoides*, *Canavalia rosea*, *Ipomoea imperati* e *Ipomoea pes-caprae*, coletadas de Restinga monitoradas do litoral norte do Estado do Espírito Santo durante os períodos 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 sedimento, 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 **arbustivas** amostradas em período seco: *Coccoloba alnifolia*, *Eugenia astringens*, *Guapira pernambucensis*, *Mimusops coriacea*, *Myrciaria strigipes*, *Myrsine parvifolia*, *Tocoyena bullata* e *Culpania emarginata*; e espécies **arbóreas**: *Eugenia hirta*, *Manilkara bella*, *Manilkara salzmännii*, *Pera glabrata*, *Pouteria pachycalyx*, *Protium heptaphyllum* e *Psidium cattleianum*. Devido ao baixo sucesso no estabelecimento das espécies arbustivas e arbóreas, novos ensaios foram realizados com a utilização de enraizadores em espécies de interesse como **arbustiva**: *Chrysobalanus icaco*, *C. alnifolia*, *E. astringens*, *G. pernambucensis*, *Schinus terebinthifolius* e *Jacquinia armillaris*; e **arbóreas**: *Annona acutifolia*, *P. cattleianum*, *M. bella* e *M. salzmännii*, as quais também foram obtidas por estaquia em julho, agosto e outubro de 2022. Na área experimental, as estacas coletadas foram 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 composto por terra, areia e substrato orgânico comercial Terra Vegetal - Nutri&Verde® na proporção 1:1:1, sendo dispostas quatro estacas por vaso.

2.2 ANÁLISE

2.2.1 Contaminação do sedimento, do material depositado sobre as folhas (“Spray”) e dos tecidos vegetais, e granulometria

Análise dos elementos químicos: 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 pseudototal no sedimento, utilizando protocolos anteriormente estabelecidos (USEPA 3051A, 2007) e que foram modificados para a análise das amostras vegetais, bem como a quantificação de elementos-traço (fração total) nas amostras de material depositado sobre as folhas (“Spray”), que seguiu o método EPA 3015a para água (USEPA, 2007b). As amostras foram analisadas por ICP-MS (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado) e ICP OES (espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado); e (2) Laboratório de Análises do Solo, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (DPS/UFV), para análise de nutrientes biodisponíveis no sedimento (Fe, Mn, Cu e Zn por extrator de Mehlich-1) e micronutrientes no tecido vegetal (SARRUGE e HAAG, 1974), determinados por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS). A caracterização das áreas costeiras de Restinga monitoradas pelo PMBA/Fest-UFES 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 sedimento 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.

Análise física do sedimento: A determinação da granulometria dos sedimentos arenosos foi realizada pelo Laboratório de Geomorfologia e Sedimentologia Costeira (LAGES), na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Inicialmente, as amostras foram lavadas para a retirada do sal e colocadas na

estufa para secar, a temperatura média de 40°C. Após a secagem, as amostras foram quarteadas por meio do quarteador do tipo Jones até o peso aproximado de 50 g. Na sequência, a amostra quarteada foi posta no agitador de peneiras por 15 minutos. Para o peneiramento foi utilizado um jogo de peneiras com malha de -2 a 4 ϕ (4 a 0,063 mm). Após o peneiramento, o sedimento retido em cada peneira foi pesado para a determinação do percentual de cada fração granulométrica. A partir do percentual das frações granulométricas, os parâmetros estatísticos propostos por Folk e Ward (1957) foram calculados para todas as amostras por meio do programa GRADISTAT (BLOTT e PYE, 2001).

Índice Integrado de poluição (IPI) e Porcentagem de Elementos Acima da Referência (PEAR):

Para acessar os níveis de contaminação dos elementos minerais presentes no solo de Restinga, avaliadas 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 ($IPI > 5$).

A Porcentagem de Elementos Acima da Referência (PEAR) representa o percentual de elementos, dentro do total analisado, que se encontram acima dos valores de referência, permitindo assim realizar uma análise da evolução espaço-temporal dos elementos químicos no solo das três formações vegetais de Restinga monitoradas.

Para a análise do IPI e PEAR, os dados foram avaliados utilizando-se valores norteadores preconizados no Estudo de Impacto Ambiental do Terminal Portuário de Uso Múltiplo da Nutripetro - EIA-Nutripetro - realizado em 2013 (PSG, 2013). Os resultados foram expressos em mapas temáticos com colorações referentes aos intervalos de classificação definidos.

Fator de bioacumulação (BAF): 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): $BAF = C_{folha}/C_{solo}$. Onde: C_{folha} é a concentração do metal na folha em mg/kg e C_{solo} é a concentração do referido metal no sedimento (mg/kg).

2.2.2 Inventário Florístico, estrutural e fenológico da vegetação

Após a coleta e processamento do material botânico, 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 SAMES, VIES e VIC e nos herbários virtuais (<http://reflora.jbrj.gov.br/>) e INCT-HVFF (<http://inct.florabrasil.net/>). Quando necessário, especialistas foram consultados para confirmação da identidade de espécimes. Todas as exsiccatas foram digitalizadas e encontram-se disponibilizadas ao público em geral nos herbários virtuais REFLORA 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>).

Duplicatas foram enviadas aos herbários que possuem pesquisadores vinculados ao projeto. A lista de **espécies inventariadas** está apresentada de acordo com a classificação do APG IV (2016), contendo informações sobre endemismo e raridade, de acordo com literatura específica (FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2024), em construção (GIULIETTI *et al.*, 2009; DUTRA *et al.*, 2015); e estado de ameaça, de acordo com a lista de espécies ameaçadas do Brasil (BRASIL, 2022) e do Espírito Santo (FRAGA *et al.*, 2019; ESPÍRITO SANTO, 2022). Espécies exóticas, naturalizadas e potencialmente invasoras seguiram o conceito de Moro *et al.* (2012) e foram identificadas conforme literatura usual (I3N, 2020).

O **inventário polínico**, das amostras de pólen coletadas de propriedades de apicultura no entorno da Estação 10 (Degredo - Linhares), foi realizado a fim de determinar a origem floral das espécies mais frequentes indicadas pelo estudo fitossociológico em cada estação. Para isso, as amostras foram tratadas quimicamente segundo protocolos anteriormente descritos (LOUVEAUX *et al.*, 1978; JONES e BRYANT, 2004) e, após acetólise (ERDTMAN, 1960), o material foi montado em lâminas. O inventário polínico seguiu o protocolo de Moar (1985). Os tipos de pólen identificados foram classificados de acordo com a frequência de classes propostas por Louveaux *et al.* (1978): pólen predominante (> 45%), pólen secundário (15-45%), pólen importante (3-15%), pólen menor (1-3%) e vestígios pólen (<1%). A identificação dos tipos de pólen foi realizada através de literatura e consulta a especialistas.

Os dados obtidos no levantamento fitossociológico possibilitaram a **caracterização da estrutura da vegetação**, utilizando descritores absolutos e relativos de densidade: dominância, frequência e valor de importância (VI) segundo Brower e Zar (1984), calculados com o auxílio do programa Fitopac.

A frequência possui descritores absolutos e relativos e exprime a distribuição espacial de cada espécie na área, indicando o número de unidades amostrais que uma espécie ocorre em relação ao número total de unidades amostrais. Assim, a frequência absoluta (FA) pode ser calculada através da fórmula:

$$FA = nPe/nTPe,$$

Onde: nPe é o número de parcelas com ocorrência da espécie e T o número total de parcelas.

A frequência relativa (FR) é a relação entre a frequência absoluta de determinada espécie (FAi) e a somatória de frequências absolutas de todas as espécies (ΣFA), obtida através da fórmula:

$$FR = (FAi/\Sigma FA) \cdot 100$$

A Dominância absoluta de espécie (DoA) refere-se à taxa de ocupação do ambiente pelos indivíduos de uma dada espécie por unidade de área, geralmente por hectare, calculada pela equação:

$$DoA = CTxU/A,$$

Onde CT = ΣnCi , n é o número de parcelas, C é a cobertura da espécie por m², U é a área e A é a área total amostrada.

No caso da dominância relativa da espécie (DoR), os valores são obtidos através da fórmula:

$$DoR = 100xDoA/DoT,$$

Onde DoT é a somatória das dominâncias absolutas (m^2/ha) e valor de importância (VI, que é a importância de cada espécie na comunidade, reunindo os critérios de análise dos dois parâmetros: FR e DoR) de cada espécie encontrada (Brower e Zar 1984).

Foi calculado o Índice de Diversidade de Shannon-Weaver para cada comunidade ao longo das estações. Para análise de similaridade utilizou-se o Índice de Similaridade de Sorensen (MÜELLER-DOMBOIS e ELLENBERG, 1974), 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 Sorensen 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-Dombois e Ellenberg (1974).

Para a **fenologia da vegetação**, a partir dos dados obtidos pelas avaliações *in loco*, o percentual médio de cada fenofase em uma dada comunidade foi obtido para ser correlacionado com os dados abióticos, ecofisiológicos e fitossociológicos já obtidos no âmbito do PMBA/Fest-UFES.

Os estágios fenológicos vegetativos e reprodutivos foram definidos de acordo com Morellato *et al.* 1989. Foram tomados dados fenológicos vegetativos e reprodutivos avaliados sob critérios coerentes com a bibliografia (MORELLATO *et al.* 1989). O período de brotamento (i) foi definido como aquele que se inicia com o aparecimento de pequenas folhas membranáceas, brilhantes e com coloração verde clara, alaranjada, amarelada ou avermelhada. A caducifolia (ii) 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 (iii) foi definida como aquela em que as flores estavam com botões ou abertas (antese), sendo o período de frutificação aquele em que os frutos estão totalmente formados, maduros e prontos para a dispersão.

As espécies foram classificadas quanto a síndrome de dispersão adotando duas categorias: (i) dispersão biótica, como sendo aquelas que produzem diásporos providos por uma ou mais características que implicam em um potencial uso pela fauna, como, por exemplo, polpa carnosa e (ii) dispersão abiótica, como sendo aquelas que apresentam características que indicam dispersão por meios abióticos, como sementes aladas, plumas, ausência de características que indiquem algum tipo de dispersão a não ser própria queda, ou sementes providas de frutos com deiscência explosiva (exceto quando contendo sementes com arilos, sarcotesta, etc.). Estas informações foram organizadas em uma matriz contendo a ocorrência de cada espécie por fitofisionomia, a fim de servir como referência em Programas de Recuperação de Área Degradada em Restinga.

2.2.3 Análises bioquímicas e alterações celulares da Restinga monitorada

Para as análises de **Metabólitos primários**, os conteúdos de clorofila de amostras foliares das espécies de cada formação vegetal foram extraídos conforme previamente descrito (LISEC *et al.*, 2006) e determinados por espectrometria (WELLBURN, 1994). Os níveis de amido, sacarose, glicose e frutose foram determinados segundo Fernie *et al.* (2001). Malato e prolina foram determinados como

descrito por Nunes-Nesi *et al.* (2007) e Carillo e Gibon (2011), respectivamente. Proteínas e aminoácidos foram avaliados conforme descrito previamente por Bradford (1976) e Yemm e Cocking (1955). Para determinar possíveis mecanismos de respostas à metais, o conteúdo de metalotioneína foi determinado segundo Viarengo *et al.* (1997) e Erk *et al.* (2002), com modificações.

Para a avaliação das respostas do **Estresse oxidativo**, foram determinadas as atividades das enzimas do sistema antioxidante, conforme descrito em Lima *et al.* (2002) e Pinheiro *et al.* (2004). As respostas do sistema antioxidante não enzimático foram determinadas conforme previamente descrito por Kampfenkel *et al.* (1995), Sarker e Oba (2018) e Pedrete *et al.* (2020), com modificações. Somados a isso, a extensão de danos celulares foi estimada pela quantificação de aldeído malônico (Malondialdeído - MDA) via substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme descrito por Cakmak e Host (1991) e Lima *et al.* (2002), com modificações.

No **Diagnóstico molecular**, sequências de outras espécies são utilizadas como elementos de 'investigação' do acervo (ALTSCHUL *et al.*, 1990), para identificar as regiões candidatas a genes de interesse. As sequências de aminoácidos deduzidas das fases de leitura aberta (*Open Reading Frame* - ORFs) são então comparadas por meio da ferramenta "ClustalW" (THOMPSON *et al.*, 1994). Para a análise da expressão dos genes foi utilizada a metodologia de Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR) quantitativa, que utiliza o kit 'Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG' (Invitrogen) e o termociclador QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).

Para **Alterações celulares**, a avaliação de possíveis alterações genotóxicológicas *in vivo*, na vegetação de Restinga monitorada, foi realizada pela detecção de quebras simples do DNA de espécies selecionadas nas estações amostrais, seguindo o protocolo de Olive (1988). Amostras de folhas foram homogeneizadas e suas células lisadas. Em seguida, as mesmas foram levadas ao banho maria em 60°C por 10 minutos, incubadas por 30 minutos a 4°C, e finalmente centrifugadas por 5 minutos em 8000 *g* à 4°C, tendo seu sobrenadante recolhido. As amostras em conjunto com o reativo de Hoechst foram lidas em placa preta para medição da fluorescência a 360 nm com emissão de 450 nm em espectrofotômetro Spectramax 5.

2.2.4 Microbiota do sedimento associado à vegetação

Os resultados obtidos durante as etapas anteriores do PMBA/Fest-UFES (2018-2022) permitiram a seleção de colônias de microrganismos, isolados de amostras de sedimento e raízes das espécies presentes nas estações amostrais da Restinga, com características de interesse para fitorremediação. Dessa forma, o novo Plano de Trabalho do Tema Restinga, de 2022, buscou a continuidade dessa caracterização *in vitro* quanto à habilidade de produzir compostos relacionados à promoção de crescimento.

Os isolados com melhor desempenho na avaliação quantitativa preliminar foram selecionados para avaliações de outros parâmetros de interesse para mitigação, tais como solubilização de fosfato, produção de quitinase, tolerância à salinidade (crescimento em meio salino) e produção de compostos voláteis capazes de alterar a arquitetura das raízes (SHARIFI e RYU, 2018). Os isolados selecionados

foram repicados em meio ágar triptona de soja (TSA) e incubados em estufa incubadora demanda bioquímica de oxigênio (*Biochemical Oxygen Demand* – BOD) regulada à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ até o crescimento bacteriano cobrir toda a superfície do meio. Após o crescimento, 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°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).

Para a avaliação da produção de compostos voláteis, foi realizada a multiplicação prévia de *Sclerotinia sclerotiorum* em meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) crescido a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 05 dias. As bactérias foram cultivadas em meio líquido (caldo nutriente). Para a montagem do ensaio foram utilizadas placas de Petri bipartidas contendo meio de cultura Ágar Nutriente (AN) em um lado e meio de cultura BDA do outro. No meio BDA foi disposto um disco de *S. sclerotiorum* e no AN foram repicados os isolados bacterianos. As placas foram vedadas e incubadas a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. A avaliação foi realizada quando o tratamento testemunha atingiu o bordo da placa, medindo-se o crescimento fúngico em dois sentidos diametralmente opostos para compostos voláteis. Os resultados foram expressos em crescimento micelial (mm). Como tratamento testemunha, o fungo foi cultivado na ausência dos isolados bacterianos.

O potencial germinativo de sementes das espécies *Canavalia rosea*, *Scaevola plumieri*, *Coccoloba alnifolia*, *Eugenia astringens* e *Myrsine parvifolia* foi avaliado após a desinfestação superficial de todas as sementes, conforme metodologias descritas a seguir: a) *C. rosea* (tratamento 1- controle; tratamento 2- escarificação mecânica e tratamento 3- escarificação mecânica + embebição): as sementes foram dispostas equidistantes em papel germitest umedecido com água destilada na proporção de 3 vezes o peso do papel, incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 h luz/escuro e avaliadas aos 7 e 14 dias b) *S. plumieri*: as sementes foram dispostas em caixas do tipo gerbox contendo vermiculita umedecida e incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12 h luz/escuro e avaliadas aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias;

c) *C. alnifolia* e *E. astringens*: as sementes foram dispostas equidistantes em papel germitest umedecido com água destilada na proporção de 3 vezes o peso do papel, incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ com fotoperíodo de 12h luz/escuro e avaliadas aos 7, 14, 21 e 28 dias; d) *M. parvifolia* (tratamento 1- controle, tratamento 2- escarificação mecânica): as sementes foram dispostas em caixas do tipo gerbox, contendo papel mata-borrão umedecido na proporção de 2,5 vezes o peso do papel, e incubadas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e avaliadas aos 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias.

A fim de determinar a diversidade genética dos microrganismos presentes nos sedimentos das áreas de Restinga monitoradas, o sequenciamento genético de isolados bacterianos selecionados foi realizado através da extração de DNA por lise alcalina (DE BOER e WARD, 1995), seguida pela amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16s (LANE, 1991). Após a extração de DNA, foi realizada a amplificação para os genes *NifH*, *Deg ACC5'3'*, *acdS*, *acc*, *ACC 4b*, *168IR RS* e *DSM 36 IF STOP*, na busca pela detecção de genes para fixação de N_2 , produção de auxinas e produção de ACC Deaminases.

2.2.5 Identificação da causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação de metais em espécies da Restinga

2.2.5.1 Ensaios com extrato solubilizado em espécies modelos

O efeito dos contaminantes presentes no sedimento das áreas de Restinga monitoradas no âmbito do PMBA/Fest-UFES, sobre o desenvolvimento de espécies vegetais modelo, foi avaliado sob condições *in vitro*. Para isso, sementes de *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* foram submetidas a tratamento com o extrato solubilizado do sedimento coletado em cada estação amostral da Restinga, obtido seguindo as normas da ABNT NBR ISO 10006 (ABNT, 2004).

Para obtenção do solubilizado, amostras de sedimento foram secas em estufa à temperatura de 42°C , peneiradas em malha de 9,5 mm e, em seguida, foram adicionados 12,5 g de amostra seca em 50 mL de água ultrapura. A solução foi agitada em baixa velocidade (180 rpm) por 5 min e mantida em repouso por 7 dias na temperatura de 25°C . O sobrenadante foi filtrado em membrana filtrante com $0,45\ \mu\text{m}$ de porosidade e, em seguida, foi realizada a medição dos parâmetros abióticos por meio do Medidor multiparâmetro Hanna HI991300. A solução foi armazenada sob refrigeração (-6°C) até o teste com o bioensaio.

Os ensaios seguiram o protocolo de Fiskesjö (1985), com modificações (ARAGÃO *et al.*, 2021), nos quais 50 sementes de *Allium cepa* da variedade Baia Periforme (lote 153901) e 50 sementes de *Lactuca sativa* da variedade Crespa repolhuda (lote 160531) foram distribuídas em placas de Petri forradas com papel filtro contendo os tratamentos do solubilizado à temperatura de 24°C , das seis estações amostrais. Para controle positivo, uma solução de metil-metanosulfonato (MMS) 4×10^{-4} mM foi utilizada; e para o controle negativo, foi utilizado água ultrapura. Os experimentos seguiram um delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

Após 48h de exposição aos tratamentos, foi realizada a contagem do número de sementes germinadas de *L. sativa* L., para determinação da porcentagem de germinação, e a medição das raízes com auxílio de paquímetro digital, para quantificação do crescimento radicular (SILVEIRA *et al.* 2017). Tanto a porcentagem de germinação quanto o crescimento radicular são parâmetros que podem indicar o **efeito fitotóxico** dos tratamentos (SANTOS *et al.*, 2022).

