

**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- 43/ JUN 23

RA2022 PMBA/FEST

Vitória,

Junho de 2023

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL	3
2	METODOLOGIA	4
2.1	COLETA	4
2.1.1	Análises de contaminantes no sedimento, aerossol marinho e tecidos vegetais	4
2.1.2	Inventário Florístico e da Estrutura, e Fenologia da vegetação	5
2.1.3	Monitoramento ecofisiológico da vegetação de restinga	8
2.1.4	Respostas de espécies vegetais à contaminação por elementos minerais e capacidade de recuperação da Restinga	8
2.2	ANÁLISE.....	10
2.2.1	Contaminação do sedimento, “spray” e tecidos vegetais, e granulometria	10
2.2.2	Inventário Florístico e da Estrutura, e Fenologia da vegetação	11
2.2.3	Análises bioquímicas e alterações celulares das restingas monitoradas	13
2.2.4	Microbiota do sedimento associado à vegetação	13
2.2.5	Bioensaios com extratos solubilizados do sedimento presente nas estações amostrais da Restinga	15
2.2.6	Análise de dados e determinação da Situação de Risco e Alerta de Perigo:	16
2.3	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS.....	18
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	20
3.1	VITALIDADE DA VEGETAÇÃO	21
4	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	29
5	REFERÊNCIAS	29

1 HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

O histórico de malha e frequência amostrais do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest) abrange informações de suma importância para o balizamento do presente programa, uma vez que passou por modificações ao longo do tempo, visando melhor atender aos objetivos do PMBA/Fest. Estas alterações foram aprovadas pela Câmara Técnica da Biodiversidade (CTBio) por meio de: (1) ofício SEI nº 1/2020-CTBio/DIBIO/ICMBio, de outubro de 2019 (para o período de transição) e (2) Proposta Técnica de continuação do monitoramento, apresentada no primeiro semestre de 2022 visando o “Novo Ciclo do PMBA/Fest”.

As modificações implementadas se encontram nos seguintes Materiais Suplementares: 1) MS - Malha e frequência amostrais, onde as diferentes malhas e frequências amostrais são apresentadas nas abas “Ano 1”, “Transição”, “Novo Ciclo” e “Histórico Frequências” e 2) MS – Mapas das malhas amostrais, com a espacialização referente às malhas amostrais dos Ambientes. Como forma de esclarecer os períodos contemplados em cada uma delas, “Ano 1” se refere às estações amostrais coletadas entre setembro de 2018 e setembro de 2019, “Transição” às estações entre outubro de 2019 e julho de 2022 e “Novo Ciclo” referente às estações amostrais coletadas a partir de agosto de 2022.

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 submetidas à Fundação Renova através do FORMULÁRIO DE APRESENTAÇÃO DE PLANO DE TRABALHO em 31 de agosto de 2022. 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 a fim de determinar os indicadores.

2.1 COLETA

2.1.1 Análises de contaminantes no sedimento, aerossol marinho e tecidos vegetais

Coleta de sedimentos: as amostras de sedimentos foram coletadas semestralmente, respeitando a periodicidade estabelecida pelo monitoramento (período seco/chuvoso). A abrangência inclui as três formações vegetais amostradas em cada estação. O critério de escolha incluiu 10 pontos de coleta estabelecidos próximos às plantas monitoradas pelos estudos ecofisiológicos. Foram coletadas amostras com 20 cm de profundidade com auxílio de pás de plástico, suficiente para análise em triplicata. As amostras foram secas em estufa a 60°C por 72 h ou até peso constante.

Análises do particulado 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 ocorrentes 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, relacionadas 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 recompensas florais (néctar e pólen): a análise de estruturas reprodutivas e recompensas florais considera a amostragem de mel *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) adquiridas diretamente com a associação de apicultores de Degredo/Linhares, as quais permitem a determinação da origem floral e presença de pólen das espécies mais frequentes encontradas nas estações amostrais de acordo com cada localidade de produção. Após a identificação botânica das espécies, a coleta de amostras de pólen e néctar de espécies inventariadas nas estações amostrais da Restinga, visa investigar

possíveis contaminações da flora associada ao ecossistema estudado. A análise também considera as características fenológicas obtidas no histórico de dados fenológicos e capacidade de produção de néctar e pólen em quantidade mínima necessária para análise, sendo coletado flores antes da antese (pólen) e néctar, com auxílio de micropipeta e armazenado em microtubos para análises posteriores.

2.1.2 Inventário Florístico e da Estrutura, e Fenologia da vegetação

A continuidade do monitoramento das estações amostrais da Restinga reveste-se de extrema importância para a validação dos possíveis indicadores de impacto do rejeito de Mariana/MG via salsugem. O monitoramento foi realizado nas sete estações amostrais estabelecidas para o novo Plano de Trabalho do Tema Restinga. 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.

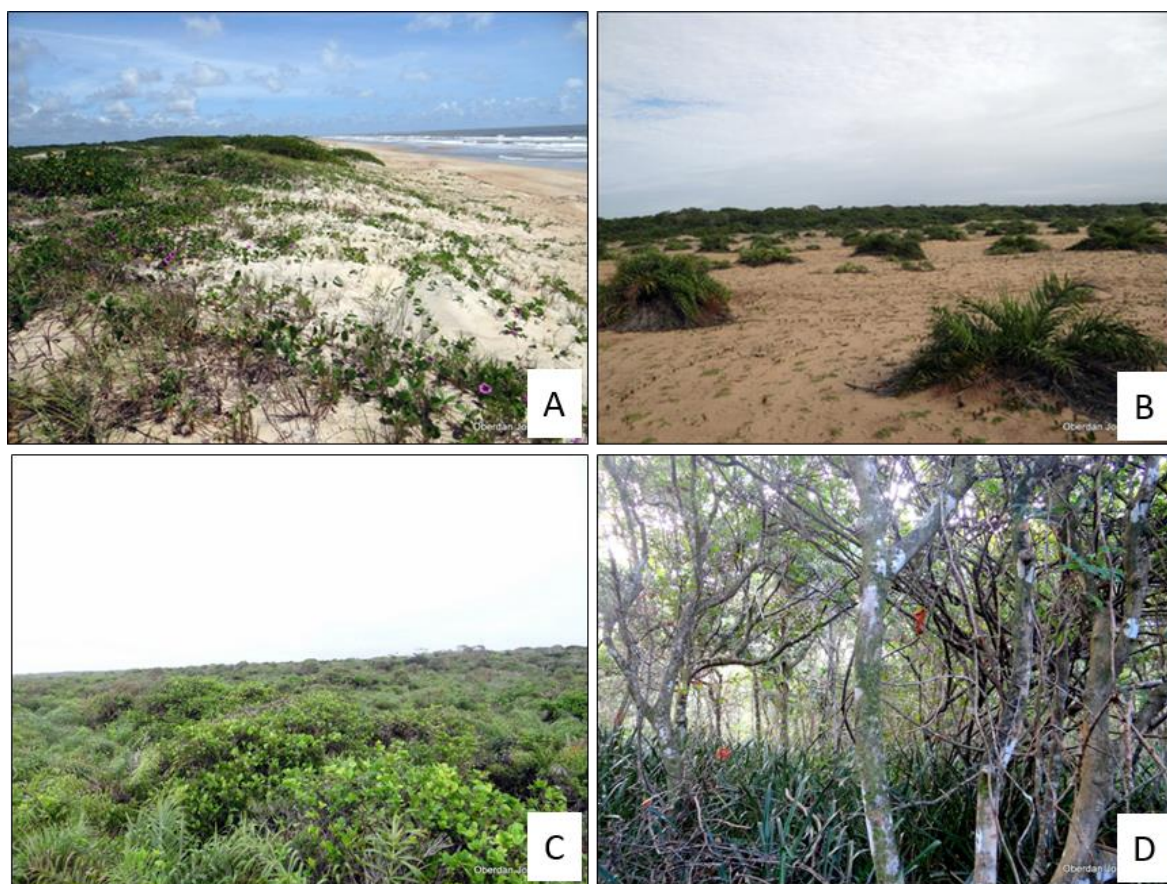
Em cada uma das estações amostrais, o **inventário florístico** foi realizado por meio de caminhar aleatório, nas áreas das linhas e parcelas, marcadas em formação herbácea (halófila-psamófila, Figura 1A), arbustiva (aberta não inundável, Figura 1B ou fechada não inundável, Figura 1C) e arbórea (formação florestal, Figura 1D) e fora delas. Espécimes férteis observados foram coletados, de um indivíduo por espécie, em cada fitofisionomia, em todas as áreas, durante 12 meses (outubro/2018 a setembro/2019). Nos meses seguintes, as coletas se restringiram às espécies ainda não amostradas ou à complementação de material botânico de espécies já coletadas. Para cada espécime, foram coletados, sempre que possível, cinco ramos férteis (com folhas, flores e/ou frutos). Além disso, foram compiladas informações sobre a planta, como o hábitat, os estádios de floração e de frutificação e outras observações ecológicas ou morfológicas pertinentes. Foram anotadas as coordenadas geográficas, com o auxílio de um GPS, e realizada a documentação fotográfica.

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

Para o acompanhamento da dinâmica da vegetação no espaço e tempo, o **levantamento da estrutura da comunidade da formação herbácea** foi realizado nos meses abrangendo a estação chuvosa. A

ausência de uma comparação na estação seca é justificada pelos resultados obtidos no Ano 1, que demonstraram não haver mudanças estruturais expressivas entre os dois períodos. A avaliação desta comunidade utilizou o método de parcelas alternadas de Mueller-Dombois e Ellenberg (1974), consistindo em parcelas de 1 m² (1x1m). As parcelas foram distribuídas em 10 linhas perpendiculares a linha de costa, com uma distância de 50 m entre elas, a partir das primeiras plantas junto ao mar, com comprimento variável, na dependência do comprimento desta formação até a formação arbustiva não inundável, mas que não ultrapasse os 50 metros de comprimento. Assim, caso esta medida seja possível de utilizar, foram analisadas 25 parcelas por linha amostral, totalizando 250 m² por estação amostral.

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. A. Formação Herbácea não Inundável. B. Formação Arbustiva Aberta não Inundável. C. Formação Arbustiva Fechada não Inundável. D Formação Florestal não Inundável.



Todos os indivíduos de qualquer forma biológica, dentro do critério de inclusão, foram amostrados. Em cada parcela foram estimados (i) Frequência, utilizando como critério de inclusão amostral indivíduos enraizados no interior da parcela ou aqueles que apresentaram parte do corpo vegetal acima do substrato no interior da parcela; (ii) Cobertura, obtida por estimativa visual, considerando o percentual de cobertura que cada espécie ocupa na área amostral, utilizando a parcela (1 m²), dividida em partes até o limite mínimo de 0,0625 m² (6%), neste caso, objetivando auxiliar nesta estimativa, também foram estimados os percentuais de área nua e área de detritos.

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

A **estrutura da vegetação na formação arbórea** foi avaliada segundo metodologia sugerida por Gentry (1991), sumarizado por Phillips e Miller (2002) e enquadrado no Programa de Amostragem Rápida (HIGGINS e RUOKOLAINEN 2004). Tal metodologia é considerada eficiente para a estimativa da diversidade, pois inclui plantas jovens, árvores, arbustos, trepadeiras e hemiepífitas, 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 o CAP (Circunferência à Altura do Peito) de todas as ramificações para o cálculo da área basal. A periodicidade anual de coleta se justifica em função da exigência de intervalos maiores para captação de possíveis mudanças estruturais.

A coleta de **dados fenológicos da vegetação** da Restinga foi realizada trimestralmente, juntamente com as coletas para o estudo florístico. A avaliação inclui cinco indivíduos georreferenciados das espécies avaliadas nos estudos ecofisiológicos, bem como espécies com alto valor de importância definidas pelos estudos fitossociológicos. Observações complementares em indivíduos não marcados serão realizadas em cada comunidade, a fim de melhorar a interpretação dos dados e capturar efeitos isolados (e.g. fitossanidade). Cada estágio fenológico foi registrado com câmera fotográfica.

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 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.

2.1.3 Monitoramento ecofisiológico da vegetação de restinga

Para a continuidade do monitoramento das **respostas ecofisiológicas** da vegetação das restingas, 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.

Ensaios 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 em zig-zag 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

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

O material botânico usado para estaqueamento foi coletado nas estações amostrais das restingas monitoradas no âmbito do PMBA/Fest, 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 semi-preparadas em campo, tendo sua base cortada em bisel, e em seguida foram acondicionadas em sacos plásticos com água.

Os experimentos foram instalados em casa de vegetação da área experimental do Setor de Botânica da UFES, campus Goiabeiras. Na casa de vegetação, a intensidade luminosa, a temperatura e a umidade foram controladas. O controle de temperatura foi feito por meio de um sistema de refrigeração intermitente, em que o sistema era acionado sempre que a temperatura atingisse 33 °C.

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

As estacas obtidas em campo foram cortadas posteriormente em pedaços de 10 cm preservando-se três folhas por estaca, plantadas em bandejas de polietileno contendo areia lavada e esterilizada, sem enraizadores e mantidas sobre bancadas a uma altura de 1,30 m do 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*, *Culpania emarginata*; e espécies **arbóreas**: *Eugenia hirta*, *Manilkara bella*, *Manilkara salzmannii*, *Pera glabrata*, *Pouteria pachycalyx*, *Protium heptaphyllum*, *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 *Annona acutifolia*, *Chrysobalanus icaco*, *C. alnifolia*, *E. astringens*, *G. pernambucensis*, *Jacquinia armillaris*, *M. bella*, *M. salzmannii*, *P. cattleianum* e *Schinus terebinthifolius*, as quais também foram obtidas por estaquia em julho, agosto e outubro de 2022 e encontram-se sob avaliação. Na área experimental, as estacas coletadas 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. Foram observados número de brotações, número de folhas, mortalidade e enraizamento de estacas.

2.2 ANÁLISE

2.2.1 Contaminação do sedimento, “spray” e 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 pseudo-total no sedimento (USEPA 3051A, 2007) e amostras vegetais, com alterações, bem como a quantificação de elementos-traço (fração total) nas amostras de “Spray”, que seguiu o método EPA 3015a para água (USEPA, 2007); e (2) ao Laboratório de Análises do Solo, do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (DPS/UFV), para análise de nutrientes biodisponíveis no sedimento (Fe, Mn, Cu e Zn por extrator de Mehlich-1) e micronutrientes no tecido vegetal (SARRUGE e HAAG, 1974). A caracterização das áreas costeiras das restingas monitoradas pelo PMBA/Fest 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: No Novo Plano de trabalho do Tema Restinga, a determinação da granulometria dos sedimentos arenosos foi realizada por meio de peneiramento a seco. 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 sedimento das restingas avaliadas neste monitoramento foi calculado o Índice integrado de poluição (IPI) que deriva do índice de poluição utilizado para diagnóstico de sedimentos (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 sedimento 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 o total analisado, que se encontram acima dos valores de referência, permitindo assim realizar uma análise da evolução espaço-temporal dos elementos químicos no sedimento das três formações vegetais das restingas 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 e da Estrutura, e Fenologia 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 CVRD, SAMES, VIES e VIC e nos herbários virtuaREis REFLORA e INCT. 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.ibrij.gov.br/v2/consulta.php>). A lista de espécies inventariadas (FEST, 2023) está

apresentada de acordo com a classificação do APG IV (2016), e apresenta informações sobre endemismo e raridade, de acordo com literatura específica (FLORA DO BRASIL 2020, em construção; GIULIETTI et al., 2009; DUTRA et al., 2015); e estado de ameaça, de acordo com o Livro Vermelho da Flora do Brasil (MARTINELLI e MORAES, 2013), e a Lista Revisada das Espécies Ameaçadas do Espírito Santo (FRAGA et al., 2019). Espécies exóticas, naturalizadas e potencialmente invasoras seguiram o conceito de Moro et al. (2012) e foram identificadas conforme literatura usual (I3N, 2020).