Após 96h do experimento, as raízes de *A. cepa* L. foram coletadas e fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético v/v) por, no mínimo, 24h. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram lavados com água destilada e submetidos à hidrólise ácida em HCl 1N (60°C) durante 8 minutos (ARAGÃO *et al.* 2021). A coloração foi efetuada conforme o método convencional de Feulgen (FEULGEN e ROSSENBECK, 1924; MELLO e VIDAL, 1978). Diferentes parâmetros foram representativos para os efeitos toxicogenético dos tratamentos. A **citotoxicidade** foi avaliada por meio do índice mitótico, determinado pela razão do número de células em divisão (intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células analisadas. A **genotoxicidade** é um parâmetro que pode ser avaliado pelas alterações cromossômicas (AC) e alterações nucleares (AN) (SANTOS *et al.*, 2022). No presente estudo, considera-se como AC: ponte, atraso, perda, quebra, c-metáfase, anáfase multipolar e aderência; e AN como broto e núcleo lobulado, sendo tal parâmetro determinado pela razão do número de alterações pelo total de células analisadas. Para a análise da **mutagenicidade** foi avaliada a razão entre o número de células com micronúcleo pelo total de células analisadas (SANTOS *et al.*, 2022; SANTOS *et al.*, 2023).

2.2.5.2 Ensaios com extrato solubilizado em espécies de Restinga

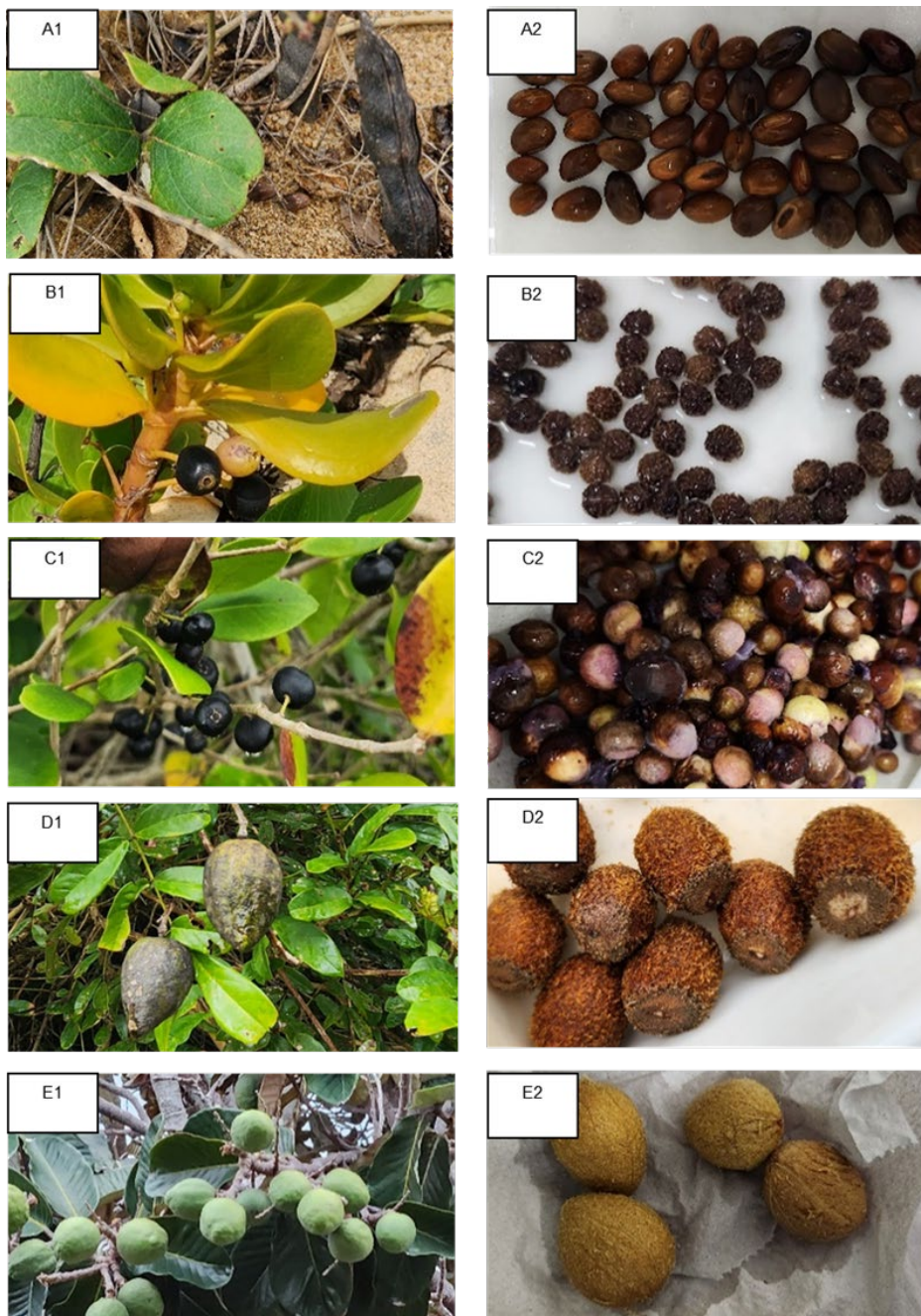
A fim de avaliar a respostas de plantas de Restinga, frutos de espécies representativas da Restinga foram coletados nas estações monitoradas e levados ao Núcleo de Estudos da Fotossíntese (NEF) na Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Goiabeiras, Vitória, ES (Figura 2). Os frutos foram despulpados com auxílio de peneira, e as sementes desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio (SILVA *et al.*, 2017). Para a quebra de dormência, as sementes foram embebidas em água a temperatura ambiente por 48 horas de acordo com metodologia proposta por Cunha (2005) e, quando necessário, escarificadas mecanicamente (eliminação parcial do tegumento na região oposta ao hilo) (COSTA *et al.*, 2013).

Adotou-se o método de germinação sobre papel em caixa de plástico (“gerbox”) para as sementes de *C. rosea* e germinação sob areia lavada para as sementes de *S. plumieri*, *E. astringens*, *Andira fraxinifolia* e *Couepia schottii*. As variáveis calculadas foram as seguintes:

- Germinação (G): calculada pela fórmula $G = (N/100) \times 100$, em que: N = número de sementes germinadas ao final do teste. Unidade: %.
- Índice de velocidade de germinação (IVG): calculado pela fórmula $IVG = \sum(n_i/t_i)$, em que: n_i = número de sementes que germinaram no tempo “i”; t_i = tempo após instalação do teste; Unidade: adimensional.
- Tempo médio de germinação (TMG): calculado pela fórmula $TMG = (\sum n_i t_i) / \sum n_i$, em que: n_i = número de sementes germinadas por dia; t_i = tempo de incubação; Unidade: dias.

- Velocidade média de germinação (VMG): calculada pela fórmula $VMG = 1/t$ em que: t = tempo médio de germinação. Unidade: dias-1.

Figura 2: Frutos encontrados nas áreas amostrais da Restinga e suas respectivas sementes tratadas no laboratório, onde: A1 e A2 – *C. rosea*; B1 e B2 – *S. plumieri*; C1 e C2 – *E. astringens*; D1 e D2 – *A. fraxinifolia*; E1 e E2 – *C. schottii*.



Para a Identificação da causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação de metais, sementes das espécies de interesse foram cultivadas em areia lavada, sendo irrigadas diariamente, na área experimental do Setor de Botânica da Universidade Federal do Espírito Santo (campus Goiabeiras). Dez dias após o plantio, as plantas passaram a receber a cada dois dias 100 mL de extrato solubilizado de sedimento de estações monitoradas nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300% (três plantas para cada concentração) durante 45 dias.

Para a obtenção do extrato solubilizado do sedimento, alíquotas de 15 g de amostra de solo seco, coletado nas estações amostrais, foram colocadas em frascos de 100 mL, nos quais foram adicionados 60 mL de água ultrapura, e processadas segundo metodologia prévias (NBR 10006, 2004; NBR 10007, 2004 e POHREN *et al.*, 2013). Amostras do extrato foram submetidas a avaliação da concentração de elementos traço.

A capacidade de resposta da vegetação por propagação vegetativa também foi avaliada. Estacas de plantas da vegetação herbácea, arbustiva e arbórea de interesse foram cultivadas em potes de 5 L ou bandejas de polietileno de 12 L, conforme suas características morfológicas. Após o período de estabelecimento, dependendo das particularidades fenológicas de cada espécie, as plantas foram submetidas aos tratamentos de extrato solubilizado do solo, como acima descrito, com no mínimo três plantas para cada concentração.

2.2.5.3 Ensaios dose-resposta à contaminação por metais em espécies de Restinga

Espécies selecionadas em etapas anteriores foram submetidas a ensaios de dose-resposta de concentrações crescentes de metais, sendo utilizada como base a solução nutritiva proposta por Hoagland e Arnon (1950). Para a quebra da dormência, sementes foram inicialmente colocadas em caixa plástica contendo papel filtro embebido em água ultrapura até a germinação. Após a emissão das primeiras raízes, as sementes foram transferidas para vasos individuais de 500 mL contendo areia lavada. A areia foi escolhida como substrato por sua capacidade de drenagem e aeração adequadas, proporcionando um ambiente favorável para o desenvolvimento das raízes das plântulas. Após o transplante, as sementes foram irrigadas com água ultrapura, até a abertura completa das folhas cotiledonares das plântulas. Nos ensaios de dose-resposta foi utilizado um arranjo experimental completamente ao acaso, com três repetições, e cada tratamento contendo três plantas. Plantas jovens foram submetidas a diferentes concentrações de zinco (100, 200 e 400 μM), manganês (500, 1000, 2000 μM) e cobre (25, 50 e 100 μM) e comparadas a plantas controles, irrigadas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) contendo concentrações de 1,15 μM de Cu, 18 μM de Mn e 1,5 μM de Zn. Em ambos os ensaios (Bioensaios com extratos solubilizados do sedimento e Avaliação da dose-resposta), as respostas das diferentes espécies selecionadas foram avaliadas ao longo de dois meses para a determinação da extensão do dano aos seus sistemas biológicos (atividade fotossintética, por meio da fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e teores de pigmentos). Após este período, amostras de tecido vegetal e sedimento foram coletadas para a determinação da concentração de elementos traços no sedimento de cultivo e tecidos vegetais das espécies selecionadas. Análises de componentes do sistema oxidativo também foram realizadas, seguindo protocolos anteriormente descritos neste documento. Metabólitos antioxidantes e a Capacidade antioxidante total (AAT) foram estimados pelo método de redução do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP*) e/ou pelo método do sequestro do radical α, α -difetil- β -picrilhidrazila (DPPH) de acordo com as espécies e tecidos vegetais analisados (DOWD, 1959; RUFINO *et al.*, 2006; TEXEIRA *et al.* 2008; MELO, 2022; PIRES *et al.* 2017).

2.2.6 Análise de dados e determinação da Situação de Risco e Alerta de Perigo

De posse dos dados referentes aos atributos físico-químicos do ambiente e dos parâmetros biológicos da vegetação, testes estatísticos foram realizados a fim de verificar as possíveis relações entre variáveis respostas, como parâmetros florísticos, estruturais e ecofisiológicos da flora da Restinga e variáveis de causa, como concentrações dos elementos químicos associados ao MLD, bem como campanhas de amostragem e formações vegetais. As análises estatísticas realizadas (Análise de Variância, Análises multivariadas - Análise de Componentes principais, e Análises de Correlação) permitiram a seleção de parâmetros bióticos que responderam aos efeitos da contaminação por metais.

Em virtude da ausência de informações pretéritas robustas, sobre parâmetros biológicos e concentrações de metais, que pudessem ser utilizadas como comparativo, ou de índices que não utilizem pontos “controle” para seu cálculo, a “Situação de risco” determina a variação intrínseca de cada parâmetro correspondente aos períodos de avaliação.

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. 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 assim 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 (Quadro 1).

Quadro 1: 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 formação vegetal, por estação e por período.

Para cada parâmetro biótico foram determinadas três categorias de Situação de Risco: Alto, Moderado e Baixo. A classificação de cada parâmetro 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 possibilita a integração dos dados resultantes da Situação de Risco das diferentes categorias de resposta biológica, sendo uma representação conclusiva e sintética que responde acerca do *status* de Vitalidade da vegetação, principal indicador biológico do Tema Restinga. Ele é determinado a partir do cálculo do percentual de parâmetros selecionados que se encontram em situação de alto risco em uma determinada estação e formação. Quando 50% ou mais dos parâmetros se encontram em alto risco em um determinado ponto de coleta, assume-se que aquele ponto esteja em perigo, como pode ser representado a seguir:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de indicadores em Situação de risco ALTO}}{\text{número de indicadores}} * 100 \geq 50\%$$

Assim, se as condições da equação são cumpridas, há um Alerta de Perigo local.

Vale ressaltar, que a Vitalidade da Vegetação na fisionomia arbórea da Estação E9 (Mar Azul - Aracruz) apresentou riqueza e estrutura peculiares em relação às demais estações amostrais e, por essa razão, não foi comparada às demais estações. Os dados obtidos para esta fisionomia são restritos a fenologia (floração e frutificação) das espécies monitoradas. A produtividade primária, o estresse oxidativo e o metabolismo primário, assim como a fenologia, foram obtidos apenas para as fisionomias herbácea e arbustiva desta estação, permitindo comparações de Vitalidade da Vegetação com as outras estações monitoradas.

2.2.7 Monitoramento da Restinga via sensoriamento remoto

Para o monitoramento das áreas de Restinga via sensoriamento remoto, foram utilizadas imagens adquiridas na forma de produtos Landsat, corrigidas para efeitos geométricos e atmosféricos, disponibilizadas pelo Serviço Geológico dos Estados Unidos (USGS, www.earthexplorer.org). Além destas, foram obtidas imagens MODIS (*Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer*), com uma combinação de 16 dias de imagens de reflectância de superfície, agregadas e disponibilizadas em

intervalos de 8 dias. A época seca foi definida como mais adequada por apresentar menor cobertura de nuvens e maior contraste na fenologia da vegetação no gradiente Leste-Oeste.

A avaliação da resposta fenológica inclui o índice de vegetação de duas bandas *Enhanced Vegetation Index 2* (EVI 2) (JIANG *et al.*, 2008). Para a comparação dos valores, selecionaram-se três pontos em cada fitofisionomia reconhecida na região: arbustiva e arbórea. A escala impossibilitou a análise da formação herbácea, que foi avaliada *in loco*.

A partir das imagens do satélite Sentinel e sensores da série Landsat (ZANZARINI *et al.*, 2013) são produzidos mapas de uso e cobertura da terra para as diferentes estações amostrais da Restinga afetada, por meio de ferramentas de visualização de séries temporais, como a MODIS (FREITAS *et al.*, 2011). Foram extraídos alguns índices de vegetação em séries temporais de imagens dos sistemas orbitais (NDVI - *Normalized Difference Vegetation Index*, PRI - *Photochemical Reflectance Index* e CO₂ Flux) e de cobertura da terra, para a correlação com os parâmetros fitossociológicos, florísticos e ecofisiológicos. Para o monitoramento com imagens orbitais e criação de série temporal que permitem informações do EVI (*Enhanced Vegetation Index*), foi utilizado o Sistema SATVeg (Sistema de Análise Temporal de Vegetação) da EMBRAPA, contemplando os anos de 2015 (ano do Rompimento da Barragem de Fundão) e o intervalo entre 2018 e 2024 (período de monitoramento pelo PMBA/Fest-UFES). A estimativa com imagens temporais do sensor Modis avaliou os períodos seco e chuvoso. Para o EVI, os valores variam de -1 a +1 e, para vegetação saudável, variam entre 0,2 e 0,8. A partir destes, o sequestro de carbono pela vegetação depende da integração de dois índices (NDVI e PRI), que geram um novo índice: o CO₂ flux (RAHMAN *et al.*, 2000). Estes resultados, obtidos da superfície terrestre ao longo do tempo, nos períodos pré e pós rompimento da Barragem de Fundão, auxiliaram na determinação do declínio dos ecossistemas analisados dentro dos últimos 50 anos, bem como na avaliação dos diferentes estágios de regeneração nas estações amostrais analisadas.

2.2.8 Estratégias para divulgação científica e popularização da ciência para conservação da Restinga

A divulgação dos resultados do monitoramento da Restinga obtidos durante o monitoramento e a popularização da ciência são estratégias de promoção da conservação do ecossistema Restinga. Para melhorar o alcance dos resultados, foi elaborado um manual de identificação das espécies encontradas nas estações amostrais, através do banco de imagens digital e literatura especializada. O critério de escolha das espécies levou em conta a dominância, a raridade e o status de conservação das espécies encontradas nas estações. O layout foi elaborado no software Canva.

A segunda estratégia de divulgação dos resultados incluiu a coleta, preparação e incorporação de frutos e sementes na carpoteca, oriundos das estações amostrais avaliadas durante o monitoramento. Os propágulos foram descontaminados a fim de constituírem a coleção didática do Herbário VIES, destinada aos projetos de extensão que atendem escolas e a comunidade geral. Somado a isso, folders foram produzidos a fim de popularizar as temáticas envolvendo (i) a conservação do ecossistema Restinga, (ii) a proteção de espécies ameaçadas encontradas na Restinga do rio Doce, (iii) o reconhecimento e os malefícios causados por espécies exóticas invasoras e (iv) a divulgação de um

canal de comunicação destinado a aumentar os registros de espécies pouco conhecidas na Restinga do rio Doce, através da ciência cidadã.

2.3 HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS

O monitoramento da Restinga no âmbito do PMBA/Fest-UFES se iniciou com coletas do inventário florístico e observações fenológicas e, após identificação e definição das espécies a serem avaliadas por meio das análises fitossociológicas, as análises ecofisiológicas 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, por estar situada em uma região com predomínio de enseadas abrigadas e intercaladas por falésias. A área amostral é caracterizada por conter Restinga com formação herbácea inconspícua, sob frequente abrasamento das ondas. A formação arbustiva é fechada e, algumas vezes, tão estreita que pode ser confundida com a formação arbórea. Assim, as características peculiares desta estação, principalmente o fraco desenvolvimento da formação herbácea, impediram comparações de sua estrutura de comunidades com as outras estações amostrais, sendo realizados somente o inventário florístico e as análises ecofisiológicas.

Para o inventário taxonômico e o inventário da estrutura da comunidade, houve redução do período amostral. O Plano de trabalho de 2018 contemplou análises fenológicas mensais, que foram reprogramadas para serem analisadas trimestralmente após 2022. Para o Novo Plano de Trabalho, a avaliação fenológica das comunidades vegetais foi também realizada por análise de imagens de satélite, a fim de avaliar resposta fenológica por meio de índices de vegetação, permitindo comparações dos resultados entre série histórica do PMBA/Fest-UFES e anteriores ao rompimento da Barragem de Fundão.

As análises relacionadas ao depósito de material sobre as folhas das plantas da Restinga ("Spray"), provenientes do aerossol marinho, foram analisadas em um primeiro momento no Ano 1 e retomadas a partir do período Seco do Ano 3, com nova metodologia, sendo realizadas por outro laboratório, a fim de contornar entraves logísticos e garantir a celeridade das análises.

Para as análises de estruturas reprodutivas e recursos/recompensas florais das espécies-chave selecionadas nas estações amostrais, a coleta de pistilos e estames tornou-se inviável devido à quantidade de flores que seriam necessárias para obter uma amostra. Como o inventário polínico pode indicar a presença das espécies com maior valor de importância e a análise química de pólen e mel pode indicar traços de contaminação, cujos valores de referência são reconhecidos pelo poder público, não houve a necessidade de analisar estruturas reprodutivas.

Dessa forma, a análise de néctar foi realizada por meio do mel (que é um produto produzido pelas abelhas a partir do néctar recolhido de flores) coletado em propriedades de apicultores na Comunidade Quilombola de Degredo, município de Linhares, próximo à área amostral de monitoramento da Restinga em Degredo (E10). Essa decisão foi tomada, principalmente, após publicação do estudo de contaminação de pólen e néctar na região de Mariana e Barra Longa, publicado por Rangel *et al.* (2022), que se tornou uma referência para comparação dos nossos dados. A análise de elementos químicos

foi restrita a pólen e mel (que são provenientes de androceu e gineceu das plantas) por estes parâmetros serem suficientes para comparar os resultados com valores de referência reconhecidos pelo poder público. A ausência de coletas na localidade de Meleiras/Conceição da Barra justifica-se em função da carência de uma associação de apicultores na região. Esta área foi inserida preliminarmente como área alternativa de estudo, mas limitações de ocorrência reconhecida de uma associação impediram a extensão do estudo até a região.

As análises físicas do sedimento apresentaram mudança de metodologia para o Plano de Trabalho de 2022. Anteriormente, as análises eram realizadas por um laboratório de análise de solos e, atualmente, a fim de melhor integrar os resultados entre temas do Ambiente Costeiro, as análises estão sendo realizadas pelo laboratório de sedimentologia participante do PMBA/Fest-UFES. A adoção de metodologias distintas requer a adaptação e alinhamento do tratamento dos resultados.

As amostras de solo/sedimento do Tema Restinga foram analisadas durante o período de outubro de 2018 a julho de 2022 pelo Laboratório de Física do Solo, na Universidade Federal de Viçosa (CRP - UFV). A partir do novo ciclo, as amostras passaram a ser analisadas pelo Laboratório de Geomorfologia e Sedimentologia Costeira (LAGES), na UFES, que integra o PMBA/Fest-UFES no Tema Praias, sob coordenação da Prof. Dra. Jacqueline Albino. Os resultados processados pelo LAGES apresentaram diferenças em relação à frequência granulométrica encontrada anteriormente, especificamente na fração lamosa (<62.5 mm), em relação à abundância da lama e a distinção entre as subfrações de silte e argila, o que anteriormente era realizado na UFV. A diferença diz respeito ao uso de métodos distintos utilizados para as análises da granulometria da fração fina, anteriormente realizadas pelo método de pipetagem na UFV e sem pré-processamento de lavagem. O LAGES usualmente realiza a granulometria da fração fina por meio de um granulômetro a laser, no qual a amostra é previamente lavada e a matéria orgânica é queimada.

Uma vez que a fração lamosa da Restinga é composta majoritariamente por matéria orgânica, e não por minerais siliciclásticos, grande parte é perdida no momento de lavagem e queima, impossibilitando a quantificação desta fração pelo granulômetro a laser. Isto ocorre, pois, o método de análise granulométrica de sedimento é realizado apenas para minerais, diferente da análise de solo. Nesta metodologia, a matéria orgânica pode ser quantificada, justamente através do processo de queima, entretanto, não é usual identificar o tamanho das partículas desta matéria, já que são compostos de agregados orgânicos.

Em relação às análises da Microbiota do sedimento, no novo Plano de Trabalho, a continuidade da caracterização *in vitro* relacionada a “Identificação dos promotores na microbiota do sedimento”, proposta no Plano de trabalho de 2018, foi executada quanto a aspectos relacionados à promoção do crescimento vegetal e capacidade fitorremediadora.

Para as análises de alterações do ciclo celular (ecotoxicologia), nas coletas de outubro/2022 e janeiro/2023 foram coletadas raízes de espécies representativas da Restinga, fixadas em solução Carnoy para analisar a citogenotoxicidade *in situ*. A metodologia foi modificada e aplicada, porém, não foi efetiva em razão do tamanho dos cromossomos das espécies avaliadas (~4,5 µm). Por se tratarem

de plantas com pouca ou nenhuma informação disponível na literatura acerca da viabilidade da metodologia, não foi possível a conclusão da análise proposta. A dificuldade foi contornada pelo uso do já bem estabelecido modelo vegetal *Allium cepa*, que possui cromossomos maiores (~12 µm), viabilizando a análise eficiente de possíveis alterações. Pelo mesmo motivo, os ensaios de citogenética a partir dos tratamentos com extrato solubilizado do sedimento foram inviabilizados para análises em espécies de Restinga. Assim, a metodologia de citogenotoxicidade seguiu novo protocolo, a partir de modelos vegetais de *Allium cepa* (cebola) e *Lactuca sativa* (alface) expostos ao extrato solubilizado do sedimento das estações amostrais na concentração de 250g/L, permitindo a avaliação de possíveis alterações de espécies vegetais em resposta a contaminação das restingas monitoradas.

Em razão disto, a análise de genotoxicidade nas espécies *in situ* se deu exclusivamente por meio do teste denominado DNA *Strand Break*, o qual quantifica as quebras simples no material genético, realizado nas folhas das plantas. Foram utilizadas folhas de plantas da formação herbácea coletadas no Novo Ciclo do PMBA/Fest-UFES.

A partir de 2024, os parâmetros das alterações nos cromossomos e nos núcleos das células foram alterados para uma melhor interpretação. Assim, a “Frequência das alterações cromossômicas e nucleares” e “Frequência de células com micronúcleo” foram alteradas para “Frequência de alterações cromossômicas” e “Frequências de alterações nucleares”. As alterações cromossômicas e nucleares demonstram a genotoxicidade do tratamento, e a separação das alterações foi necessária para discriminar melhor os danos. Isso porque a genotoxicidade pode ocasionar a mutagenicidade. Dentro das alterações nucleares, há células com broto, células com núcleos lobulados e células com micronúcleo e apenas este último é considerado um biomarcador da mutagenicidade, pois é o endpoint das alterações. Os núcleos lobulados e o broto podem ser incorporados pela célula, mas quando isso não acontece, há uma expulsão do material genético e origina o micronúcleo. De outra maneira, o micronúcleo pode ser formado a partir de alterações cromossômicas como perda cromossômica e quebra cromossômica. Quando o mecanismo de reparo das células não corrige as alterações ou corrige incorretamente, o dano é fixado podendo formar o micronúcleo, o qual pode ser passado para as células filhas no momento da divisão celular. Assim, os parâmetros serão mais explicativos com as denominações “Frequência de alterações cromossômicas” e “Frequências de alterações nucleares”, descrevendo assim também as células com micronúcleo (mutagenicidade).

Ainda para o novo plano de trabalho, tanto as metodologias de monitoramento da capacidade de recuperação da vegetação quanto a avaliação da microbiota do solo utilizada durante os anos de monitoramento permitiram a entrega de interessantes resultados, embora algumas etapas não puderam ser atingidas, como o cultivo protegido de plantas de Restinga colonizadas por microbiota de interesse. Somados a isso, a propagação vegetativa e reprodutiva e nível de tolerância aos elementos traços do MLD foram adaptados em relação à obtenção do material de estudo. Na metodologia anterior o material utilizado era proveniente do banco de sementes a partir da coleta de amostras de frações do solo coletadas em campo. Para o Novo Ciclo, as sementes utilizadas foram provenientes de frutos de espécies de interesse do monitoramento, permitindo um direcionamento da análise com foco naquelas

de elevada importância ecológica. Bioensaios para a determinação da relação causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação de metais em espécies de Restinga foram realizados a partir de extratos solubilizados do solo. Além disso, a avaliação de danos aos sistemas biológicos/bioquímicos também foi realizada em plantas sob cultivo protegido, com a aplicação crescente de metais cujo impacto biológico no monitoramento *in situ* foi recorrente (manganês, cobre e zinco).

2.4 ALTERAÇÕES NA MALHA, FREQUÊNCIA AMOSTRAL E ESCOPO REALIZADAS EM OUTUBRO DE 2024: CONSEQUÊNCIAS PARA AS ANÁLISES DA SÉRIE HISTÓRICA DE INDICADORES

Durante a execução do monitoramento do Tema Restinga, com a implementação do novo plano de trabalho, vigente a partir de outubro de 2024, houve o ajuste na malha amostral originalmente estabelecida, consistindo em: (i) exclusão da formação arbórea, mantendo-se apenas as formações herbácea e arbustiva; e (ii) descontinuidade da estação Barra Nova (E4).

Além disto, conforme a deliberação CIF nº 803, referente ao Décimo aditivo, foram excluídas as atividades de análises de contaminação de pólen e mel, bem como do inventário polínico (incluídas na Meta 1 do Plano de trabalho), de sensoriamento remoto (Meta 2 do Plano de Trabalho), e de identificação dos efeitos promotores da microbiota do sedimento no crescimento vegetal, além do cultivo *ex-situ* para o Tema Restinga (ambos incluídos na Meta 3 do Plano de trabalho).

Importante destacar que as demais análises permanecem sendo realizadas conforme os protocolos já estabelecidos e continuam a ser aplicadas a todas as estações e formações vegetais atualmente monitoradas. As alterações realizadas não implicaram mudanças metodológicas nos indicadores avaliados, tendo em vista a independência em termos de estação amostral ou formação vegetal, mas impactaram a possibilidade de atualização da série histórica em relação aos pontos e formações excluídos.

Uma vez que as análises são realizadas de forma similar em todas as formações e estações, nenhuma variável ou indicador deixou de ser calculado.

No entanto, os resultados referentes à formação arbórea e à estação Barra Nova (E4) não puderam ser atualizados a partir do momento da exclusão, interrompendo a série temporal associada a essas porções da malha amostral. A série histórica segue sendo atualizada normalmente para as demais estações e formações vegetais remanescentes.

A retirada da formação arbórea no escopo do monitoramento deixa de fornecer dados robustos e representativos do sistema, afetando a proposição de conclusões para o Ecossistema Restinga de toda a extensão analisada. A descontinuidade da estação E4 inviabilizou sua amostragem sistemática e comprometeu a integridade da série temporal nessa área. Essa interrupção limita análises comparativas diretas com os períodos anteriores especificamente nesses recortes.

Contudo, a permanência das demais formações (herbácea e arbustiva) e estações garante a continuidade e comparabilidade da série histórica principal, assegurando que o monitoramento dê resultados suficientes para detectar variações espaciais e temporais dos indicadores do Tema.

Para o Tema Restinga não houve a adição de novas estações amostrais ou reposicionamento.

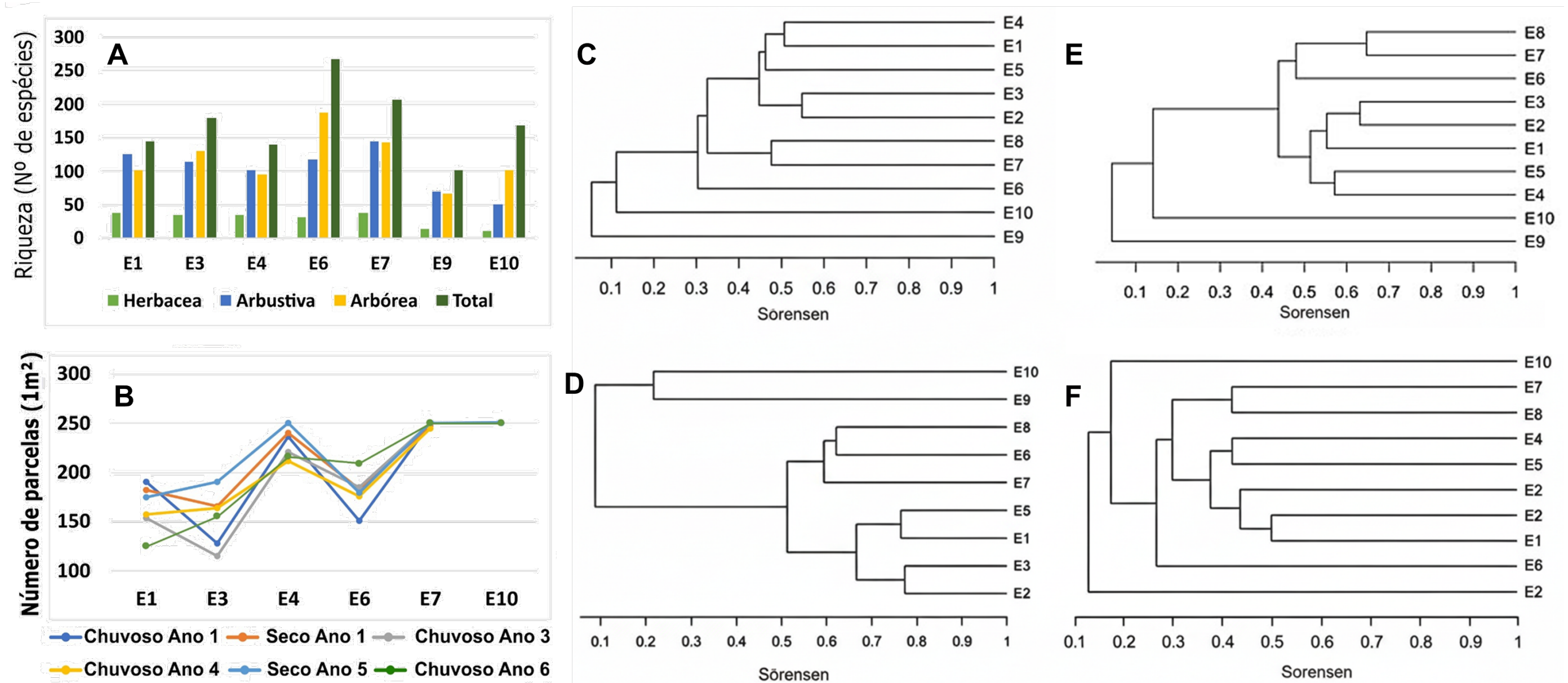
3 RESULTADOS DOS INDICADORES

Nesta seção serão apresentados os resultados dos indicadores de qualidade ambiental e da biodiversidade aquática do Tema, os quais foram desenvolvidos pelo PMBA/Fest-UFES e obtidos ao longo de todo monitoramento na área ambiental I. Vale ressaltar que, os indicadores aqui apresentados têm como propósito clarificar e sintetizar a historicidade dos resultados, interpretação e conclusões do monitoramento, promovendo o acompanhamento espaço-temporal da qualidade ambiental e biodiversidade, além de configurarem importantes ferramentas de suporte aos gestores ambientais. A partir destes indicadores, pode-se identificar os impactos com relação direta ou indireta ao rompimento da Barragem de Fundão, em Mariana (MG).

Os indicadores do PMBA/Fest-UFES vêm se consolidando ao longo do monitoramento e, seguindo a proposta estabelecida desde o Relatório Anual de 2022 (RA2022), a apresentação dos resultados será exclusivamente a partir da apresentação dos indicadores, acompanhados de legenda estendida com a explicação de sua variação espaço-temporal de forma mais direta e objetiva como se segue:

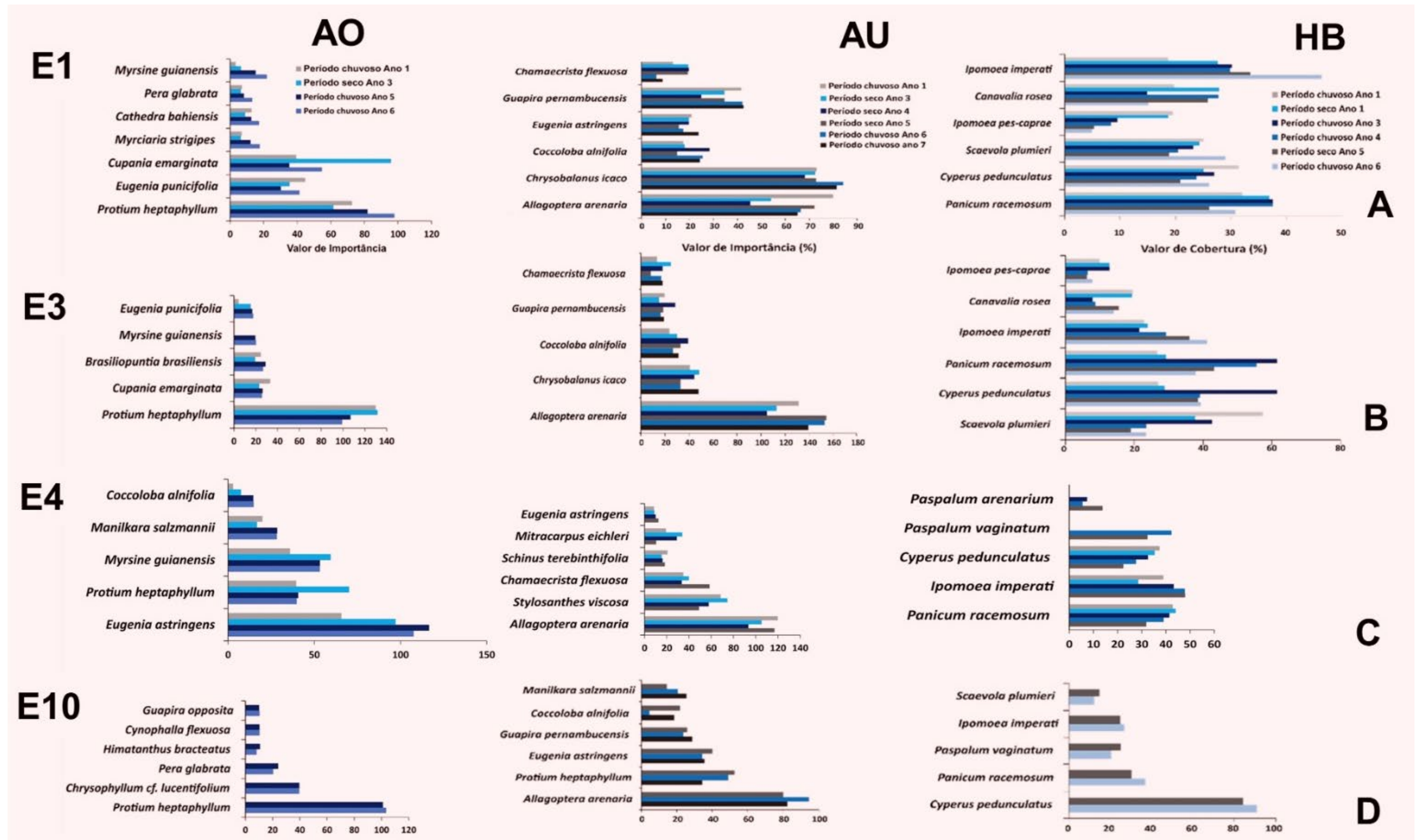
3.1 VITALIDADE DA VEGETAÇÃO

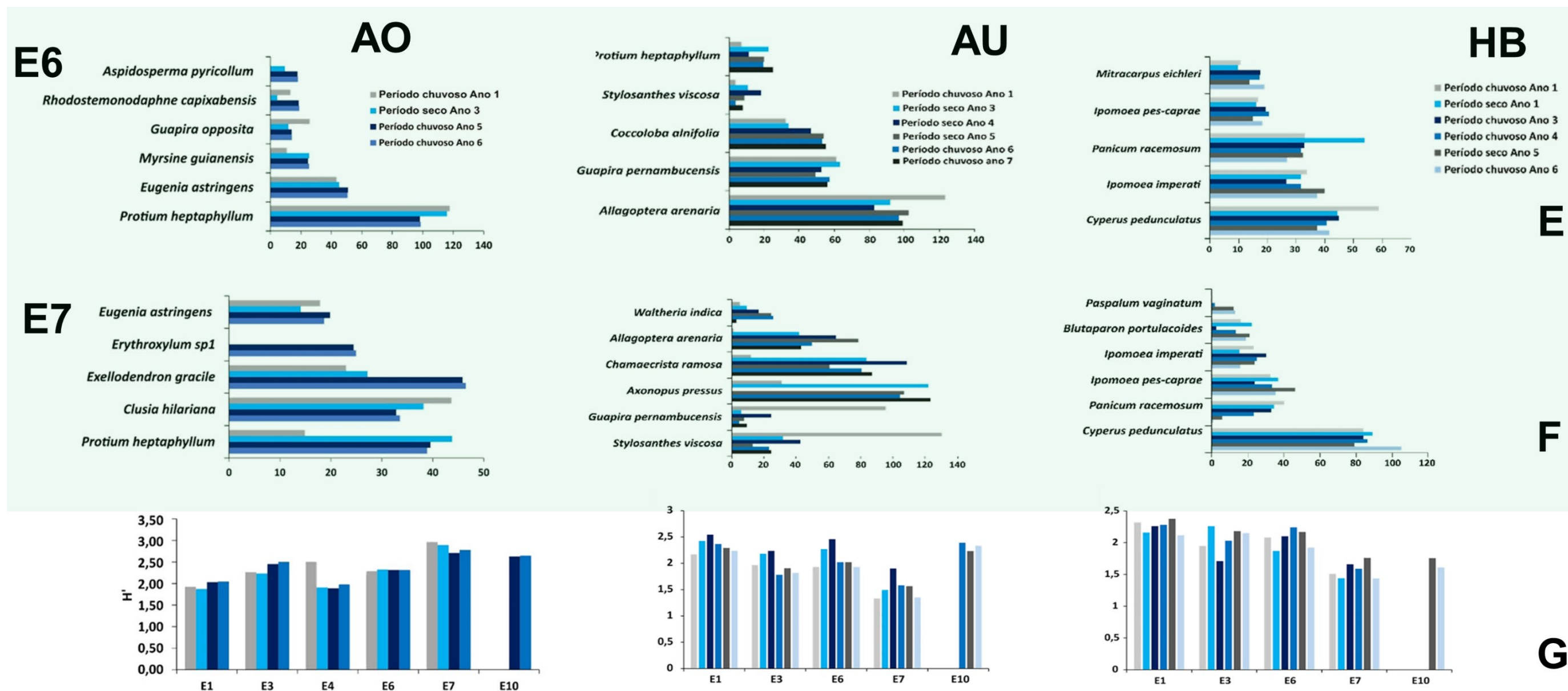
Figura 3: Resultados espaço-temporais dos parâmetros florístico-fitosociológicos avaliados em cada formação vegetal (HB = Herbácea; AU = Arbustiva; AO = Arbórea) de Restinga monitorada no PMBA/Fest-UFES entre períodos Chuvoso Ano 1 (2018) a Chuvoso Ano 7 (março de 2025). Riqueza florística das formações vegetais entre as estações amostrais (A); Variação espaço-temporal do número de parcelas na formação herbácea entre estações amostrais monitoradas (B); Similaridade florística entre estações amostrais (C), para a formação herbácea (D), formação arbustiva (E) e formação arbórea (F). Para o novo escopo, vigente a partir de outubro de 2024 (Chuvoso Ano7), foram excluídas as análises da formação arbórea e da Estação Barra Nova (E4).



Os resultados da compartimentação do litoral são expressos pelo dendrograma de riqueza florística entre as estações (Figura 3C). As estações Cacimbas (E6) e REBio Comboios (E7), do Compartimento B', se destacam por sua concentração de espécies, seguidas pelos Compartimentos C, entre a APA Conceição da Barra (E1) e Degredo (E10), e A, em Mar Azul (E9) (Figura 3A). A similaridade florística, sumarizada pela formação arbórea até o Ano 6, mostrou posicionamento intermediário de E10 em relação às vegetações de Restinga dos Compartimentos B' e C (Figura 3F). A particularidade dos Compartimentos A e C é validada pelas espécies exclusivas na formação arbustiva (Figura 3E) ou ausência de espécies na formação herbácea (Figura 3D). Apesar da hierarquia das espécies acompanhar as tendências de variação observadas ao longo do monitoramento, houve piora na taxa de cobertura da vegetação sobre as dunas (Figura 3B) dentro do Compartimento C, incluindo forte abrasão em E1. Apesar disso, os dados atuais não indicaram desmoronamentos pontuais (Blowouts) na duna frontal que permitissem o alcance das ondas nos trechos mais estabilizados, outrora documentado neste setor, com consequente desestruturação da duna semifixa onde desenvolve-se *Mitracarpus eichlerii* (uma espécie ameaçada de extinção).

Figura 4: Resultados espaço-temporais do valor de importância das principais espécies amostradas das formações vegetais (HB = Herbácea; AU = Arbustiva; AO = Arbórea) de Restinga monitorada no PMBA/Fest-UFES entre períodos Chuvoso Ano 1 (2018) a Chuvoso Ano 7 (2025) entre estações amostrais dos compartimentos da região costeira do Espírito Santo (A a F). Retângulo em Vermelho: Compartimento C; Retângulo em Verde: Compartimento B'. Diversidade de Shannon das formações vegetais entre estações amostrais (L); Variação espaço-temporal do número de parcelas na formação herbácea entre estações amostrais monitoradas (G). Para o novo escopo, vigente a partir de outubro de 2024 (Chuvoso Ano7), foram excluídas as análises da formação arbórea e da Estação Barra Nova (E4).





Para o Ano 7, os valores de importância encontrados nos Compartimentos B' e C seguiram, no geral, a tendência encontrada nas avaliações dos anos anteriores para as formações arbustiva, com alterações pouco aparentes. Porém, duas mudanças marcantes são observadas: a) um declínio acentuado na importância relativa de *Waltheria indica* na formação arbustiva em E7 em relação ao Ano 6 (Figura 4F); e b) incremento substancial no valor de importância de *Coccoloba alnifolia* na formação arbustiva em E10 (Figura 4D). Na comunidade herbácea do Compartimento B, os dados obtidos no Ano 6 destacaram aumento dos valores de importância de *Cyperus pedunculatus* na REBio Comboios (E7), resultado associado com sua alta capacidade de colonização no sentido do mar, durante períodos de menor abrasão (Figura 4F). Mesmo apresentando distorções pontuais ao longo do monitoramento, os dados deste setor indicaram estabilidade na hierarquia específica e respostas coerentes com a dinâmica de praia esperada.

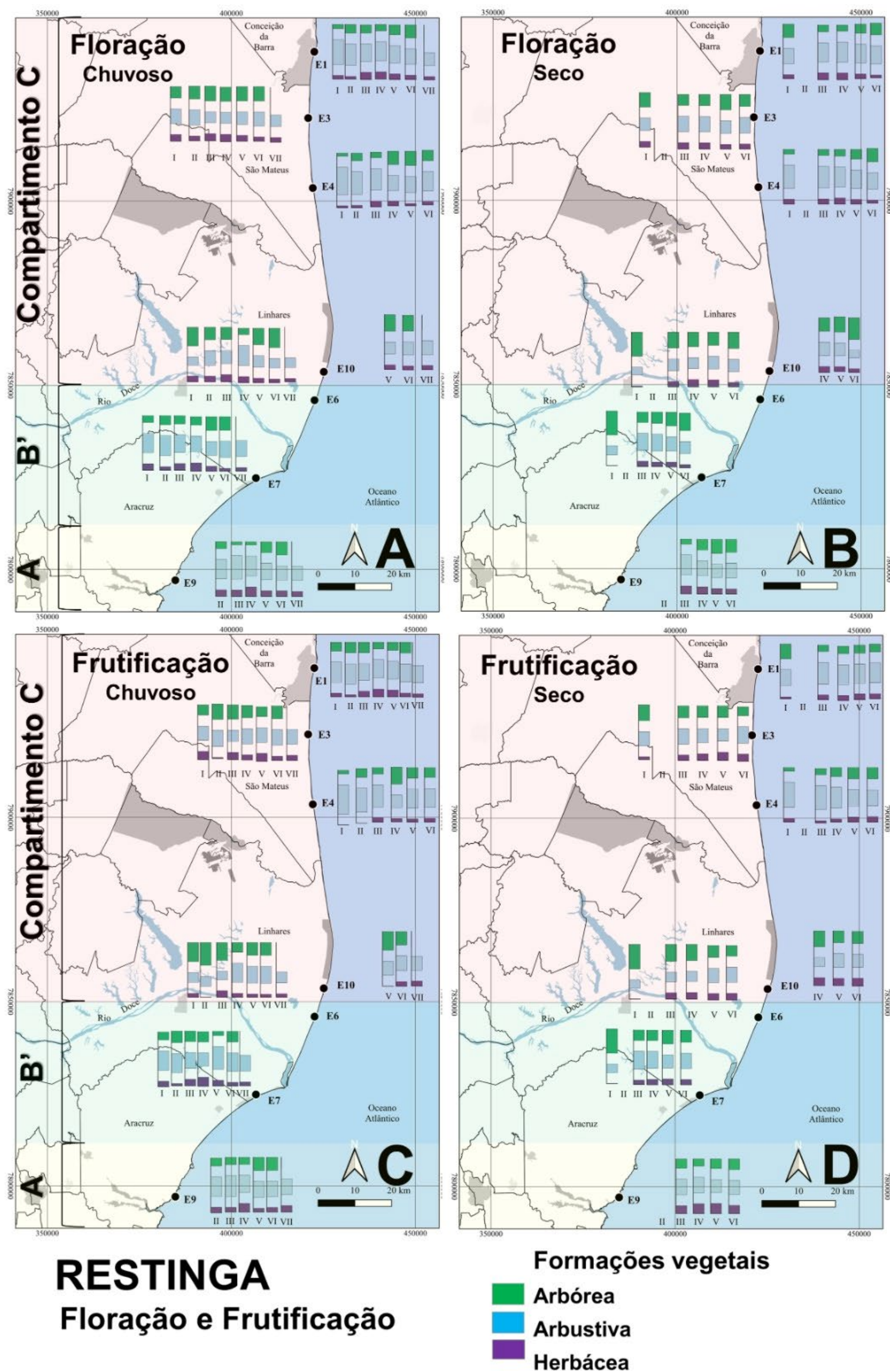
No Compartimento C, espécies como *Ipomoea imperati* e *Panicum racemosum* tiveram forte incremento em cobertura. Em relação a *Scaevola plumieri*, uma espécie ameaçada de extinção, os valores de importância se aproximaram daqueles obtidos durante o Ano 1, indicando melhora na APA de Conceição da Barra (E1) e estabilidade no restante do setor nos últimos três anos. Para a formação arbustiva, foram verificadas alterações moderadas nos valores de importância das espécies (Figura 4A-F) em ambos os compartimentos C e B', não relacionadas aos contaminantes oriundos do MLD. *Waltheria indica* apresentou recuo em seu valor de importância, coincidindo com um período de estiagem prolongada e retrocesso do lençol freático nas depressões entre os cordões arenosos, além da dinâmica de cheias do rio Doce que não provocou avanço das inundações sobre essas zonas mais baixas na formação arbustiva (Figura 4F).

Para o Ano 7, *Coccoloba alnifolia* mostrou recuperação desse parâmetro em relação ao Ano 6, cujo valor apresentou declínio em função de ajustes na amostragem, devido a adequações de disposição do intercepto de linha. A amostragem seguiu a metodologia de análise do primeiro ano de avaliação da estação (Seco Ano 5), o que resultou na retomada dos valores de importância deste período (Figura 4Figura 4D). A Estação E10 segue apresentando índices de diversidade que se destacam das demais estações. Essa particularidade pode estar ligada à sua localização próxima ao Compartimento B. Até o período Seco do Ano 6, na formação arbórea, foi mantida a classificação das espécies mais importantes nos compartimentos C e B. Entre elas, *Exellodendron gracile* se sobressaiu na estação E7, sendo notável por ser uma espécie ameaçada de extinção. Já *Protium heptaphyllum* foi amplamente encontrada em praticamente todas as estações como a espécie de maior valor de importância na comunidade vegetal, com exceção de E4 e E7.

No Compartimento B, as modificações observadas na estrutura do ambiente foram resultado da dinâmica natural da comunidade (Figura 4E-F). Isso incluiu a queda de árvores, como *Clusia hilariana*, e a consequente abertura de clareiras, sem qualquer ligação com o evento em questão. No Ano 7, a importância relativa de *Clusia hilariana* ainda não se restabeleceu, o que pode ser atribuído ao seu lento crescimento na vegetação. No Compartimento C, apesar dos impactos antrópicos recorrentes em E3, os valores de importância das principais espécies se mantiveram estáveis (Figura 4A-D), embora ainda não tenham recuperado o índice dos primeiros anos de avaliação.

As principais espécies nos dois compartimentos analisados mostraram variações dentro do intervalo de confiança (Figura 4A-F). É importante ressaltar que fatores como a proximidade da praia e a irregularidade das copas (representada pela diversidade de Shannon – Figura 4G) impactam a capacidade de capturar contaminantes transportados pelo aerossol marinho. Nessas situações, alterações no metabolismo são esperadas. Até o momento, não conseguimos confirmar se as mudanças estruturais observadas estão ligadas à contaminação proveniente do MLD, embora a contaminação na comunidade arbórea tenha sido detectada. No entanto, os efeitos dessa contaminação na organização da comunidade se desenvolvem lentamente e exigem estudos de longo prazo.

Figura 5: Amplitude fenológica das espécies chave avaliadas em cada formação vegetal encontrada nas estações amostrais durante os períodos chuvosos e secos nos Anos I (2018/2019), II (2019/2020), III (2020/2021), IV (2021/2022), V (2022/2023), VI (2023/2024) e VII (2024/2025) da vegetação de Restinga monitorada no âmbito do PMBA/Fest-UFES. Dados não mostrados no Ano II referem-se ao período de interrupções devido ao COVID-19. Para o novo escopo, vigente a partir de outubro de 2024 (Chuvoso Ano7), foram excluídas as análises da formação arbórea e da Estação Barra Nova (E4).

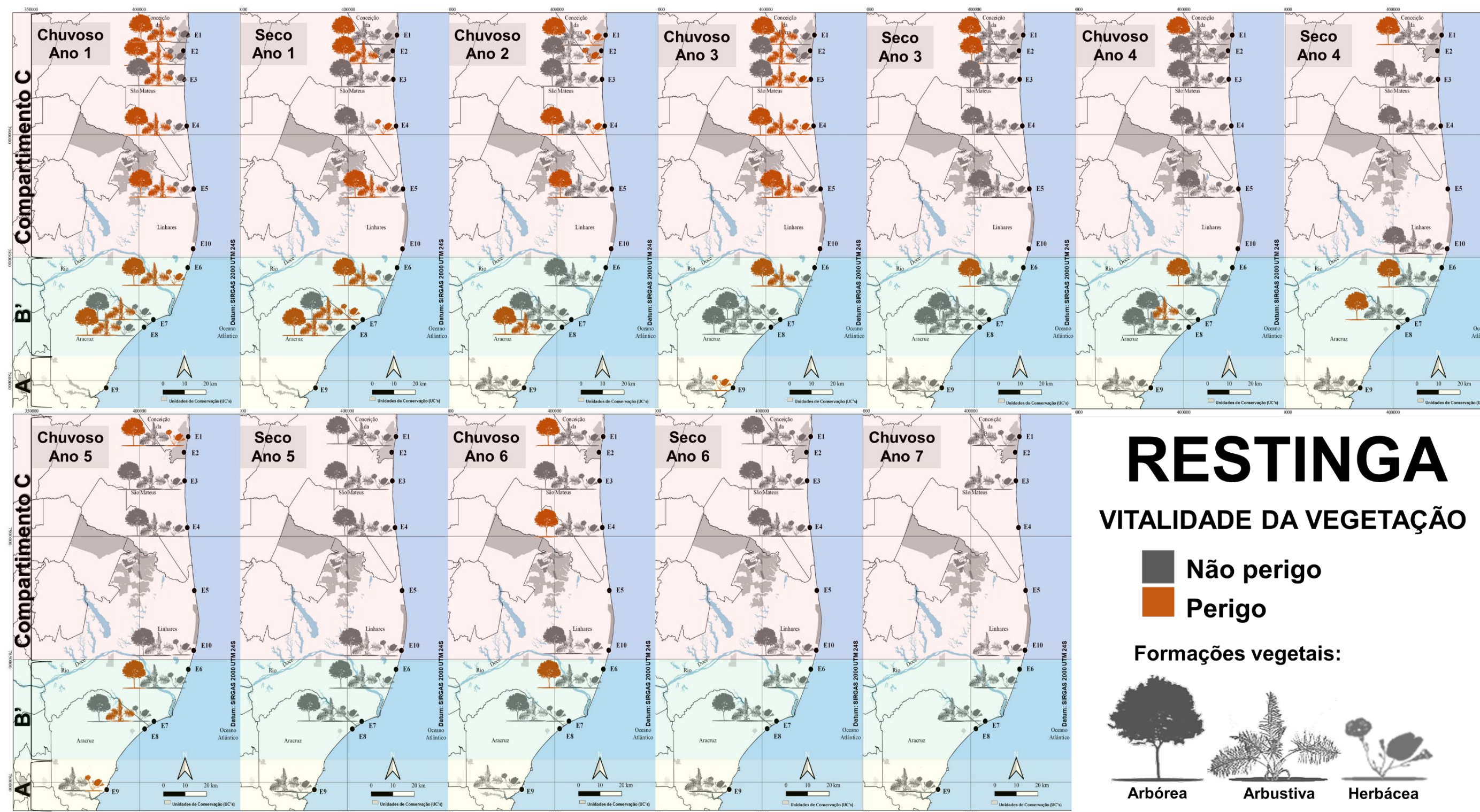


Os padrões fenológicos apresentaram comportamento estável para as vegetações herbácea e arbustiva ao longo do monitoramento no Compartimento A (Figura 5). Esses resultados demonstram sincronia entre as fenofases e manutenção no ritmo de polinização. No compartimento B, os eventos fenológicos tendem a ser mantidos para as comunidades arbustiva e arbórea, principalmente a partir do período seco Ano 3, onde essas taxas são mais estabilizadas (Figura 5B e D). Neste setor os ganhos nos processos de floração e frutificação no estrato herbáceo são destacados e se prolongam a partir do terceiro ano do período seco. Como consequência, os frutos anemocóricos, liberados em épocas de menor cobertura vegetal, geralmente permanecem próximos à planta-mãe durante o período úmido. Isso, por sua vez, reduz a eficiência da dispersão das espécies. Contudo, mesmo com essa limitação, a frutificação média na REBio Comboios (E7) continuou alta durante a estação seca (Figura 5D), indicando uma provável transição do padrão fenológico de subanual para contínuo.