Para a **estrutura** das três formações, foram calculados os parâmetros de frequência absoluta (FA), frequência relativa (FR), dominância absoluta (DoA), dominância relativa (DoR) e valor de importância (VI) de cada espécie encontrada (BROWER e ZAR, 1984). Os índices de Densidade Linear e Cobertura Linear são resultantes do número de indivíduos amostrados (N) e intercepto total (L), respectivamente, divididos pelo tamanho da amostragem (1000 m), sendo seus valores proporcionais e, portanto, desnecessários e suprimidos. O parâmetro de Frequência Absoluta (FA) está relacionado à porcentagem de ocorrência da espécie na unidade amostral e o Valor de Importância (VI) é resultante da somatória dos valores relativos de Frequência Relativa e Dominância Relativa para a formação herbácea e Densidade Linear, Cobertura Linear e Frequência para a formação arbustiva e florestal.

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

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.

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 quanto 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 das restingas monitoradas

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 Yemn e Cocking (1955). Para determinar possíveis mecanismos de respostas à metais, o conteúdo de metalotioneína foi determinado segundo Viarengo et al., (1997) com modificações.

Para a avaliação das respostas do **Estresse oxidativo**, foram determinadas a atividade 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) e Griffith (1980). 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 ORFs são então comparadas por meio da ferramenta "ClustalW" (THOMPSON et al., 1994). Para a análise da expressão dos genes será utilizada a metodologia de PCR quantitativa que utilizará o kit 'Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG' (Invitrogen) e o termociclador 'Rotor-Gene 3000 (Corbett Research).

Alterações celulares: para a avaliação de possíveis alterações ecotoxicológicas *in vivo* na vegetação das restingas monitoradas, a detecção de quebras simples do DNA em raízes de espécies selecionadas nas estações amostrais está sendo realizada, seguindo o protocolo de Olive (1988). Amostras de raízes foram homogeneizadas e suas células lisadas. Em seguida, as mesmas foram levadas ao banho maria em 60°C por 10 minutos, incubados 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. Amostras de meristemas radiculares, fixadas em Carnoy, também serão avaliadas quanto a Frequência de Micronúcleo, como estabelecido por Fiskesjö (1985) e Leme e Marin-Morales (2008), com modificações.

2.2.4 Microbiota do sedimento associado à vegetação

Os resultados obtidos durante as etapas anteriores do PMBA/Fest (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 (2022-2024) busca a continuidade dessa caracterização *in vitro* quanto à habilidade de produzir compostos relacionados à promoção de crescimento: fixação de nitrogênio atmosférico, produção de fitohormônios, produção de ACC deaminases, solubilização de fosfatos, produção de enzimas como quitinases, glucanases, conforme descrito por Catellan (1999), e produção de compostos voláteis capazes de alterar a arquitetura das raízes (SHARIFI e RYU, 2018).

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, quitinase e salinidade (crescimento em meio salino). Os isolados selecionados foram repicados em meio TSA e incubados em BOD regulada à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ até o crescimento bacteriano cobrir toda a superfície do meio. Após, o foram obtidos discos de cada isolado selecionado para as avaliações a seguir:

Para avaliação da solubilização de fosfato, discos dos isolados bacterianos foram repicados em placas de Petri contendo o meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) (NAUTIYAL, 1999) ajustado para pH 6.0 e também para pH 5.0. O meio de cultura NBRIP contém fonte insolúvel de P na forma de fosfato tricálcio que na presença de cloreto de cálcio e substâncias liberadas pelos microrganismos, como ácidos orgânicos e enzimas no meio circundante, sofre processo de solubilização (NAUTIYAL, 1999). A avaliação ocorreu após cinco dias de incubação em BOD regulada à temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, quando foi verificada a presença ou ausência de halo translúcido ao redor das colônias com o indicador de solubilização de fosfato.

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

A fim de determinar a diversidade genética dos microrganismos presentes nos sedimentos das restingas monitoradas, o sequenciamento genético de isolados bacterianos selecionados foi realizada através da extração de DNA por lise alcalina (DE BOER e WARD, 1995), seguida pela amplificação e sequenciamento do gene rRNA 16s (LANE, 1991).

Etapas em andamento buscam a detecção de genes para fixação de N_2 , produção de auxinas, produção de ACC Deaminases e produção de compostos voláteis. Uma vez estabelecido o melhor conjunto de habilidades, será realizada a seleção das colônias de microrganismos que apresentarem a capacidade de colonizar o sistema radicular e ou tecidos internos das espécies de restinga que produzam sementes não recalcitrantes e que não apresentam dormência ou para as quais existam métodos eficientes de quebra de dormência. Essas análises visam a caracterização do potencial

mitigatório de bactérias produtoras de promotores de crescimento vegetal isoladas de sedimento e/ou raízes de espécies de Restinga das diferentes fitofisionomias.

2.2.5 Bioensaios com extratos solubilizados do sedimento presente nas estações amostrais da Restinga

O efeito dos contaminantes presentes no sedimento das restingas monitoradas no âmbito do PMBA/Fest sobre o desenvolvimento de espécies vegetais está sendo avaliado sob condições *in vitro*. Para isso, sementes de *Allium cepa* L. 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). Os ensaios seguiram o protocolo de Fiskesjö (1985), com modificações (DUARTE et al., 2017a), sendo as sementes expostas ao extrato solubilizado do sedimento das sete estações amostrais, permaneceram por 96 horas, período de 4 ciclos celulares. Após o tempo de exposição, foram determinadas a porcentagem de germinação e, assim, o Índice de Germinação (IG) (DUARTE et al., 2017a; b) e crescimento radicular (CR). Fases em desenvolvimento envolvem a avaliação da citotoxicidade pelo índice mitótico (IM) e frequência das alterações cromossômicas (FAC) e frequência de micronúcleos (FMN) em meristemas radiculares fixados em solução Carnoy (LEME e MARIN-MORALES, 2008).

Para a Identificação da causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação de metais, sementes das espécies de interesse foram embebidas em água a temperatura ambiente por 24 horas de acordo com metodologia proposta por Cunha (2005) e quando necessário, escarificadas mecanicamente (eliminação parcial do tegumento na região oposta ao hilo) (COSTA, 2013). Posteriormente, as sementes 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 nas concentrações de 0, 50, 100, 200 e 300% (cinco plantas para cada concentração) durante 45 dias.

Os dados obtidos da germinação, emergência, índice de velocidade de germinação foram avaliados (BORGHETTI e FERREIRA, 2004; VALIO e SCARP, 2001), sendo também aplicados testes para medir a velocidade e intensidade das atividades metabólicas das sementes e suas respostas fisiológicas, testes que avaliam os danos aos sistemas biológicos/bioquímicos, e a correlação entre os testes de germinação, tetrazólio, condutividade elétrica e emergência/normalidade das plântulas.