No Compartimento C, a floração apresentou ligeira flutuação ao longo dos períodos seco e chuvoso, em todos os anos do monitoramento em E1 e E4 (Figura 5A-B), como resposta a tensões antrópicas nestas áreas. Diferentemente, um padrão mais estabilizado nesta fenofase, para ambas as estações, é destacado no período chuvoso, com melhoria nas taxas de floração nos dois últimos anos (Figura 5A). A frutificação em E3 e E10 acompanhou as taxas de florescimento nestas estações, porém no período chuvoso do ano 5 para E10, evento de frutificação não foi detectado para espécies da formação herbácea (Figura 5C). No geral, as análises nesse setor têm mostrado uma variação no padrão fenológico, alternando entre subanual e contínuo, e também uma mudança na regularidade da floração.

É crucial notar que os propágulos de espécies encontradas em dunas germinam preferencialmente durante a estação seca. Essa é uma tática para evitar as altas temperaturas e a evapotranspiração intensa, características do período chuvoso. Consequentemente, o aumento na taxa de dispersão de frutos observado na estação seca (E1 e E3) sinaliza uma melhora em comparação com os dados registrados no Ano 1. As mudanças na intensidade fenológica continuam a ser observadas na comunidade de arbustos em E1. Contudo, como já mencionado, os impactos antrópicos não só modificam a estrutura, mas também alteram a fenologia das espécies (Figura 5). Essa mesma tendência foi notada em Barra Nova (E4) durante o monitoramento, que apresenta tensões similares. No entanto, as áreas ainda preservadas dentro desse compartimento mostraram aumento na taxa de floração, que antes era restrita apenas às espécies dispersas pelo vento. Em ambos os níveis de preservação, as taxas de floração cresceram principalmente a partir do Ano 3. A presença de impactos antrópicos também afetou os dados fenológicos da comunidade arbórea. Esse efeito foi mais visível em E4, onde o corte seletivo de madeira prejudicou tanto o recrutamento quanto a entrada de novas espécies. Por outro lado, em áreas onde essa comunidade está preservada (E3 e E10), a fenologia foi influenciada por espécies com ciclos de vida mais longos (supra-anuais), apresentando picos periódicos que indicam uma melhora nas condições em comparação com o Ano 1.

Figura 6: Alerta de Perigo Biológico para plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas da Restinga monitorada pelo PMBA/Fest-UFES nos períodos Chuvoso Ano 1 (2018) a Chuvoso Ano 7 (2025). Para o novo escopo, vigente a partir de outubro de 2024 (Chuvoso Ano7), foram excluídas as análises da formação arbórea e da Estação Barra Nova (E4).

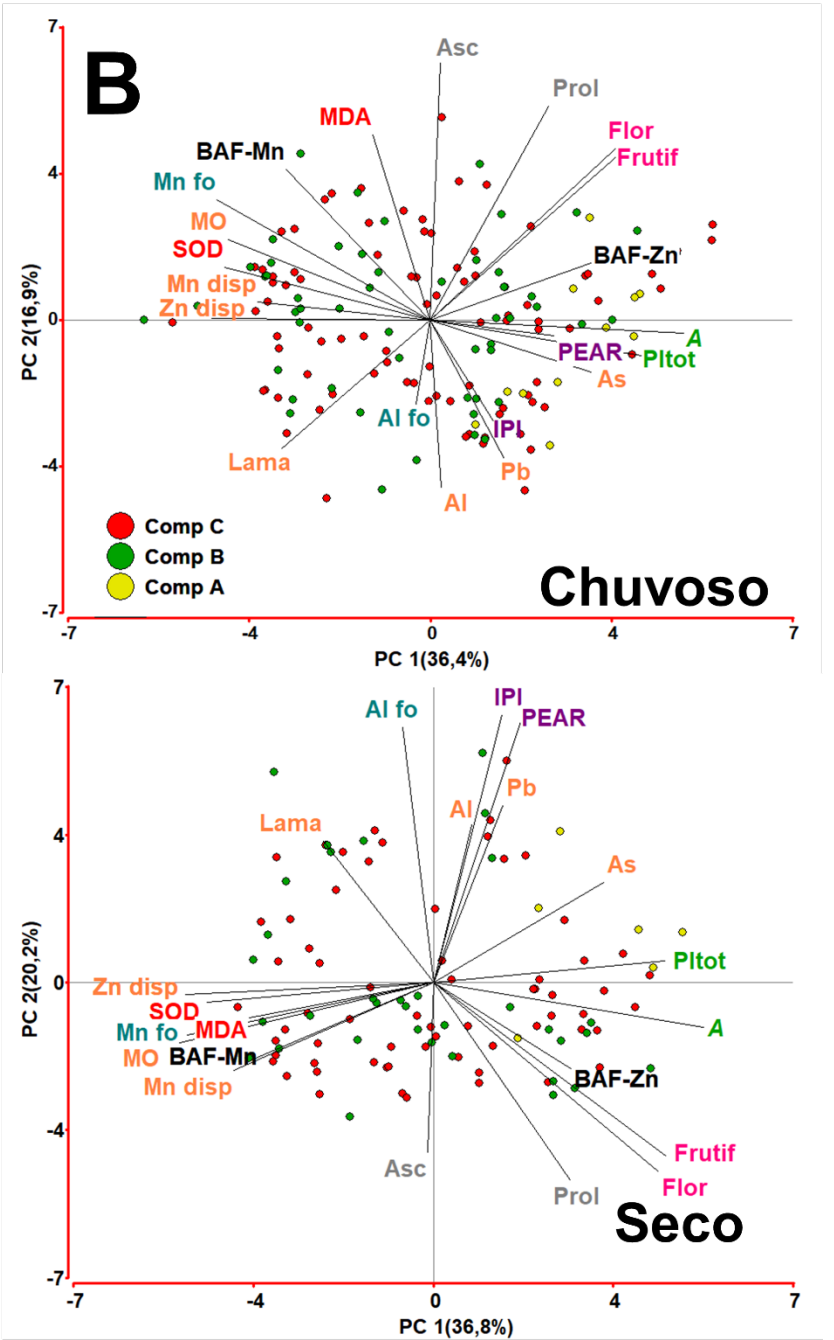


A Figura 6 apresenta os resultados do indicador de **Vitalidade da vegetação de Restinga**, integrando as categorias biológicas - Produtividade primária, Metabolismo primário, Estresse oxidativo e Reprodução - para identificar, em escala espacial e temporal, como essas plantas respondem à presença de elementos químicos no ambiente. Essa abordagem integrada permite identificar como plantas deste ecossistema reagem, tanto no espaço quanto no tempo, à presença dos elementos químicos levando a uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos biológicos das comunidades vegetais responsivos à pressão ambiental.

Ao longo do monitoramento, observou-se maior vulnerabilidade nos compartimentos B' e C, com destaque para respostas agudas e localizadas nas proximidades da Foz do rio Doce, como em Cacimbas (E6) e na REBio Comboios (E7), continuamente observadas até o período chuvoso do Ano 6. Também se destacaram respostas crônicas e difusas na porção norte da área estudada, entre a APA de Conceição da Barra (E1) e Aldeia dos Cocos (E3). O padrão observado no período Chuvoso do Ano 6, mais crítico quando comparado ao período seco do mesmo ano, não se manteve no período chuvoso do Ano 7. Neste último período chuvoso, não foram detectadas alterações suficientes para indicar "Perigo" ao indicador Vitalidade da vegetação. Este resultado pode também ser atribuído à exclusão das atividades de monitoramento na vegetação arbórea, que até o Ano 6 indicava impacto espacial recorrente. Apesar da Vitalidade da vegetação não ter demonstrado áreas críticas em relação ao impacto, as estações localizadas ao norte da Foz do rio Doce, como a APA de Conceição da Barra (E1), permanecem como pontos sensíveis, revelando a persistência de respostas negativas, principalmente quando as categorias que compõem o indicador são avaliadas individualmente.

Cacimbas, no Compartimento B', por sua posição de transição entre compartimentos e exposição direta ao Material Ligado ao Desastre (MLD), continua a demonstrar sensibilidade elevada para os parâmetros da categoria Produtividade primária, tanto em herbáceas quanto arbustivas. A vegetação herbácea se confirma, com a inclusão do período chuvoso do Ano 7, de maior suscetibilidade aos efeitos diretos da dinâmica marinha, como a deposição de aerossóis contendo elementos metálicos, por sua maior proximidade com a costa e ao MLD veiculado pelo "spray" marinho, ou devido a eventos de inundação associados ao avanço do mar. No entanto, suas características morfológicas e estratégias adaptativas, como crescimento rápido e fenologia flexível, conferem a essas plantas uma capacidade de resposta mais eficiente, o que pode explicar a menor recorrência de áreas em "Perigo" nessa formação, mesmo em regiões mais expostas. As respostas bióticas observadas no Ano 7 podem indicar o início de uma transição entre fases de impacto agudo e possíveis indícios de resiliência ecológica, embora ainda marcada por vulnerabilidades estruturais em áreas-chave do ecossistema. Diferentemente dos anos anteriores, no período chuvoso do Ano 7 a vegetação herbácea de Cacimbas apresentou menor expressão gênica em relação a estação APA Conceição da Barra, tanto dos genes de proteínas associadas à proteção das plantas na presença de elementos minerais em excesso, como metalotioneínas, quanto para a enzima fitoquelatina sintase, envolvida na via de síntese de compostos quelantes de metais. Esses resultados revelam a relação da expressão de genes de proteínas relacionadas à quelação de metais e a Produtividade primária. A redução na expressão dos genes avaliados pode sinalizar uma redução do estresse oxidativo, proporcionalmente ao aumento da performance fotossintética da vegetação (refletida pelo aumento do Índice desempenho fotossintético - PI_{total}).

Barra Nova (E4).



A **Produtividade primária** das comunidades vegetais continua sensível ao acúmulo de manganês, apresentando correlação negativa significativa entre concentrações foliares de Mn e PItot ($r=-0,52$), assim como de A ($r=-0,61$); ($p<0,001$) (Figura 7A). Relação semelhante foi observada para **Estresse oxidativo**, um indicador de danos celulares, que no Ano 7 manteve relação positiva entre a atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) e as concentrações de Mn nos tecidos foliares ($r>0,53$; $p<0,01$) (Figura 7B), reforçando a associação entre o excesso do metal e o aumento da atividade antioxidante. A elevada bioacumulação de manganês no período chuvoso do Ano 7 corrobora o padrão identificado em períodos anteriores, em estações amostrais dos compartimentos B' e C, especificamente em Degredo (E10), Cacimbas (E6) e REBio Comboios (E7). Este elemento se confirma, portanto, como chave nas respostas fisiológicas negativas da vegetação da Restinga. A produtividade primária segue se destacando nas respostas temporais ao longo do monitoramento. No período atual, baixos valores de produtividade foram observados tanto em herbáceas quanto em arbustivas, especialmente em Cacimbas, e pontualmente, em outras estações próximas à foz do rio Doce, como Degredo, no Compartimento C, e REBio Comboios, no Compartimento B'.

Já para a produção de **Metabólitos primários**, o mesmo período apresentou redução dos níveis de ascorbato em relação ao Ano 6, tanto para herbáceas quanto arbustivas, período que havia sido marcado pelos maiores valores desde o início do monitoramento. No entanto, não foram observadas relações significativas da produção de metabólitos primários com a concentração dos elementos minerais no período chuvoso do Ano 7. As relações mais relevantes envolveram aumento nos teores de lama associado a redução na síntese de prolina ($r=-0,40$).

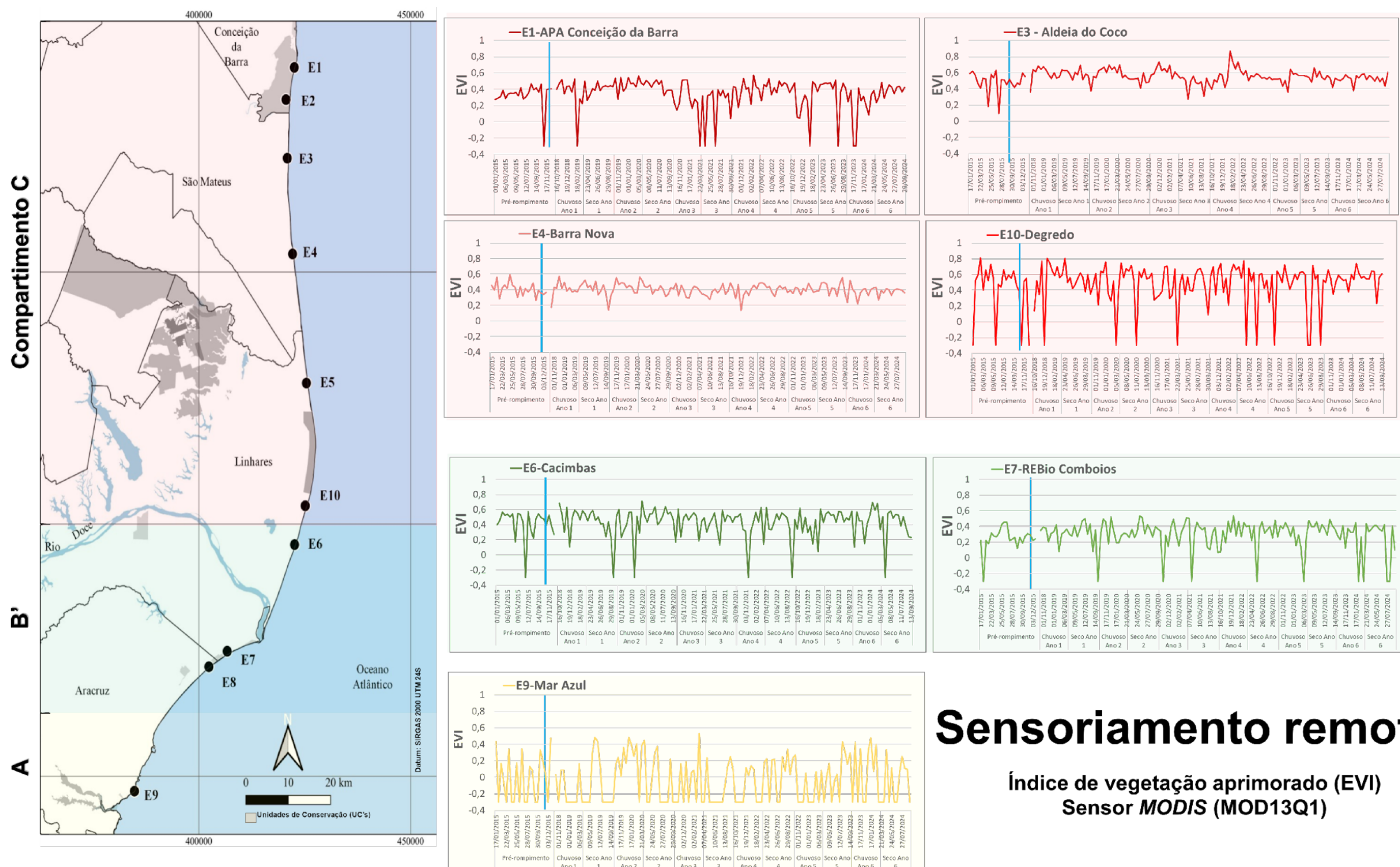
As tendências periódicas da **Reprodução** das comunidades apresentaram forte correlação com os acúmulos de Al e lama. A partir do período Seco do Ano 3, foi observado prolongamento da floração da comunidade herbácea, divergindo do padrão encontrado no início do monitoramento. Não houve indícios vegetativos de perda foliar no período seco, acompanhando o padrão verificado no período chuvoso. As taxas de florescimento encontradas no Compartimento C, setor onde as alterações fenológicas foram melhor percebidas, ainda não são capazes de evidenciar indícios de declínio da comunidade.

O impacto da concentração de metais também apresentou relação a **efeitos genotóxicos** na vegetação, acarretando em aumentos na fragmentação do DNA de espécies herbáceas, associados aos elementos As, Pb, Mn, Sn e Al no sedimento, bem como biacúmulos de V e Cu. A análise de danos ao DNA das herbáceas mostrou significativo aumento na fragmentação do material genético, especialmente em E7, quando comparadas às demais estações, evidenciando os efeitos da exposição das plantas a agentes genotóxicos. Metais presentes no ambiente podem induzir a produção direta e indireta de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula, além de favorecer a formação de eletrófilos e adutos, que causam a oxidação do DNA e fragilização dos cromossomos, resultando em danos genéticos.

Assim como observado em anos anteriores, o período Chuvoso do Ano 7 confirma a tendência de melhora das respostas da vegetação para o indicador Vitalidade da vegetação. Este resultado perdura desde o Ano 5, embora algumas flutuações sazonais ainda sejam observadas nas categorias biológicas componentes desse indicador, como a Produtividade primária. Essas variações acompanham a distribuição de elementos minerais no sedimento, especialmente Mn e Zn, bem como sua bioacumulação, além dos teores de lama e matéria orgânica. A análise do perfil funcional, estrutural e reprodutivo da vegetação da Restinga evidencia a persistência de impactos associados à contaminação no Compartimento B', e destacam a formação arbórea como de recorrente comprometimento. A análise temporal dos dados revela que a vegetação da Restinga monitorada ainda não alcançou estabilidade em suas respostas, apesar de uma leve melhora tenha sido observada entre os Ano 1 e Ano 7 do monitoramento.

Os resultados corroboram a influência dos elementos As, Pb, Al, Mn e Zn, afetando significativamente a Vitalidade de espécies herbáceas e arbustivas. A inclusão dos dados do período chuvoso do Ano 7, embora reforce a vulnerabilidade do ecossistema à presença contínua de metais, evidencia também flutuações nas categorias biológicas, sinalizando que os efeitos da contaminação ainda se manifestam de forma heterogênea entre os compartimentos e formações vegetais.

Figura 8: Análise do vigor da vegetação de Restinga monitorada pelo PMBA/Fest-UFES em relação a dados Pré-Rompimento. Evolução espaço-temporal do Índice de Vegetação Aprimorado (EVI) obtido pelo sensor MODIS/NASA nas estações APA Conceição da Barra (E1), Aldeia do Coco (E3), Barra Nova (E4), Degredo (E10), Cacimbas (E6), REBio Comboios (E7) e Mar Azul (E9) durante os anos de 2015 (Pré-Rompimento) e de 2018 a 2024. Os valores variam de -1 a +1 e, para vegetação saudável, variam entre 0,2 e 0,8. A barra em azul delimita valores capturados em 2015, ano do Rompimento da Barragem de Fundão, daqueles obtidos a partir do início do monitoramento *in situ* (2018).



Sensoriamento remoto

Índice de vegetação aprimorado (EVI)
Sensor MODIS (MOD13Q1)

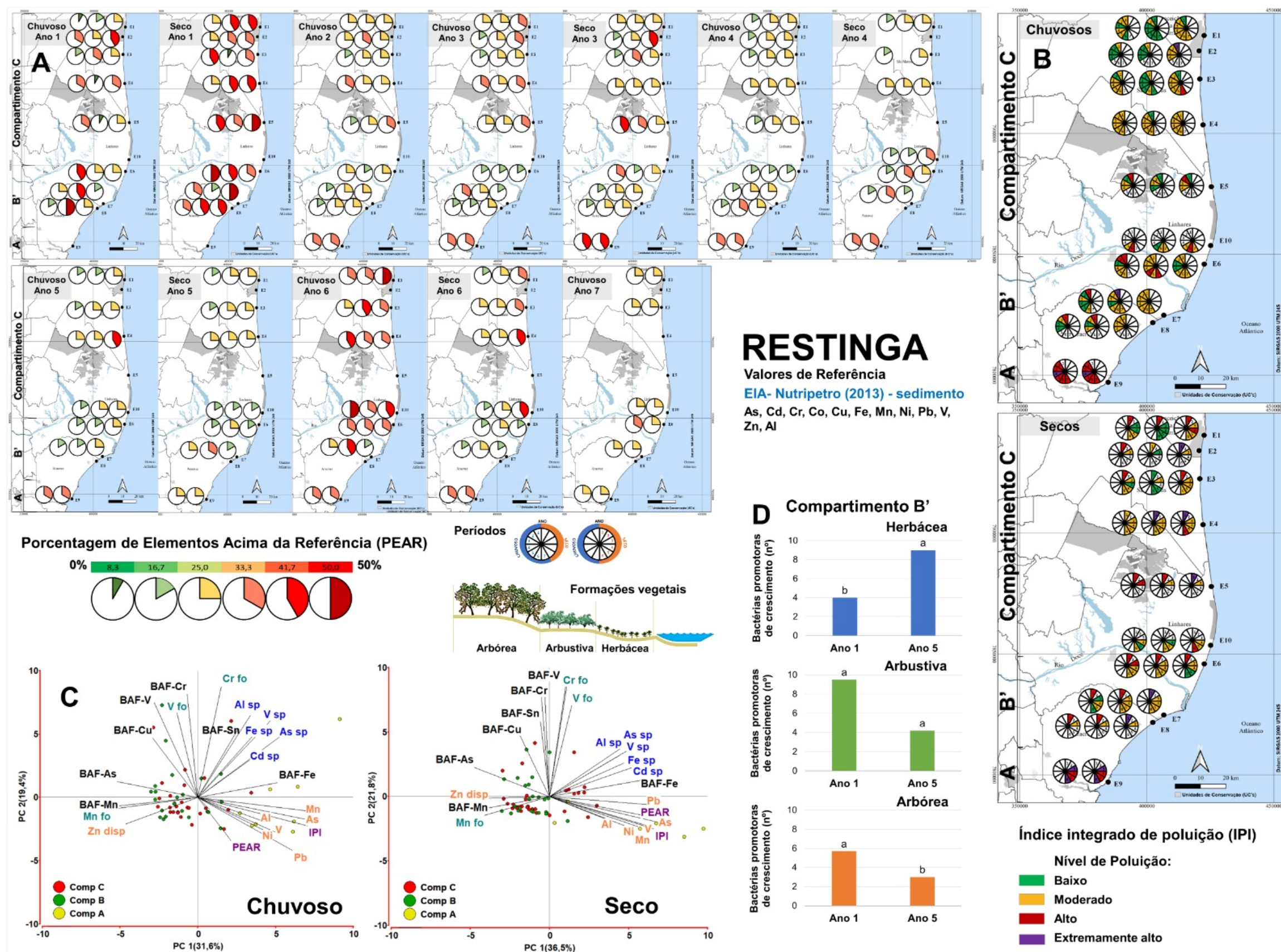
A análise da série temporal do Índice de Vegetação Aprimorado (EVI) (Figura 8) revela uma clara sazonalidade na dinâmica da vegetação das estações analisadas, corroborando os resultados obtidos para a Vitalidade. O EVI, amplamente utilizado em sensoriamento remoto para monitorar a cobertura vegetal e a fotossíntese, apresenta, em geral, uma tendência decrescente durante o verão (período chuvoso), padrão que se mantém até o último ano de monitoramento (Ano 6). Esse comportamento é esperado para a vegetação de Restinga, refletindo a resposta fenológica do dossel às variações sazonais. O EVI, com valores mais próximos de 1, indicativo de maior vigor vegetativo, tem relação mais forte com a biomassa da vegetação em comparação com outros índices de vegetação, tornando-o um indicador mais preciso da quantidade de biomassa presente em uma determinada área. As estações do compartimento C, entre a APA Conceição da Barra (E1) e Barra Nova (E4), apresentaram maior vigor vegetativo, com valores de EVI mais elevados e menos variáveis ao longo do tempo em comparação aos compartimentos B' e A. As estações Aldeia do Coco (E3) e Degredo (E10) se destacaram por apresentar os maiores valores de EVI, próximos a 0,8, indicando um elevado vigor vegetativo. Especial atenção deve ser dada ao período Chuvoso do Ano 6 para a localidade de Cacimbas (E6), no compartimento B', no qual os valores máximos superaram os de anos anteriores, e período seco para Degredo (E10), no compartimento C, cujo valor máximo superou aqueles observados no mesmo período de anos anteriores. É notável que o vigor da vegetação, apontado pela análise do EVI, apresenta melhora em relação ao início do monitoramento, apesar das variações intrínsecas dos períodos. Em contrapartida, a estação Mar Azul (E9) foi a que apresentou resultados do EVI atingindo valores mínimos (cerca de -0,3) em todos os períodos avaliados. Para o Ano 6, não foram observadas variações relevantes, com valores se mantendo entre -0,3 e 0,5 nesta estação, reforçando que, na área, as variações do índice podem apresentar outras influências além da presença dos contaminantes, em razão das respostas semelhantes ao período pré-rompimento.

Os períodos chuvosos ao longo de todo o monitoramento mostraram uma diminuição significativa do Índice de Vegetação Aprimorado nas estações Degredo (E10), Cacimbas (E6) e REBio Comboios (E7). Os menores valores do índice nessas estações, ao longo de todo o período de monitoramento, e principalmente durante o período chuvoso, sugerem uma resposta mais homogênea e potencialmente influenciada pela proximidade da Foz do rio Doce. Essa redução pode estar associada a fatores abióticos e bióticos, como o ciclo fenológico da vegetação, caracterizado por fases de desenvolvimento, descoloração e senescência foliar e floração (LEIVAS *et al.*, 2022). De acordo com Huete *et al.* (2002), o EVI é altamente sensível a variações na estrutura da vegetação, incluindo o índice de área foliar (IAF) e o tipo e arquitetura do dossel. A análise de séries temporais do EVI permite a identificação de padrões sazonais e a detecção de anomalias na fenologia relacionadas a mudanças climáticas ou ambientais, contribuindo para o entendimento da dinâmica da vegetação.

Durante o Ano 6, os menores valores de EVI, indicativos do menor vigor da vegetação, foram observados para Cacimbas (E6), REBio Comboios (E7) e Mar Azul (E9). A redução para E6 e E7 coincide com sua proximidade da Foz e pode ser um indicativo da influência negativa da maior disponibilidade ou concentração de MLD nessas áreas. Reduções do índice apresentaram relação a acúmulos de metais no sedimento das áreas de Restinga para As ($r=-0,66$; $p<0,01$), Mn ($r=-0,65$;

$p < 0,01$), V ($r = -0,65$; $p < 0,01$) e Ni ($r = -0,62$; $p < 0,01$). Estes resultados, comparados à avaliação fenológica *in situ*, corroboram o sucesso no uso destes índices na avaliação da interação entre a produtividade primária de uma determinada área vegetada e a energia que foi absorvida e revertida no seu crescimento, repercutindo assim no desenvolvimento ou na recuperação dessa comunidade (FONSECA, 2017). Embora não tenham sido observadas mudanças significativas ao longo do tempo, a análise do EVI permitiu identificar eventos de baixa cobertura vegetal e intensa atividade reprodutiva. Esses resultados, especialmente para a APA Conceição da Barra (E1) no Ano 3, indicam a ocorrência **de alterações no padrão fenológico da vegetação**, corroborada pelos resultados do monitoramento *in situ*, com taxas de floração muito superiores, indicando alteração no padrão fenológico de subanual para contínuo. A variação sazonal dos recursos naturais influencia diretamente a fenologia, afetando o crescimento e a senescência da vegetação. O EVI, por ser sensível à atividade fotossintética e à biomassa (LEE *et al.*, 2002), é uma ferramenta eficaz para monitorar a fenologia e detectar mudanças relacionadas a fatores climáticos e ambientais. A avaliação do verdor é essencial para caracterizar comunidades vegetais e compreender a resposta da vegetação a diferentes condições ambientais, conforme destacado por White *et al.* (2009).

Figura 9: Contaminação de áreas de Restinga monitoradas ao longo de suas formações herbácea, arbustiva e arbórea, utilizando como referência os valores pré-rompimento (EIA-Nutripetro - PSG, 2013), nos períodos Chuvoso Ano 1 (2018) a Chuvoso Ano 7 (2025) no âmbito do PMBA/Fest-UFES. Porcentagem de Elementos Acima da Referência – PEAR (A); Índice Integrado de Poluição – IPI (B); Análise de Componentes Principais – PCA – entre variáveis abióticas (C) nos diferentes Compartimentos da região costeira do Espírito Santo; e Número de bactérias promotoras de crescimento nas três formações vegetais do Compartimento B' nos Anos 1 e 5 do monitoramento (D). Para o novo escopo, vigente a partir de outubro de 2024 (Chuvoso Ano7), foram excluídas as análises da formação arbórea e da Estação Barra Nova (E4).



O monitoramento de longo prazo realizado pelo PMBA/Fest-UFES evidenciou um aumento nas concentrações de metais (Figura 9) como Mn e Zn no sedimento, bem como Cu e Mn nos tecidos foliares, além da bioacumulação de As e Mn, com a inserção do Ano 7. Esses fatores influenciam diretamente o indicador **Vitalidade da vegetação**. Na análise da **Porcentagem de Elementos Acima da Referência** (PEAR) no sedimento, observou-se uma melhora da condição no período Chuvoso do Ano 7 em comparação ao período chuvoso do Ano 6, exceto no sedimento sob a vegetação arbustiva em Cacimbas (E6) (Figura 9A). Nesta estação, representativa do compartimento B', a condição do sedimento se manteve semelhante à do período chuvoso do Ano 6, apesar da melhora observada no período seco intermediário.

Com o acréscimo dos resultados referentes ao período chuvoso do Ano 7, foi observado um aumento nos valores no **Índice Integrado de Poluição** (IPI) no solo sob vegetação herbácea da estação Aldeia do Coco (E3), no compartimento C, superando anos anteriores (Figura 9B). Resultado semelhante foi encontrado no solo sob vegetação herbácea em Mar Azul (E9), no compartimento A, cujos padrões se assemelham ao observado em anos anteriores. A tendência de melhoria da qualidade dos sedimentos em áreas como APA Conceição da Barra (E1) e Aldeia do Coco (E3), ambas no Compartimento C, se manteve com o acréscimo do período Chuvoso do Ano 7, particularmente no sedimento sob vegetação arbustiva. Em contrapartida, a persistência da contaminação foi observada nessa mesma formação em Mar Azul e Cacimbas, pertencentes aos compartimentos B' e A, respectivamente. Em Cacimbas, os níveis de contaminação aumentaram de moderado para alto em comparação com o ano anterior. Com o novo período chuvoso analisado, identificou-se a contribuição dos elementos Mn ($r=0,93$), As ($r=0,86$), Ni ($r=0,74$), Pb ($r=0,74$), e V ($r=0,80$); ($p < 0,001$) para a elevação do IPI (Figura 9C).

Temporalmente, os períodos secos continuam apresentando maiores níveis de poluição do sedimento, o que se deve primordialmente aos eventos de alta morfodinâmica marinha (Ano 1 e Ano 3), com destaques para as contribuições dos elementos Mn ($r=0,93$), As ($r=0,87$), Pb ($r=0,78$), Ni ($r=0,76$), V ($r=0,85$) e Al ($r=0,45$); ($p < 0,001$). Como esperado, com o avanço para o período chuvoso do Ano 7, chamaram atenção os teores elevados de Sn e Zn depositados sobre a vegetação da formação herbácea das estações Degredo (E10) e REBio Comboios (E7), assim como na vegetação arbustiva de Cacimbas (E6) e REBio Comboios (E7), todas situadas em áreas mais próximas à foz do rio Doce, compreendendo os compartimentos C e B'.

A proximidade com a foz favorece a entrada contínua de cargas fluviais enriquecidas em metais, que, sob influência das chuvas intensas, podem ser remobilizadas e incorporadas à água do mar. Com a ação dos ventos e da nebulização marinha, esses elementos são transportados pelo aerossol marinho e depositados diretamente sobre a vegetação de Restinga. Esses resultados reforçam a complexidade dos processos de deposição e a importância da variabilidade sazonal na dinâmica dos metais na vegetação de restinga. As concentrações de As, Mn, Zn, Fe, Al, As, Pb e V nos sedimentos foram diretamente relacionadas ao aporte proveniente do aerossol marinho, e o aumento da concentração desses elementos esteve diretamente relacionado à elevação de PEAR, principalmente para As, Pb, V e Mn. Tanto a vegetação herbácea quanto a arbustiva, mais próximas à linha da costa, estão muito

expostas às condições meteoceanográficas, o que favorece a deposição de aerossóis nessas regiões. O aerossol marinho contribuiu significativamente para o acúmulo de As, Cr, Zn, Sn e Fe nos tecidos foliares. O Fator de Bioacumulação (BAF) indicou um elevado acúmulo de Mn e Zn em plantas herbáceas e arbustivas avaliadas no período Chuvoso do Ano 7, em associação com os teores de matéria orgânica (MO) e a presença de lama nos sedimentos. Elevadas concentrações de MO e frações finas no solo, representativas do teor de lama do sedimento, tendem a favorecer a retenção de elementos minerais na raiz, a absorção e acúmulo na parte aérea, conforme mostrado ao longo do Compartimento C. Foi observado um acúmulo pronunciado de zinco ao longo de toda a costa e acúmulo pontual de Fe ou Mn em estações amostrais dos compartimentos C, em Aldeia do Coco e Degredo, respectivamente.

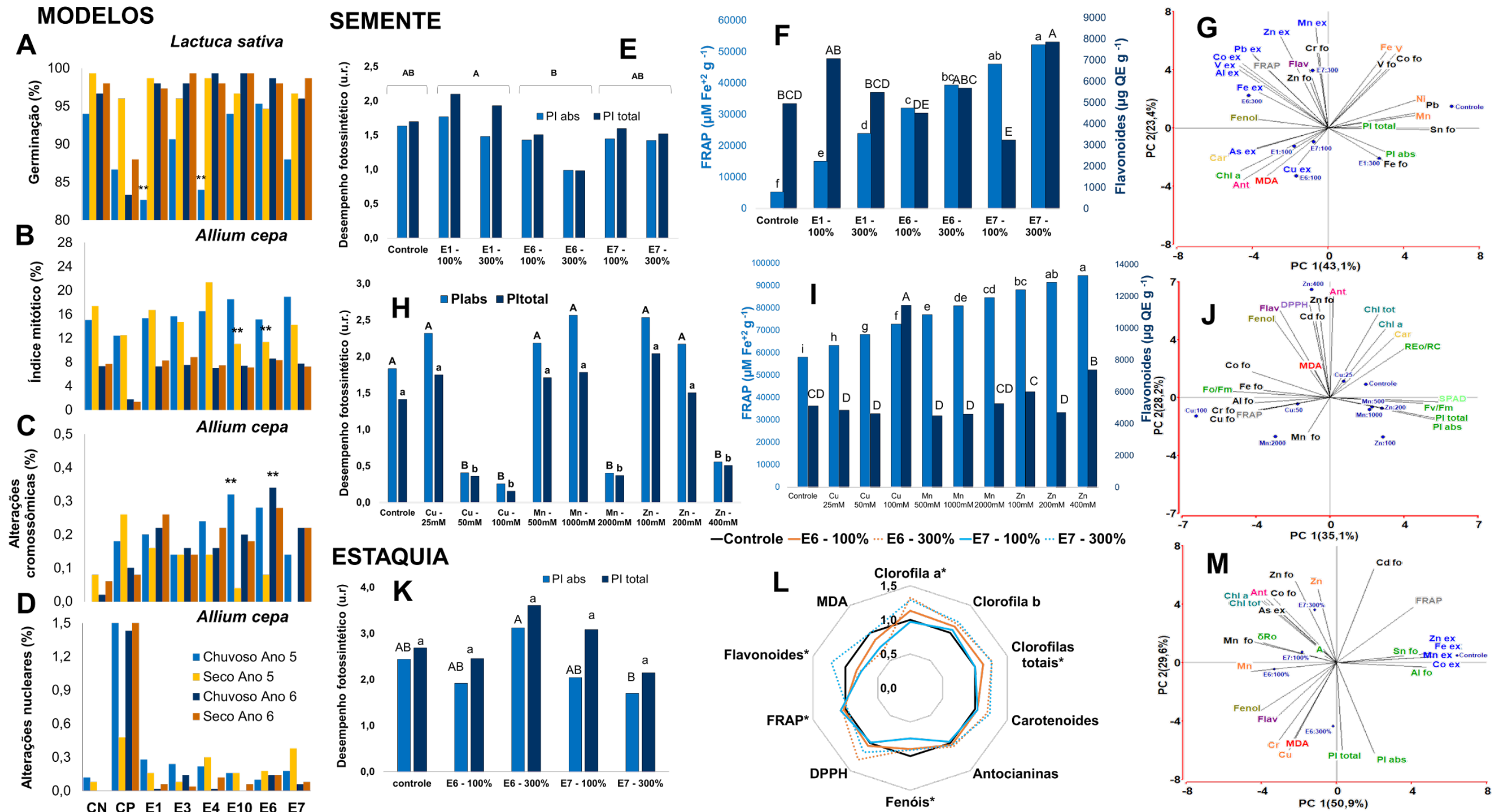
Observou-se uma relação direta e significativa entre a granulometria das praias e as concentrações de Fe, Sn, Al, Cu, Zn, As e Co nos sedimentos. As frações mais finas, como lama, apresentaram maior capacidade de retenção desses elementos, provavelmente devido à maior área superficial e ao teor de matéria orgânica associado. Em menor grau, as areias finas também demonstraram influência na concentração de metais, enquanto as areias grossas mostraram menor associação, sugerindo que a composição granulométrica é um fator determinante na distribuição e acúmulo de metais no ambiente costeiro.