A capacidade de resposta da vegetação por propagação vegetativa também foi avaliada. Espécies selecionadas em ensaios anteriores foram submetidas a ensaios de dose-resposta de concentrações crescentes do metal, sendo utilizada como base a solução nutritiva proposta por Hoagland e Arnon (1950). A partir dos resultados obtidos, ensaios para a avaliação do efeito combinado de metais serão posteriormente realizados com a utilização de soluções nutritivas enriquecidas.

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 das restingas e variáveis de causa, como concentrações dos elementos químicos associados ao rejeito de mineração, 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
$V_{min} \leq V \leq y1$	A
$y1 < V \leq y2$	B
$y2 < V \leq y3$	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. 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 mais de 50% dos parâmetros se encontra em alto risco em um determinado ponto de coleta, assume-se que aquele ponto esteja em perigo, como pode ser representado a seguir:

Dessa forma, se em uma estação/formação:

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

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

2.2.7 Monitoramento das restingas via sensoriamento remoto

São utilizadas imagens adquiridas na forma de produtos Landsat corrigidas para efeitos geométricos e atmosféricos, e disponibilizadas pelo Serviço Geológico dos Estados Unidos (USGS, www.earthexplorer.org). Além destas, são 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 impossibilita a análise da formação herbácea, que continuará sendo avaliada *in locu*.

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). Serão 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. A partir destes, o sequestro de carbono pela vegetação depende da integração desses 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, auxiliarão 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.

2.3 HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS

O monitoramento das restingas no âmbito do PMBA/Fest 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 uma vez que esta é caracterizada 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 também está sendo 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 e anteriores ao rompimento da Barragem de Fundão.

As análises relacionadas ao depósito de particulado 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 e realizada por outro laboratório, a fim de contornar entraves logísticos e para garantir a celeridade das análises. Para o Ano 2, devido a interrupção das atividades de monitoramento pela Pandemia do COVID-19, estas análises não foram realizadas, pela perda da validade das amostras.

Para as análises granulométricas, químicas de rotina e matéria orgânica, o novo Plano de trabalho ampliou as análises para o monitoramento da mobilidade dos elementos traços para os órgãos florais (pistilo e estames) e recompensas florais (pólen e néctar) visando indicar a viabilidade das estruturas reprodutivas. Esse monitoramento já é realizado nas folhas das plantas da restinga desde o Ano 1.

As análises físicas do sedimento apresentaram mudança de metodologia para o Plano de Trabalho 2022-2024. 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. A adoção de metodologias distintas requer a adaptação e alinhamento do tratamento dos resultados que se encontra em discussão.

Em relação às análises da Microbiota do sedimento, o novo Plano de Trabalho não contempla mais a metodologia de avaliação das bactérias na produção de sideróforos, conforme proposto no Plano de trabalho de 2018 a respeito da “Identificação dos promotores na microbiota do sedimento”. Tal meta será executada a partir de outros aspectos relacionados à promoção do crescimento vegetal e capacidade fitorremediadora que poderão ser bons indicativos da capacidade de recuperação da Restinga impactada.

Ainda para o Novo Plano de trabalho, as metodologias de monitoramento da capacidade de recuperação da vegetação (propagação vegetativa e reprodutiva) e nível de tolerância aos elementos traços do rejeito foram adaptadas para análise de aspectos relacionados à reprodução por sementes, bem como teste de germinação - espécies herbáceas, em especial *Canavalia rosea* e *Ipomoea pes-caprae*). Adicionalmente, para o novo plano foram reprogramadas também as análises citotoxicológicas e os testes de viabilidade, que eram abordados no Plano de Trabalho 2018 como análises da viabilidade

do grão de pólen de espécies selecionadas. Para o Novo Plano de Trabalho, foram propostas análises variadas para a determinação de possíveis alterações ecotoxicológicas/citotoxicológicas na vegetação a partir do contato crônico com os elementos químicos provenientes da pluma de rejeitos.

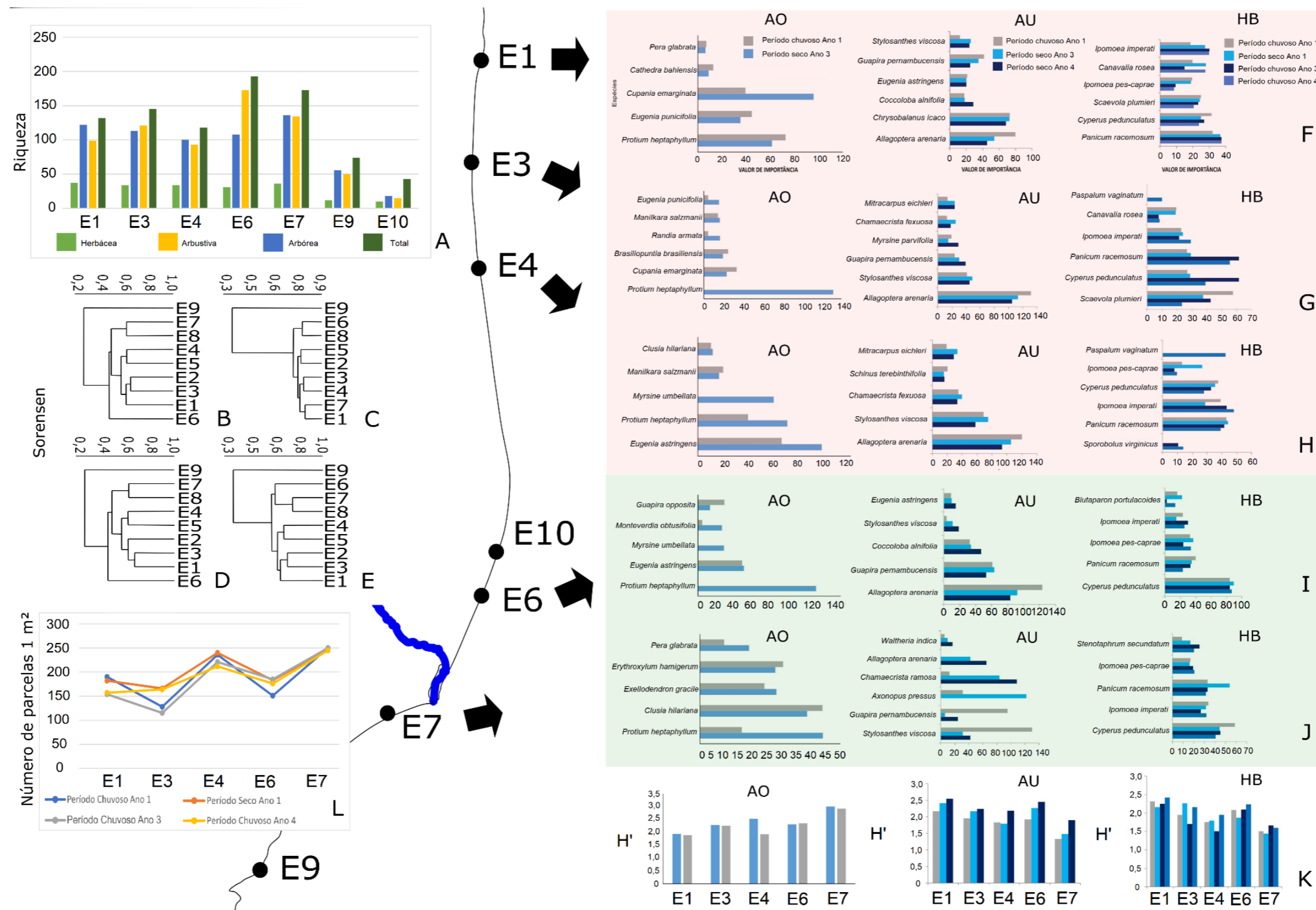
3 RESULTADOS DOS INDICADORES

Nesta seção serão apresentados os resultados dos indicadores de qualidade ambiental e da biodiversidade aquática do Tema, os quais foram desenvolvidos pelo PMBA/Fest e obtidos ao longo do monitoramento (setembro/2018 – setembro/2022) 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 a 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 vêm se consolidando ao longo de quatro anos de monitoramento, onde seus principais resultados foram discutidos em todos os relatórios técnicos entregues até o presente, entretanto a partir do novo modelo de relatório solicitado via ofício SEI nº 85/2022-CTBio/DIBIO/ICMBio, proposto via ofício FR.2023.0214 (SEI13515133) e aprovado via ofício SEI nº4/2023-CTBio/DIBIO/ICMBio, 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:

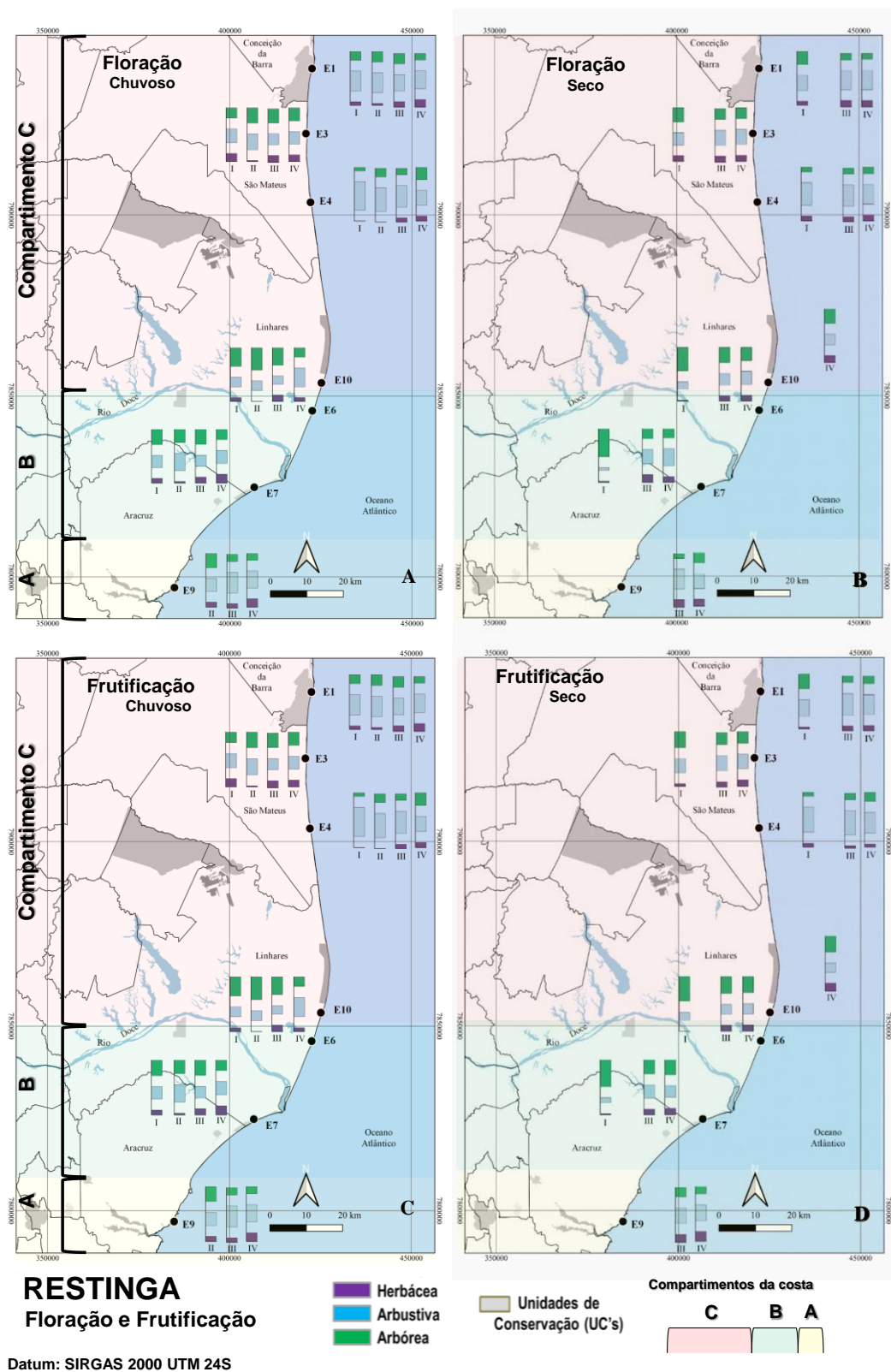
3.1 VITALIDADE DA VEGETAÇÃO

Figura 2: Resultados espaço-temporais dos parâmetros florístico-fitosociológicos avaliados em cada formação vegetal (HB = Herbácea; AU = Arbustiva; AO = Arbórea) das restingas monitoradas no PMBA/Fest entre períodos Chuvoso Ano 1 (2018) a Seco Ano 4 (2022). Riqueza florística das formações vegetais entre as estações amostrais (A); Similaridade florística entre estações amostrais (B), para a formação herbácea (C), formação arbustiva (D) e formação arbórea (E); Valor de importância das principais espécies amostradas das formações vegetais entre estações amostrais dos compartimentos da região costeira do Espírito Santo (F a J). Retângulo em Vermelho: Compartimento C; Retângulo em Verde: Compartimento B. Diversidade de Shannon das formações vegetais entre estações amostrais (K); Variação espaço-temporal do número de parcelas na formação herbácea entre estações amostrais monitoradas (L).