Relacionados à granulometria das praias e consequente retenção de elementos minerais próximos à rizosfera, os estudos de monitoramento buscaram identificar o potencial uso de microrganismos que promovem o crescimento vegetal nas áreas de Restinga, destacando sua capacidade de colonização. Plantas da formação herbácea crescem em solo com baixa concentração de matéria orgânica e argila, e a microbiota associada ao seu sistema radicular demonstrou maior capacidade de solubilização de fosfatos e produção de quitinases. Nas áreas de formação herbácea do compartimento B', que sofrem impactos persistentes, observou-se um aumento no número de bactérias promotoras do crescimento de plantas ao longo do tempo. No Ano 5, a quantidade dessas bactérias no solo foi significativamente maior em comparação com o Ano 1 (Figura 9D). Esse comportamento é oposto ao observado nas áreas de formação arbórea e arbustiva. Esses resultados sugerem que a população bacteriana das áreas atingidas pelo MLD está se adaptando, exibindo uma resposta aguda frente à elevada concentração de elementos minerais detectados no início do monitoramento. Além disso, verificou-se que o aumento dos depósitos de V e Al sobre a vegetação da Restinga ("spray") apresenta relação positiva com o número de bactérias nos solos dessas áreas ($r = 0,69$ e $0,62$; $p < 0,05$). Em contrapartida, aumentos na concentração de elementos como Mn, Ni, Pb e V nos sedimentos apresentaram uma relação negativa com a quantidade de bactérias ($r = -0,81$; $-0,66$; $-0,53$ e $-0,73$; $p < 0,01$, respectivamente), indicando o efeito deletério da poluição sobre a microbiota do solo das áreas de Restinga (SID solo x IPI, $r = -0,78$; $p < 0,05$).

Essa capacidade é também a base para o entendimento do padrão de acúmulo de elementos minerais nas estruturas reprodutivas e na qualidade dos recursos florais. Maiores acúmulos de metal(oides) em frutos e sementes de espécies de Restinga estiveram relacionados a aumentos nos teores de matéria

orgânica e concentração de metais no sedimento. Além disso, bioacúmulos de As, Cr, Fe V, Al, Mn nos tecidos foliares também contribuíram para as concentrações de elementos nestas estruturas reprodutivas. Dentre os possíveis efeitos da contaminação dos recursos florais da Restinga, a análise do pólen indicou que concentrações de elementos abundantes no MLD como Zn, Cu, Fe, Mn, atingiram valores superiores à média apontada para o Espírito Santo (MORGANO *et al.*, 2012) em amostras coletadas em Degredo (E10), no Compartimento C. Concentrações de Zn, Cu e Mn ultrapassaram aqueles observados nos sedimentos e tecidos foliares, indicando o bioacúmulo desses metais nos tecidos de recursos florais. Sazonalmente, a contaminação do pólen permaneceu elevada no período Chuvoso do Ano 6, embora menor em relação ao período seco anterior, em virtude do período chuvoso apresentar maior oferta de recursos florais e conter elementos mais diluídos. Por outro lado, mesmo que os elementos minerais associados ao MLD não tenham sido detectados nas amostras de mel, a presença de concentrações potencialmente tóxicas no pólen pode afetar larvas de abelhas, por representar sua principal fonte de alimento (RANGEL *et al.*, 2022).

Figura 10: Padrões de respostas de plantas de Restinga e plantas modelos à contaminação por elementos químicos entre os períodos Chuvoso Ano 5 (2023) a Seco Ano 6 (2025). Plantas modelos submetidas a diferentes concentrações de extratos solubilizados de sedimentos coletados nas áreas de Restinga monitoradas no âmbito do PMBA/Fest-UFES: Germinação (%) (A) em *Lactuca sativa*; Índice mitótico (IM%) (B), alterações cromossômicas (AC%) (C) e nucleares (AN%) (D) em células meristemáticas de *Allium cepa*. CN: Controle negativo. CP: controle positivo. Médias seguidas com (**) diferem estatisticamente do controle negativo. Plantas herbáceas de Restinga obtidas por propagação por sementes (E-J) e propagação vegetativa (estaquia) (K-M) expostas ao extrato solubilizado de sedimento. Plantas obtidas por propagação por sementes submetidas a tratamentos de dose-resposta de diferentes concentrações de cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn) (H-J). Índices de desempenho fotossintético: eficiência de oxido-redução do fotossistema II (Plabs) e desempenho total da cadeia de transporte de elétrons (Ptotal) (E, H e K). Pigmentos fotossintéticos e Sistema oxidante (F, I e L): teores de Clorofila (Chl) a, b e totais; Antocianinas (Ant); Flavonoides (Flav); Compostos fenólicos (Fenol), e Malonaldeído (MDA); Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (Ferric Reducing Antioxidant Power - FRAP) e pelo método de sequestro do radical DPPH; Concentração de elementos minerais no extrato solubilizado (ex), sedimento de cultivo, e nas folhas (fo). Médias seguidas por letras distintas ou asterisco (*) diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Análise de Componentes Principais (PCA) entre variáveis abióticas e biológicas de resposta da vitalidade (G, J e M).



Assim como no monitoramento *in situ*, os **ensaios em cultivo protegido e bioensaios com espécies** modelo objetivam distinguir padrões da dinâmica de distribuição de elementos minerais ao longo da costa afetada pelo MLD, e associá-los à magnitude do seu impacto sobre os aspectos biológicos da vegetação da Restinga. Sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa* foram utilizadas como espécies vegetais modelos e submetidas ao extrato solubilizado de sedimentos coletados na Restingas monitorada. Os resultados apontaram redução na germinação de sementes de *L. sativa* (Figura 10A), indicando o potencial fitotóxico de sedimentos do Compartimento C. Em *A. cepa*, recorrentes variações de índices mitóticos (Figura 10B) e alterações cromossômicas (Figura 10C) foram encontradas, em relação ao controle, associadas à sedimentos da Restinga de Cacimbas (E6) e Degredo (E10). Apesar de alterações nucleares terem sido observadas na maior parte das estações amostrais, elas não foram significativas em relação ao controle negativo (Figura 10D). Esse resultado permite inferir o potencial cito/genotóxico do sedimento das estações monitoradas, relacionado à ocorrência de alterações como perda cromossômica, atraso, c-metáfase e ponte cromossômica, levando a uma possível ação aneugênica.

Em espécies de Restinga, sementes de herbáceas encontradas em Aldeia do Coco (E3) e Cacimbas (E6) apresentam maior potencial de germinação que as coletadas na APA Conceição da Barra (E1), REBio Comboios (E7) e Degredo (E10). Quando submetidas ao extrato solubilizado, as plantas jovens obtidas indicaram mudanças significativas nos seus aspectos funcionais. Entre as variáveis que compõem a Vitalidade da vegetação, o desempenho fotossintético total (PI_{total}) foi significativamente menor em plantas tratadas com extratos obtidos do sedimento de Cacimbas (E6) quando comparados àquelas tratadas com extratos obtidos do sedimento da APA Conceição da Barra (E1) (Figura 10E), indicando comprometimento da produtividade primária. Acúmulos foliares de Cr, Co, C e Zn, estiveram associados ao aumento das concentrações de Mn, Zn, Pb, Co, V e Al em extratos de sedimentos coletados na REBio Comboios, contribuindo na maior produção de compostos fenólicos e flavonoides em plantas (Figura 10G). Com isto, um resultado crescente da atividade antioxidante (FRAP) foliar foi obtido em resposta ao aumento das concentrações de extrato e da proximidade da estação de origem à foz do rio Doce (Figura 10F). Vale destacar que, para o período Seco do Ano 5, a concentração de Cu, Mn, Zn nos extratos foi significativamente maior que aquela obtida nos sedimentos das estações amostrais do monitoramento *in situ*.

Plantas herbáceas e arbustivas propagadas por propagação vegetativa (estaquia) também foram testadas em bioensaios com extratos solubilizados (Figura 10K-M). Em herbáceas, o Sistema oxidativo, como compostos fenólicos, flavonoides, atividade oxidante (FRAP) (Figura 10L) e a peroxidação lipídica (MDA), responderam à variação da origem do sedimento, indicando sua capacidade em promover danos às membranas celulares. Nessas plantas, PI_{total} pouco diferiu entre estações de origem e concentrações (Figura 10K), embora o índice de eficiência de oxido-redução do fotossistema II (PI_{abs}) tenha sido menor da REBio Comboios sob a concentração de 300%. Variáveis representativas de estresse oxidativo também responderam a presença de Cr e Cu no extrato (Figura 10M). A atividade antioxidante mostrou correlação com o Al e Cd foliar, e Cr e Co do extrato.

Com o intuito de investigar o efeito da dose-resposta de metais com recorrência de impactos sobre a flora da Restinga, o efeito de concentrações crescentes de Zn, Cu e Mn sobre o desenvolvimento das mudas de espécies de Restinga também foi avaliado. As concentrações foram baseadas naquelas encontradas nos sedimentos e tecidos vegetais do monitoramento *in situ*. Plantas da formação herbácea apresentaram reduções da produtividade primária (índices de desempenho fotossintético) associadas ao aumento das concentrações de Mn (2000 μM), Cu (100 μM) e Zn (400 μM) (Figura 10H). Dentre as concentrações, tratamentos com Cu (100 μM) e Zn (400 μM) acarretaram aumentos significativos de antocianinas, flavonoides e atividade antioxidante (FRAP e DPPH) (Figura 10I), envolvidos na proteção do sistema metabólico, atuando contra as espécies reativas de oxigênio (ROS). Aumentos de malondialdeído (MDA) foram observados na maioria dos tratamentos aplicados. Tais modificações estiveram associadas a aumentos foliares de Zn, Cu, Fe, Cd e Cr (Figura 10J).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO

Os anos de monitoramento do ecossistema de Restinga evidenciam a complexidade e sensibilidade das formações vegetais frente à contaminação por elementos minerais, associados ao rompimento da barragem de Fundão. A análise integrada dos indicadores revelou padrões espaço-temporais distintos entre os compartimentos, com destaque para os compartimentos B' e C, onde os impactos foram mais persistentes e intensos.

As respostas da vegetação, medidas por meio de indicadores biológicos como Produtividade primária, Metabolismo, Estresse oxidativo e Reprodução, mostraram-se fortemente influenciadas pela sazonalidade e pela proximidade em relação à Foz do rio Doce. Em particular, as estações Degredo, Cacimbas e REBio Comboios apresentaram padrões de resposta aguda mais marcantes, o que evidencia a importância da dinâmica fluvial na modulação da contaminação e na distribuição dos elementos minerais.

Os períodos chuvosos acentuam o impacto agudo do aporte de elementos minerais, refletido nas áreas mais próximas à Foz do rio Doce. Embora nem sempre se reflita nas respostas do indicador Vitalidade da Vegetação, esta tendência é observada na vegetação herbácea, com maiores acúmulos de elementos em plantas desta formação. Por outro lado, a formação arbustiva demonstra impactos crônicos e graduais, com alterações estruturais e funcionais em desenvolvimento.

A influência do rio sobre a composição da coluna d'água mostrou-se mais evidente nesta região, revelando uma maior dependência da dinâmica fluvial. Essa característica, combinada com a morfodinâmica das praias, as condições climáticas e a variação na suscetibilidade e sensibilidade da vegetação, evidencia a complexidade e a diversidade das respostas ecológicas locais. Esses fatores foram especialmente marcantes em Cacimbas, onde se observaram, ao longo dos anos de monitoramento, condições consistentemente desfavoráveis. Os maiores impactos registrados no

compartmento B' também se refletiram no compartimento C, caracterizado por respostas crônicas e instáveis, decorrentes da elevada variabilidade entre as estações amostrais analisadas.

A análise adicional do período chuvoso no sétimo ano de monitoramento reforçou a persistência e, em alguns casos, a intensificação da contaminação por metais nos sedimentos e na vegetação de Restinga ao longo do tempo, como Mn, Zn, As, Cu e Pb. Os maiores destaques foram observados em áreas onde a influência da dinâmica fluvial, associada à sazonalidade climática e à deposição via aerossol marinho, contribuiu para o acúmulo desses elementos sobre a vegetação e o solo. Essa dinâmica impactou diretamente o indicador de Vitalidade da vegetação, refletindo respostas crônicas e instáveis principalmente na região ao norte do monitoramento, no compartimento C. A variabilidade espacial e temporal observada reforça a importância do monitoramento contínuo, especialmente diante da interação múltipla entre fatores antrópicos e naturais na dinâmica de contaminação e bioacumulação em ecossistemas costeiros.

Os indicadores Índice Integrado de Poluição (IPI), Porcentagem de Elementos Acima da Referência (PEAR) e Fator de Bioacumulação (BAF) indicaram persistência da contaminação por metais nos sedimentos, sobretudo em áreas próximas à foz do rio Doce. Destacam-se, no Ano 7, os aumentos do IPI e PEAR em algumas localidades, especialmente associados à As, Pb, V e Mn, que somados a altos valores de bioacumulação para Mn e Zn, evidenciam uma bioacumulação significativa na vegetação herbácea e arbustiva.

Espécies herbáceas se mostraram mais suscetíveis ao longo do monitoramento. Essa suscetibilidade está ligada diretamente ao alto grau de exposição direta às condições meteoceanográficas (ondas, ventos e aerossol marinho), ao seu crescimento rápido e à sua resposta fenológica flexível. Tais características acarretaram uma maior captura e bioacumulação de elementos minerais, evidenciados pelos altos valores de BAF, IPI e PEAR nessa formação.

Já para as espécies das formações arbustivas, foi possível observar suscetibilidade intermediária aos impactos detectados no monitoramento, com variações vinculadas à estação amostral e ao período avaliado. Embora menos expostas à ação direta do aerossol marinho e das ondas em comparação às herbáceas, essas plantas foram significativamente impactadas pela deposição de elementos sobre a vegetação e pela persistência de metais nos sedimentos, especialmente em áreas como Cacimbas e REBio Comboios. Nessas áreas, observou-se bioacúmulo relevante de Mn, Zn e Fe, associado à presença de matéria orgânica e lama no solo, que favorecem a retenção de contaminantes. As respostas ecofisiológicas das plantas arbustivas foram mais estáveis que nas herbáceas, mas ainda refletiram os efeitos da contaminação crônica e sazonal.

Bioensaios sob condições controladas, com o uso de extratos solubilizados de sedimentos coletados nas áreas de Restinga monitoradas e do efeito da dose-resposta de metais, mostraram alterações significativas na resposta biológica em plantas de Restinga e plantas modelos. Entre as variáveis que compõem a Vitalidade da vegetação, a produtividade primária foi significativamente menor nas plantas tratadas com extratos obtidos do sedimento de Cacimbas (E6) quando comparados àquelas da APA

Conceição da Barra (E1). Além disso, maiores produções de compostos fenólicos e flavonoides em plantas de Restinga acarretaram aumentos crescentes da atividade antioxidante, em resposta ao aumento das concentrações de extrato e da proximidade da estação de origem à foz do rio Doce. Ensaio em espécies vegetais modelos apontaram alterações significativas do efeito toxicogenético, em relação ao controle, associadas a extratos de sedimentos da Restinga de APA Conceição da Barra (E1), Barra Nova (E4), Cacimbas (E6) e Degredo (E10). Esse resultado permite inferir o potencial genotóxico do sedimento das estações monitoradas, levando a uma possível ação aneugênica.

Para o efeito da dose-resposta de concentrações crescentes de Zn, Cu e Mn sobre o desenvolvimento das mudas de espécies de Restinga, plantas da formação herbácea apresentaram reduções da produtividade primária associadas aos tratamentos de maiores concentrações de metais, que acarretaram aumentos significativos do sistema antioxidante, envolvidos na proteção do sistema metabólico contra as espécies reativas de oxigênio (ROS).

É importante destacar que foi o inventário florístico e fitossociológico efetuado ao longo do monitoramento que possibilitou o enquadramento dos resultados encontrados dentro dos compartimentos delineados. Anterior ao monitoramento, tanto a riqueza quanto a estrutura da vegetação não haviam sido estudadas a ponto de aferir um delineamento compatível com os temas paralelos de Praia e Manguezal. Como resultado, as análises ecofisiológicas e abióticas puderam ser enquadradas de maneira coesa e integrada, proporcionando um estudo multidisciplinar nunca antes delineado na costa do Espírito Santo.

Em menor escala, o desenho amostral envolvendo três comunidades vegetais se mostrou compatível com a pergunta central do projeto. Isso possibilitou o avanço nas interpretações envolvendo gradiente de contaminação no sentido mar-continente. O maior exemplo disso refere-se às discussões de retenção do aerossol marinho sobre a textura da vegetação (dossel), intimamente relacionada com os índices de diversidade apresentados ao longo das estações.

A composição de espécies em cada Compartimento da Restinga permaneceu notavelmente estável, um achado que se alinha ao esperado. É provável que a capacidade de adaptação das plantas de Restinga a diversas condições estruturais seja uma tática crucial para a sobrevivência das espécies ao longo do gradiente estudado. No entanto, em termos de estrutura, a comunidade de plantas herbáceas exibiu variações significativas, especialmente nos Compartimentos B e C. Essas mudanças estão ligadas à erosão costeira, um fenômeno intensificado pela instalação do MLD no fundo do oceano. A presença do MLD resultou em uma maior propagação da energia das ondas sobre as dunas. Consequentemente, foi observada redução da cobertura vegetal e um sério risco para as espécies ameaçadas presentes nessa comunidade. A frequência da erosão das dunas oscilou durante o período de monitoramento. Contudo, a importância e a ocorrência das espécies ameaçadas mostraram um declínio persistente até o início do sétimo ano de observação, particularmente na Área de Proteção Ambiental (APA) de Conceição da Barra.

Foram identificadas diferenças estruturais nas comunidades de arbustos e árvores, mas essas alterações não se mostraram relacionadas aos contaminantes do MLD. Avaliar essas comunidades no

futuro representa um desafio considerável, principalmente devido aos impactos antrópicos que se concentram na área C. Esses tensores têm o potencial de prejudicar a análise estrutural dessas comunidades. Diante disso, é fundamental ressaltar que os materiais de educação ambiental desenvolvidos pelo Tema Restinga podem ser cruciais para aproximar as comunidades vizinhas. Ao reduzir essa distância, esperamos que seja possível diminuir os impactos observados dentro do período de estudo.