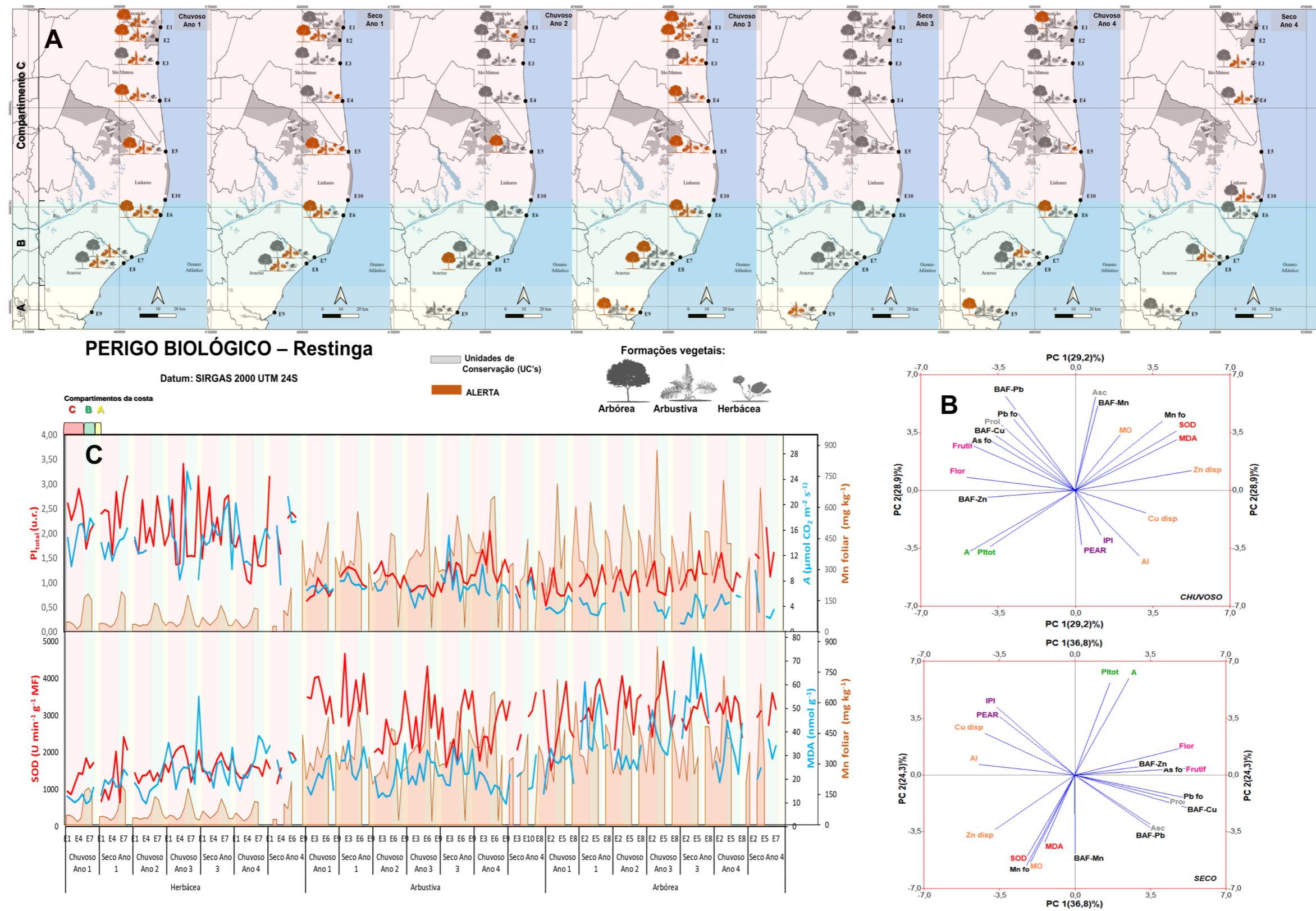
Os maiores valores de riqueza estão concentrados no Compartimento B, seguidos pelo Compartimento C e A (Figura 2A). A compartimentação do litoral segue os resultados obtidos no dendrograma de **riqueza florística** entre as estações (Figura 2B), refletido principalmente pela formação arbórea de restinga (Figura 2D). A singularidade do Compartimento A e C são refletidos principalmente pela **exclusividade de espécies** na formação arbustiva de restinga (Figura 2E) ou ausência de espécies na formação herbácea de restinga (Figura 2C). Na comunidade herbácea do Compartimento B, os dados obtidos no Ano 4, indicaram tendência de redução dos **valores de importância** de *Panicum racemosum* e *Blutaparon portulacoides* em relação ao Ano 1 (Figura 2I-J). Ainda que as comparações não tenham indicado diferenças significativas, fatores ainda não compreendidos estão atuando sobre a comunidade, principalmente sob a perspectiva de melhora não alcançada dentro do Ano 3, quando houve diminuição dos parâmetros meteorológicos. No Compartimento C, também houve redução dos valores de importância de espécies estoloníferas, acrescido de uma espécie subarbustiva ameaçada de extinção (*Scaevola plumieri*), cujo crescimento não alcançou os valores de importância obtidos durante o período chuvoso do Ano 1, mesmo sob condições brevemente satisfatórias. As informações obtidas para a comunidade herbácea indicaram uma melhora pontual (Aldeia do Coco-E3) na taxa de cobertura da vegetação sobre as dunas (Figura 2L) dentro do Compartimento C, mas com valores inferiores na APA de Conceição da Barra (E1) e em Barra Nova (E4). 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). Na comunidade arbustiva, houve tendência de redução do valor de importância em relação ao Ano 1. No Compartimento B, *Guapira pernambucensis* e *Stylosanthes viscosa* apresentaram redução devido a caducifolia esperada para período avaliado (Figura 2I-J). No Compartimento C, a caducifolia também corroborou a redução dos valores de *Allagoptera arenaria*, *Schinus terebinthifolius*, *G. pernambucensis* e *Chrysobalanus icaco* (Figura 2F a H). No entanto, os valores desta última espécie foram influenciados por ações antrópicas (caça de tatu) em E1. Os dados atuais não indicaram mudanças significativas na estrutura da comunidade arbustiva. A comunidade arbórea não apresentou mudanças estruturais significativas e, quando expressivas, não estiveram associadas com o evento, apenas com ações antrópicas (Figura 2F a J). Destaca-se que características como distância da praia e rugosidade das copas (refletida pela diversidade de Shannon – Figura 2K) influenciam na **captura de contaminantes veiculados pelo aerossol marinho** e, neste caso, mudanças no metabolismo são esperados.

Figura 3: 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 (2020), III (2021) e IV (2022) da vegetação de restinga monitorada no âmbito do PMBA/Fest.



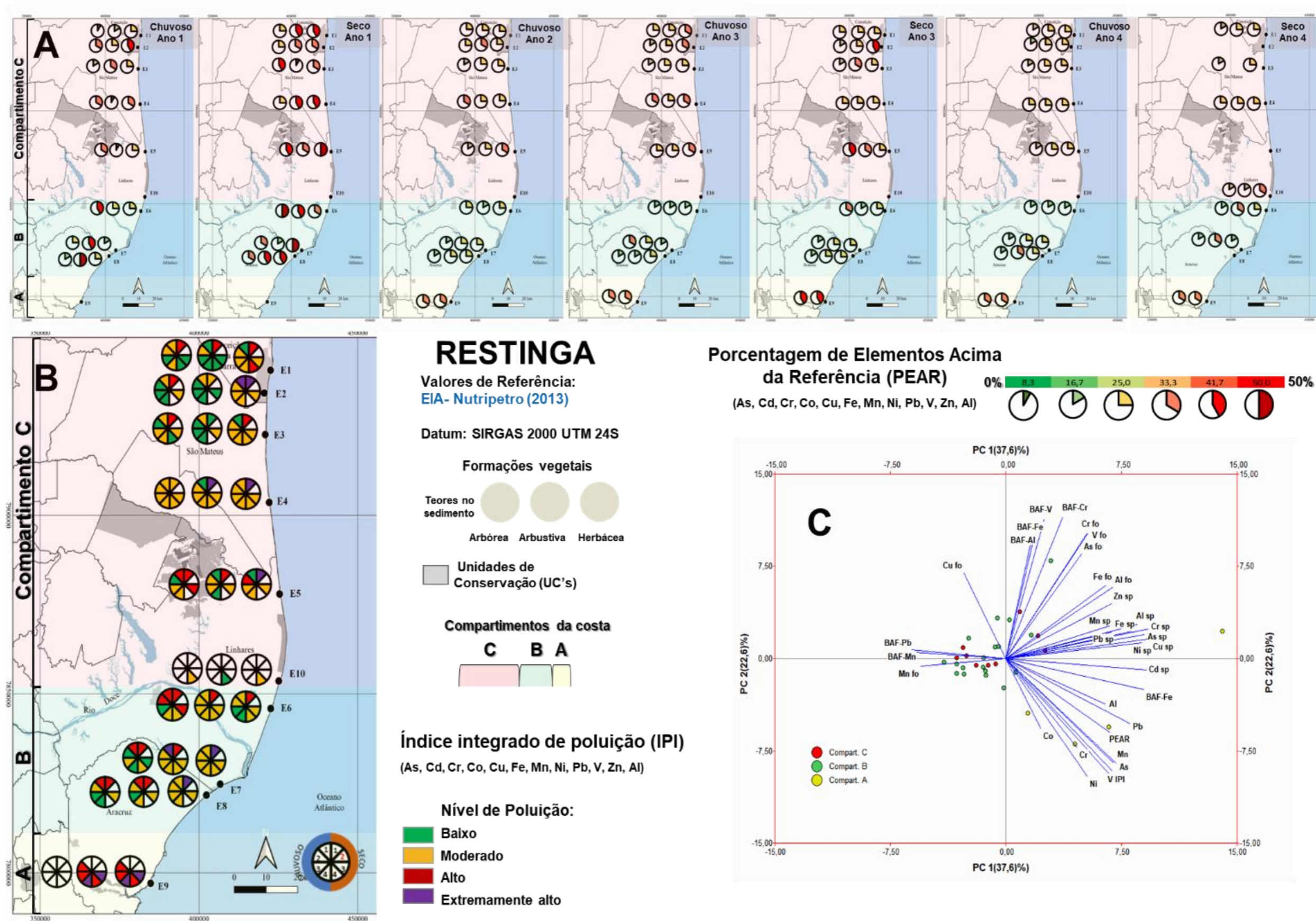
No compartimento A, a intensidade de floração capturada durante o Período chuvoso do Ano 4 foi acompanhada pela mesma intensidade de produção de frutos, indicando que os **eventos de polinização abióticos e bióticos** ocorreram naturalmente neste setor (Figura 3A). Comparativamente, este período indicou picos de floração mais acentuados em relação aos anos anteriores na comunidade herbácea, principalmente entre as espécies presentes em pequenos trechos estabilizados menos afetados pela abrasão das ondas. Este resultado é coerente com as altas taxas de pluviosidade capturadas dentro do período analisado. Entretanto, é importante ressaltar que este setor não foi avaliado durante o Ano 1, devido a sua adição posterior à malha amostral. A intensidade de frutificação das arbustivas acompanhou a proporção de floração, não havendo diferenças expressivas em relação ao Ano 3 (Figura 3C). Apesar das diferenças de esforço amostral em relação aos outros setores, ressalta-se que a produção de frutos carnosos não foi alterada, indicando interação com os polinizadores. Em relação à comunidade arbórea, a **intensidade de frutificação** superou a floração em virtude do desenvolvimento tardio de frutos secos de espécies trepadeiras, que preferencialmente dispersam de seus frutos durante o período seco (Figura 3D). A **intensidade de floração** foi menor em relação ao Período Chuvoso do Ano 3, com espécies investindo no brotamento. No compartimento B também houve sincronia entre floração e frutificação no período chuvoso em REBIO Comboios, e para Cacimbas, os dados atuais indicaram tendência de melhora. Destaca-se o predomínio de frutos anemocóricos na formação herbácea, cujo pico de dispersão acontece durante o período seco (Figura 3B-D). Apesar do Ano 1 ter indicado menor **capacidade reprodutiva** na estação chuvosa, nos anos seguintes houveram oscilações de intensidade floral que indicam ser características deste setor. Assim, as avaliações em relação ao período seco devem ser continuadas para confirmar a menor capacidade reprodutiva deste setor, uma vez que há carência de informações fenológicas durante o período seco (Figura 3B-D) envolvendo adequações da Pandemia Covid-19. O Compartimento C foi mais afetado em relação a alterações na **sincronia reprodutiva**, concentradas na comunidade herbácea da APA de Conceição da Barra (E1). Os dados atuais indicaram melhora sobre a intensidade frutificação e disponibilidade de flores, destoando dos resultados dos períodos chuvosos dos anos anteriores. Uma perspectiva envolvendo contaminantes oriundos do spray marinho foi proposta anteriormente. A exposição das plantas ao aerossol marinho pode favorecer a adesão dos elementos na superfície das folhas, possibilitando a penetração no mesófilo foliar através de fissuras cuticulares e dos estômatos, bem como, via absorção radicular. Como a alta toxicidade de elementos pode causar estresse oxidativo, efeitos sobre o **sucesso reprodutivo** podem ser esperados.

Figura 4: Alerta de Perigo Biológico para plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas das restingas monitoradas pelo PMBA/Fest nos períodos Chuvoso Ano 1 (2018) a Seco Ano 4 (2022) **(A)**. Análise de Componentes Principais (PCA) entre variáveis abióticas e biológicas de resposta da vitalidade **(B)**: Floração (Flor), Frutificação (Frutif), Fotossíntese líquida (A), Índice de desempenho fotossintético (PI_{total}), atividade da Superóxido dismutase (SOD), teores de Malonaldeído (MDA), Ascorbato (Asc) e Prolina (Prol), concentração de elementos minerais no sedimento e nas folhas (fo), Fator de bioacumulação (BAF), Índice Integrado de Poluição (IPI) e Porcentagem de elementos acima da referência (PEAR), para períodos CHUVOSOS e SECOS. Variação espaço-temporal de variáveis de Produtividade primária e Estresse oxidativo em resposta a concentração de manganês **(C)**.



O mapeamento da **Vitalidade da vegetação da Restinga** por meio da análise integrada do **Alerta de Perigo Biológico** mostra sazonalidade ao longo do monitoramento (Figura 4A), integrando quatro categorias biológicas de resposta: Produtividade primária, Metabolismo primário, Estresse oxidativo e Reprodução, para identificar as potenciais respostas espaço-temporais aos elementos químicos. Os maiores Alertas nos períodos chuvosos e assim, menor vitalidade da vegetação, apontam os Anos 1 e 3 como de crítico destaque. Dentre as formações, arbustivas e arbóreas apresentaram menor vitalidade, especialmente as arbustivas, com frequência de Alertas em pelo menos uma localidade em todos os períodos. Mesmo distantes da linha da costa, fatores edafoclimáticos, o aporte proveniente do Rio Doce e a remobilização marinha, prejudicaram aspectos funcionais e reprodutivos das duas formações. Enquanto nos períodos chuvosos foi observada tendência de melhora da vitalidade, o período Seco Ano 4 retoma o Perigo às plantas arbustivas entre REBIO Comboios (E7), Compartimento B, e Aldeia dos Cocos (E3), no Compartimento C. Cabe ressaltar a nova estação amostral em Degredo (E10), Compartimento C, também com menor vitalidade para arbustivas, condizente com o já obtido para a estação mais próxima, Cacimbas (E6), com características transicionais entre os compartimentos, cujos resultados indicam condições desfavoráveis para seu perfil fotossintético e metabólico. A PCA (Figura 4B) indicou que acúmulos de Mn, As, Pb, e Zn impactaram negativamente as formações com influência persistente sobre as categorias biológicas. A **Produtividade primária** das comunidades indica forte associação de acúmulos de Mn ($r > -0,65$; $p < 0,001$) com a redução de PI_{tot} e A pela vegetação, e também ao aumento da concentração de Zn no sedimento. Igualmente, o **Estresse oxidativo** da vegetação tem relação com as variações foliares e bioacúmulos de Mn ($r > 0,70$; $p < 0,01$). Destaca-se o **manganês como metal de grande impacto**, pois permanece em excesso em todas as estações e formações avaliadas, influenciando a Produtividade Primária e o estresse oxidativo nas plantas (Figura 4C) como estratégias de atenuação de possíveis impactos resultantes da bioacumulação nas plantas. Dentre os metais(lóides) associados ao rejeito, aumentos no acúmulo de Pb, Cu e Zn ($r > 0,56$; $p < 0,001$) relacionaram-se ao aumento na produção dos **Metabólitos primários** Prol e Asc na vegetação. As tendências da **Reprodução** das comunidades mostram sazonalidade que se associou significativamente à acúmulos de As, Pb e Zn. Em suma, temporalmente, ainda não há tendência de estabilidade nas condições e nas respostas da vegetação da Restinga, apesar da nítida tendência de melhora do Ano 1 para o Ano 4. Contudo, os resultados permitiram confirmar o papel do **As, Mn, Zn e Pb como aqueles de maior recorrência de impacto à Vitalidade das restingas**, impactando as categorias biológicas e confirmando crítica vitalidade das restingas para os períodos chuvosos.