A comunidade de plantas herbáceas no Compartimento C demonstrou, ao longo do tempo, flutuações na sincronia reprodutiva em certas estações de avaliação. Essa assincronia pode estar ligada a contaminantes provenientes do aerossol marinho, um achado que é apoiado por análises de imagens espectrais obtidas por sensoriamento remoto. Diversos elementos podem prejudicar a reprodução de espécies vegetais. No entanto, o monitoramento revelou que, mesmo acompanhando as variações pluviométricas até o início do sétimo ano, a comunidade herbácea apresentou picos de floração fora do período esperado. Isso comprometeu uma maior dispersão de sementes e frutos durante o período de menor cobertura vegetal (a estação seca). Como resultado, as sementes que deveriam ser dispersas pelo vento acabaram ficando próximas da planta-mãe. Isso, por sua vez, reduziu a capacidade dessas espécies de colonizar dunas semifixas. Esse cenário está diretamente conectado ao impacto já mencionado de perda de cobertura vegetal na comunidade, o que pode atrasar significativamente a recolonização das áreas afetadas.

Finalmente, resultados indicaram que alguns elementos químicos presentes no pólen de propriedade de apicultores de abelha (*Apis mellifera*) no Compartimento C estão acima das concentrações esperadas aferidas para o Estado do Espírito Santo. Alguns destes elementos podem alcançar níveis de toxicidade capazes de prejudicar o desenvolvimento das larvas, em função do pólen ser sua principal fonte de alimento. O padrão de acúmulo de elementos minerais nas estruturas reprodutivas mostrou relação a aumentos nos teores de matéria orgânica e concentração de metais (Mn, Al, Cr, Cu e Zn) no sedimento. Além disso, bioacúmulos de As, Cr, Fe V, Al, Mn nos tecidos foliares também contribuíram para as concentrações de elementos nestas estruturas reprodutivas.

Os anos de monitoramento indicam que as áreas de Restinga situadas nas proximidades da foz do rio Doce concentram os maiores impactos à vegetação, resultado da combinação entre a influência direta do regime fluvial e a deposição de elementos via aerossol marinho. A persistência da contaminação por elementos minerais nos sedimentos, o acúmulo em tecidos vegetais e a variabilidade nas respostas ecofisiológicas nas formações herbácea e arbustiva evidenciam a complexidade dos processos que afetam esse ecossistema. A zona costeira monitorada se mostra vulnerável a eventos climáticos e morfodinâmicos, o que reforça a importância da continuidade do monitoramento ambiental. Além dos efeitos ecológicos, destaca-se o potencial impacto sobre as cadeias tróficas e sobre as comunidades humanas que dependem dos recursos da Restinga para subsistência, ressaltando a relevância socioambiental do monitoramento integrado e de longo prazo.

5 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS

A metodologia de coleta de estruturas reprodutivas e recursos/recompensas florais descrita no Plano de Trabalho do Tema Restinga foi adequada, pois, durante a fase de validação da metodologia proposta se constatou a inviabilidade de obtenção das amostras. Constatou-se que a quantidade de flores que seriam necessárias poderia comprometer a disponibilidade de alimento para os animais, que fazem uso dessas estruturas, e o equilíbrio do ecossistema. Uma vez que o Plano de Trabalho propunha coletas em propriedades de apicultores no entorno das estações amostrais do Tema Restinga, amostras de pólen e mel foram coletadas em propriedades na Comunidade Quilombola de Degredo, município de Linhares, próximo à área amostral de monitoramento da Restinga em Degredo (E10) em agosto/setembro de 2023. Nesta localidade, coletas de recursos florais foram realizadas, pois atendiam ao critério de presença de associações de apicultura contendo produção associada à vegetação de Restinga. Os procedimentos somente foram realizados após alinhamentos com a Associação dos Pescadores e Extrativistas e Remanescentes de Quilombo do Degredo (Associação ASPERQD), reuniões com os apicultores interessados, e aquisição de EPI's e materiais necessários para coleta.

Dessa forma, as análises relacionadas a esta matriz também necessitaram de adequações: i. Contaminação de órgãos e recursos/recompensas florais, e ii. Análise polínica (Meta 1 - Efeitos da contaminação do ecossistema Restinga). Para a análise de contaminação de órgãos reprodutivos, que no Plano de trabalho estipula a análise alternativa entre pistilo, estames, frutos e/ou sementes, a concentração de elementos químicos foi determinada a partir de sementes e frutos de espécies da Restinga. Entretanto, a análise de néctar foi realizada por meio do mel (que é produzido pelas abelhas a partir do néctar recolhido de flores). A análise de elementos químicos para recursos/recompensas florais foi restrita a pólen e mel (que são provenientes de androceu e gineceu das plantas) coletados juntamente aos apicultores, por serem suficientes para comparar os resultados com valores de referência reconhecidos pelo poder público. Por outro lado, devido às alterações de metodologia de coleta, a avaliação de germinação dos grãos de pólen não pode ser realizada, visto que a determinação botânica do inventário polínico é destrutiva, impossibilitando sua posterior germinabilidade. Vale destacar, entretanto, que as demais análises propostas para essa temática foram suficientes para a conclusão da meta, visto que o inventário polínico pode indicar a presença das espécies com maior valor de importância e a análise química de pólen e mel pode indicar traços de contaminação cujos valores de referência são reconhecidos pelo poder público. Dessa forma, os resultados obtidos durante os dois períodos de amostragem previstos (um ano) permitem estimar os padrões sazonais de respostas, e assim, os objetivos da meta alcançados.

A avaliação da promoção do crescimento vegetal pelo uso de microrganismos, descrita na Meta 3 do novo plano de trabalho, apresentou dificuldade na execução de parte das suas atividades. A seleção de colônias de bactérias de interesse para futuras ações de mitigação das áreas de Restinga afetadas, planejada na versão inicial do projeto, se caracteriza por uma atividade contínua que depende de fases anteriores de seleção. Etapas relacionadas ao uso das colônias de interesse na colonização de tecidos internos de plantas de Restinga para implementação nos ensaios de dose-resposta de metais ainda

não puderam ser completadas, uma vez que não foi possível a obtenção de número suficiente de sementes colonizadas por espécie para a implementação dos ensaios, impossibilitando a determinação dos parâmetros biométricos e fotossintéticos. Entretanto, os demais ensaios da dose-resposta de metais em plantas de Restinga foram cumpridos, assim como as demais atividades relacionadas à seleção das unidades formadoras de colônias, seleção dos isolados para a avaliação antioxidante, tais como fosfato, produção de quitina, tolerância a salinidade e compostos voláteis foram realizadas.

6 REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F., GISH W., MILLER, W., MYERS, E.W. AND LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. **J. of Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-407, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

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.

ARAGÃO, F. B., DUARTE, I. D., FANTINATO, D. E., GALTER, I. N., SILVEIRA, G. L., DOS REIS, G. B., ... & MATSUMOTO, S. T. Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.213, 111985. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111985>, 2021.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 10006**: Solubilização de Resíduos - Procedimento. Rio de Janeiro-RJ, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 10007**: Amostragem de resíduos sólidos, p.21, 2004.

BACARIN, M. A., MARTINAZZO, E. G., CASSOL, D., FALQUETO, A. R., SILVA, D. M. Daytime variations of chlorophyll a fluorescence in pau d'alho seedlings. **Revista Árvore**, v.40, n.6, p.1023-1030, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0100-67622016000600007>. Acesso em 13 jun 2022.

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 indolbultírico. **Enciclopedia Biosfera**, [S. l.], v. 14, n. 25, 2017. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/888>. Acesso em: 05 dez. 2022.

BLOTT, S.J.; PYE, K. GRADISTAT: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. **Earth surface processes and Landforms**, v. 26, n. 11, p. 1237-1248, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/esp.261>. Acesso em: 18 mar. 2023.

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.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022. Altera os Anexos da Portaria nº 443, de 17 de dezembro de 2014, da Portaria nº 444, de 17 de dezembro de 2014, e da Portaria nº 445, de 17 de dezembro de 2014, referentes à atualização da Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. Diário Oficial da União, 108: 74-103, 2022.

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.

CHEN, Y. E., CUI, J. M., LI, G. X., YUAN, M., ZHANG, Z. W., YUAN, S., ZHANG, H. Y. Effect of salicylic acid on the antioxidant system and photosystem II in wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, v.60, p.139-147, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10535-015-0564-4>

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.

COSTA, T. S., CEVOLANE, N. S., FALQUETO, A. R. E AOYAMA, E. M. Influência de diferentes concentrações salinas na germinação de sementes e vigor de plântulas de *Canavalia rosea* da Restinga de Guriri, São Mateus/ES. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v.11, n.1, p.77-87, 2013.

CUNHA, V.L.C.D.M. Tratamentos pré-germinativos para *Scaevola plumieri* (L.) Vahl (Goodeniaceae). 2005. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (**Graduação em Engenharia Florestal**) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro / Instituto de Florestas. 2005.

DE BOER, S.H.; WARD, L. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica associated with potato tissue. **Phytopathology**, v.85, p.854-858, 1995. Disponível em:

https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1995Articles/Phyto85n08_854.pdf. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/Phyto-85-854>. Acessado em 22 jan. 2020.

DOWD, L.E. Spectrophotometric Determination of Quercetin. **Analytica**. Chemistry, v.31, p.1184, 1959.

DUTRA, V.F.; ALVES-ARAÚJO, A.; CARRIJO, T.T. 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.

ERDTMAN G. The acetolysis method – A revised description. **Svensk Botanisk Tidskrift**, n.54, p.561–564, 1960.

ERK, M.; IVANKOVIC, D.; RASPOR, B.; PAVICI, J. Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins. **Talanta**, v.57, p.1211–1218, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00239-4](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00239-4)

ESPÍRITO SANTO. Decreto nº 5238-R, de 25 de novembro de 2022. Declara as espécies da flora silvestres ameaçadas de extinção do Estado do Espírito Santo e dá outras providências. Diário Oficial dos Poderes do Estado, n.25.870: 14-48, 2022.

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.

FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung vom Zellkern in mikroskopischen Präparaten. *Zts. Phys. Chem.* v.135, n.5-6, p. 203-248, 1924. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/bchm2.1924.135.5-6.203>

FISKESJO, G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v.102, p.99-112, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>

FLORA E FUNGA DO BRASIL. 2024. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 10 jan. 2024

FOLK, R.L.; WARD, W.C. Brazos River bar: a study in the significance of grain size parameters. **Journal of Sedimentary Research**, v. 27, n. 1, p. 3-26, 1957. Disponível em: <https://doi.org/10.1306/74d70646-2b21-11d7-8648000102c1865d>

FONSECA, R. C. Análise de índices de vegetação (NDVI e SAVI) no estudo da dinâmica geoespacial e espectro-temporal da vegetação de caatinga, cultura irrigada e solo exposto do município de Petrolina/PE. 2017. 78 p. Trabalho de Conclusão de Curso.

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.

FREITAS, R. M.; ARAI, E.; ADAMI, M.; SOUZA, A. F.; SATO, F. Y.; SHIMABUKURO, Y. E.; ROSA, R. R.; ANDERSON, L. O.; RUDORFF, B. F. T. Virtual laboratory of remote sensing series: visualization of MODIS EVI2 data set over South America. **Journal of Computational Interdisciplinary Sciences**, v.2, p.57-64. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.6062/jcis.2011.02.01.0032>

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.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2004.00235.x>

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soils. **California Agricultural Experimental Station**, Circular 347, 1950.

HUETE, A. DIDAN, K.; MIURA, T.; RODRIGUEZ, E. P.; GAO, X.; FERREIRA, L. G. Overview of the radiometric and biophysical performance of the MODIS vegetation indices. *Remote Sensing of Environment*, v.83, n.1-2, p.195-213, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0034-4257\(02\)00096-2](https://doi.org/10.1016/S0034-4257(02)00096-2)

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.

JIANG, Z., HUETE, A., DIDAN, K., MIURA, T. Development of a two-band enhanced vegetation index without a blue band. **Remote Sensing of Environment**, v.112, n.10, p.3833–3845, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rse.2008.06.006>

JONES G. D.; BRYANT V. M. JR. The use of ETOH for the dilution of honey. **Grana**, v.43, n.3, p.174–182, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00173130410019497>

KALAJI, H. M.; JAJOO, A.; OUKARROUM, A.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I. A.; CETNER, M. D.; ŁUKASIK, I.; GOLTSEV, V.; LADLE, R. J. Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiol Plant**, v. 38, p. 102, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2113-y>

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**. V. 57, n.5, p.503-7, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9276-8>. Epub 2008 Sep 23. PMID: 18810533.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M., (Eds.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley and Sons, p. 115-175, 1991.

LEE, R., YU, F., PRICE, K. P., ELLIS, J., & SHI, P. (2002). Evaluating vegetation phenological patterns in Inner Mongolia using NDVI time-series analysis. *International Journal of Remote Sensing*, 23(12), 2505-2512. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01431160110106087>

LEIVAS, J. F.; TEIXEIRA, A. H. DE C.; TAKEMURA, C. M.; GARCON, E. A. M. Análise da dinâmica temporal de índices de vegetação NDVI, EVI, SAVI e IRECI através de imagens Sentinel-2a e MODIS. In: MELO, J. O. F. (Org.). *Ciências agrárias: o avanço da ciência no Brasil*. São Paulo, SP: Editora Científica Digital, 2022. cap. 21. Pp.332-343.

LI, Y.; LIN, Y.; LOUGHLIN, P.; CHEN, M. Optimization and effects of different culture conditions on growth of *Halomicronema hongdechloris* – a filamentous cyanobacterium containing chlorophyll f. **Front Plant Sci** v.25, p.5–67, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00067>

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.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL G. Methods of melissopalynology. **Bee World** v.59, v.4, p.139–157, 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0005772X.1978.11097714>

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v.30, p.665-676, 1978.

MELO, F.O. **Caracterização biométrica do fruto e avaliação dos efeitos do encapsulamento na estabilidade e bioacessibilidade *in-vitro* de extratos antociânicos do jambolão (*Syzygium cumini* L. Skeels)**. São Cristóvão, SE, 2022. 128f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal de Sergipe, 2022.

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. 2020.4

MOAR N. T. Pollen analysis of New Zealand honey. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, n.28, v.1, p.39–70, 1985. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00288233.1985.10426997>

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, Jundiá. **Revista Brasileira de Botânica**, v.12, p.85-98, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002000200012>. Acesso em: 14 nov. 2020.

MORGANO, M. A., MARTINS, M. C. T., RABONATO, L. C., MILANI, R. F., YOTSUYANAGI, K., & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.. (2012). A comprehensive investigation of the mineral composition of brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(4), 727–736. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000400019>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>. Acesso em: 18 mar. 2023.

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.1365-313X.2007.03115.x>. Acesso em: 14 nov. 2020.

OLIVE, P. L. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. **Environ. Mol. Mutagen.**, /A-487-495, 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/em.2850110409>

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.

PIRES, J.; TORRES, P.B.; SANTOS, D.Y.A.C.; CHOW, F. **Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017.

PEDRETE, T.A.; HAUSER-DAVIS, R.A.; PEREIRA, L.H.S.; TORRES, M.B.; MOREIRA, J.C. Glutathione and metallothionein as oxidative stress biomarkers in the medicinal plant *Chrysobalanus icaco* L. from different Brazilian regions. **Journal of Plant Biology and Crop Research**, v.3, n.1, 1015, 2020. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/341408442>

POHREN, R. DE S.; DA COSTA, T.C.; VARGAS, V.M. F. Investigation of sensitivity of the *Allium cepa* test as an alert system to evaluate the genotoxic potential of soil contaminated by heavy metals. **Water, Air, & Soil Pollution**, v.224, n.3, p.1460, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1460-1>

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, A.F.; GAMON, J.A.; FUENTES, D.A.; ROBERTS, D.; PRENTISS, D.; QIU, H. **Modelling CO₂ flux of boreal forests using narrow-band indices from AVIRIS imagery**. AVIRIS Workshop, JPL/NASA, Pasadena, California, 2000.

RANGEL, L.B.; KOZOVITS, A.R.; MESSIAS, M.C.T.B.; ABREU, A.T.; ANTONIN, Y. Impacts of a tailing dam break on the contamination of pollen and honey from the stingless bee *Tetragonisca angustula* (Apidae: Trigonini). **Journal Of Apicultural Research**, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00218839.2022.2081428>.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENES-PEREZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2006. 4 p. (Comunicado Técnico).

SANTOS, T., SOMMAGGIO, L.R.D., MARIN-MORALES, M.A. Phyto-genotoxicity assessment of different associations between sludges from water and sewage treatment plants, before and after the bioremediation process. **Environmental Science and Pollution Research**, v.29, n.26, 40029-40040, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18820-z>

SANTOS, K.R., GALTER, I.N., GRECCO, K.D., SILVA, E. Z. M., LASCOLA, M.B., DOS SANTOS, S.N., ... & MATSUMOTO, S.T. Toxicogenetic, biochemical, and anatomical effects of the herbicide Clethodim on *Allium cepa* L. **Environmental Science and Pollution Research**, v.60, p.1-10, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-31048-9>.

SARKER, U.; OBA, S. Augmentation of leaf color parameters, pigments, vitamins, phenolic acids, flavonoids and antioxidant activity in selected *Amaranthus tricolor* under salinity stress. **Scientific reports**, v.8, 12349, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30897-6>

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

SHARIFI, ROUHALLAH; RYU, CHOONG-MIN. Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. **Annals of Botany**, v. 122, n. 3, p. 349-358, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aob/mcy108>

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000272016>

SILVEIRA, G. L., LIMA, M. G. F., DOS REIS, G. B., PALMIERI, M. J., & ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, 178, 359-367, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.048>

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous *in vivo* recording of prompt and delayed fluorescence and 820 nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Bioenerg.** 1797, 1313-1326, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.03.008>. Acesso em: 18 mar. 2022.

TEXEIRA, L.N.; STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, F.A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Ceres*, v.55, n.4, 297-304, 2008.

THOMPSON, J.D.; HIGGIS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22: p. 4673-4680, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

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

U.S. EPA. **Method 3015A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts**, Revision 1. Washington, DC, 2007b.

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.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. **Marine Environmental Research**, v.44, p.69-84, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(96\)00103-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(96)00103-1)

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.

WHITE, M.A.; DEBEURS, K.M.; DIDAN, K. *et al.* Intercomparison, interpretation, and assessment of spring phenology in North America estimated from remote sensing for 1982–2006. *Global Change Biology*, 15, 2335–2359, 2009.

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.

ZANZARINI, F.V.; PISSARRA, T. C. T.; BRANDÃO, F. J. C.; TEIXEIRA, D. D. B. Correlação espacial do índice de vegetação (NDVI) de imagem Landsat/ETM+ com atributos do solo. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.** v. 17, n. 6, p. 608-614, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013000600006>