Figura 5: Contaminação das restingas 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 Seco Ano 4 (2022) no âmbito do PMBA/Fest. Porcentagem de Elementos Acima da Referência – PEAR (A); Índice Integrado de Poluição – IPI (B); e Análise de Componentes Principais – PCA – entre variáveis abióticas (C) nos diferentes Compartimentos da região costeira do Espírito Santo.



Em termos de variação abiótica influenciando diretamente a resposta do indicador **Vitalidade da vegetação da Restinga**, o monitoramento no âmbito do PMBA/FEST-UFES continua a destacar elementos em excesso no sedimento, desde o Ano 1, como As, Co e Mn, assim como Pb, Cu, Cd, Cr, Zn e Ni, quando analisada a **Porcentagem de Elementos Acima da Referência (PEAR)** (Figura 5A). Especialmente, o **Índice Integrado de Poluição (IPI)** (Figura 5B) evidenciou tendência global de diminuição da poluição no Ano 4. Temporalmente, as maiores contribuições para o aumento de IPI nos períodos chuvosos estiveram relacionadas à Mn ($r = 0,99$), Pb ($r = 0,98$), Ni ($r = 0,98$), As ($r = 0,96$), V ($r = 0,98$) e Al ($r = 0,84$); ($p < 0,01$), especialmente no Compartimento A. O último ano (Ano 4) foi caracterizado por aumento na poluição de moderada a alta principalmente próximo à Foz, quando comparado ao mesmo período no ano anterior. Por outro lado, os níveis de poluição dos períodos secos apresentaram maiores contribuições dos elementos As ($r = 0,99$), Mn ($r = 0,97$), V ($r = 0,97$), Ni ($r = 0,95$) e Pb ($r = 0,87$); ($p < 0,001$). O período Seco Ano 4 apresentou sinais de melhora da poluição quando comparado ao Ano 3, como observado em Cacimbas (E6) e Mar Azul (E9), nas quais os níveis de poluição reduziram para moderado e alto. O depósito sobre a flora da Restinga de elementos associados ao rejeito de mineração, como As, Cd, Cr, Co, Ni, Pb, V, Mn, Al e Fe, corrobora o padrão e a abundância de elementos químicos observados em períodos anteriores. Para o sedimento, a análise global da contribuição do aerossol marinho evidencia a influência do aporte de elementos minerais no aumento das concentrações no sedimento para As, Cr, Mn, Pb e Al (Figura 5C). Houve um aumento contínuo na abundância de metal(oides) presentes no aerossol marinho ("**Spray**") avaliado na REBIO Comboios (E7), no Compartimento B, desde o período Seco do Ano 3, e apontou maior influência dos aumentos nas concentrações de elementos que chegam à costa via aerossol marinho sobre os níveis de poluição. Essa maior relação é evidenciada nas proximidades das áreas de maior aporte de elementos químicos, refletindo diretamente na composição elementar do sedimento das áreas amostradas, e pode responder a fatores como a direção dos ventos, a qualidade da água que chega à costa neste período e o alto grau de exposição às ondas, típico do perfil praiar dessa região. Por outro lado, em Cacimbas (E6) a redução nas concentrações provenientes do spray pode ter relação direta com a redução da contaminação do sedimento, desde Ano 3, principalmente para a vegetação herbácea. Além disso, tendências a maiores depósitos de elementos do aerossol têm sido observadas na vegetação localizada ao norte do monitoramento, herbácea e arbustiva, potencialmente decorrente das particularidades da distribuição da vegetação e da possível influência do aumento da vazão do Rio Doce, em virtude dos altos índices pluviométricos, que superou dos anos anteriores e perdurou ao longo do Ano 4. Para a vegetação, as contribuições significativas do aerossol marinho foram associadas a acúmulos de Mn, As, Cr, Fe, V, Zn e Al nos tecidos foliares. Dentre estes, a vitalidade da vegetação da restinga teve estreita relação com a bioacumulação de elementos nos tecidos foliares, principalmente expressos pelo **Fator de bioacumulação (BAF)** para Mn e Zn (Figura 5C), os quais apresentaram correlações significativas com os teores de metais na folha e no sedimento, e com as variáveis das categorias de resposta biológicas da vegetação da restinga.

4 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS

Para o Tema Restinga identificou-se um hiato nas Análises do Impacto citogenético / Efeitos ecotoxicológicos na dinâmica da vegetação. No Ano 1, as análises de viabilidade do grão de pólen foram realizadas e a meta cumprida. O quantitativo analisado, associado às análises complementares, permitiram a avaliação objetivada pela meta. No Ano 2, devido a pandemia da COVID-19, não foram realizadas coletas. Nos Anos 3 e 4, devido ao cenário de indefinição sobre a continuidade do Projeto, pelas prorrogações curtas judiciais, e a necessidade de contratação de um novo especialista para a realização das análises, estas não foram realizadas. Com o aditivo do Novo Ciclo do PMBA houve nova contratação e os dados e amostras coletados estão em processo de análise.

As demais análises propostas no Novo Plano de Trabalho seguem o cronograma previsto.

5 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.

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

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A. G. *Interpretação de resultados de germinação*. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Eds.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, p.209-222, 2004.

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

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

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.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society American Journal**, v. 63, p. 1670-1680, 1999.

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.

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. Acesso em: 22 jan. 2020.

DUARTE, I.D.; SILVA, N.H.; DA COSTA SOUZA, I.; DE OLIVEIRA, L.B.; ROCHA, L.D.; MOROZESK, M.; BONOMO, M.M.; DE ALMEIDA PEREIRA, T.; DIAS, M.C.; DE OLIVEIRA FERNANDES, V.; MATSUMOTO, S.T. Water quality of a coastal lagoon (ES, Brazil): abiotic aspects, cytogenetic damage, and phytoplankton dynamics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 11, p. 10855-10868, 2017a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8721-2>. Acesso em: 18 mar. 2023.

DUARTE, Ian Drumond et al. Cytogenetic responses of *Allium cepa* L. after exposure to contaminated pond waters. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 1, 2017b.

DUTRA, VALQUIRIA FERREIRA; ALVES-ARAÚJO, ANDERSON; CARRIJO, TATIANA TAVARES. Angiosperm checklist of Espírito Santo: using electronic tools to improve the knowledge of an Atlantic

Forest biodiversity hotspot. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, p. 1145-1152, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566414>. Acesso em: 14 nov. 2020.

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

FEST, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. **Relatório Semestral de Evolução do PMBA/Fest - Síntese Integrativa entre Ambientes. RT-42**. Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 204 pag. 2023.

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

FISKEJO, G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v.102, p.99-112, 1985.

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

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.

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.

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.

GRIFFITH, O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Analytical Biochemistry**, v.106, n1, p.207-212, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90139-6). Acesso em: 13 jun. 2022.

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.

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

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.

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.

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.

LEME DM.; MARIN-MORALES, MA. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.650, n.1, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.006>. Acesso em: 18 mar. 2023.

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.

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

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

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

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

MORELLATO, L.P.C., RODRIGUES, R.R., LEITÃO FILHO, H.F.; JOLY, C.A. Estudo comparativo da fenologia de espécies arbóreas de floresta de altitude e floresta mesófila semi-decídua na Serra do Japi, 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.

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 Brasílica**, 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-NESI, 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.

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, 2020.

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

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

RAHMAN, 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.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. **Relatório Semestral de Evolução (RSE). RT-35**, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 1070 pag. 2020.

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.

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.

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.

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, 2007.

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

VÁLIO, I.F.M.; SCARPA, F.M. Germination of seeds of tropical pioneer species under controlled and natural conditions. **Rev. Bras. Bot.** v. 24, n.1, p.79-84, 2001.

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.

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

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

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

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.