

**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- 46/ JUN 24

RA2023 PMBA/FEST

Vitória,

Junho de 2024

EQUIPE TÉCNICA

Adriano Nunes Nesi

Andréa Bittencourt Moura

Diolina Moura Silva

Marcos Antonio Baccarin

Oberdan José Pereira

Silvia Tamie Matsumoto

Valquíria Ferreira Dutra

Wagner Luiz Araújo

Auxiliadora Oliveira Martins

Mariela Mattos da Silva

Oeber de Freitas Quadros

Rodrigo Theofilo Valadares

Sabrina Garcia Broetto

Thais Araujo dos Santos Gasparini

Vanessa Nogueira Soares

Natã Carlos Lira Madeira

Aline Delon Firmino

Bruna Silva Corrêa

Gislane Chaves Oliveira

Juliana da Silva Penha

Mariana Machado Rocha

Romário de Oliveira Silva Junior

Vinícius Henrique de Carvalho

Leo Gasparini de Oliveira

Cleberson dos Santos Loureiro da Victoria

Davi Valim Bastos

Gabriel Rosa de Souza

Geise Davi Dalcin

Lívia Davel Gomes

Marcelle Leite Mainardi

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL.....	4
2	METODOLOGIA.....	4
2.2	COLETA.....	4
2.2.1	Análises de contaminantes no sedimento, material depositado sobre as folhas (“Spray”) e tecidos vegetais	4
2.2.2	Inventário Florístico e da Estrutura, e Fenologia da vegetação	6
2.2.3	Monitoramento ecofisiológico da vegetação de restinga	9
2.2.4	Respostas de espécies vegetais à contaminação por elementos minerais e capacidade de recuperação da Restinga.....	9
2.3	ANÁLISE	11
2.3.1	Contaminação do sedimento, do material depositado sobre as folhas (“Spray”) e dos tecidos vegetais, e granulometria	11
2.3.2	Inventário Florístico e da Estrutura, e Fenologia da vegetação	12
2.3.3	Análises bioquímicas e alterações celulares das restingas monitoradas	15
2.3.4	Microbiota do sedimento associado à vegetação	15
2.3.5	Identificação da causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação de metais em espécies da restinga.....	17
2.3.6	Análise de dados e determinação da Situação de Risco e Alerta de Perigo	21
2.3.7	Monitoramento das restingas via sensoriamento remoto.....	23
2.3.8	Estratégias para divulgação científica e popularização da ciência para conservação da Restinga	23
2.4	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS	24
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	27
3.1	VITALIDADE DA VEGETAÇÃO	28
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS 5 ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO	45
5	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	48
6	REFERÊNCIAS	50

1 HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

A malha e frequência amostral do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest) passou por modificações ao longo do tempo, visando seu aperfeiçoamento para atendimento 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 continuidade do monitoramento, apresentadas e aprovadas em 2022, visando o “Novo Ciclo do PMBA/Fest”.

As modificações implementadas se encontram nos seguintes Materiais Suplementares: 1) MS – Malha e Frequência amostral, 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 histórica referente às malhas amostrais dos Ambientes. Como forma de esclarecer os períodos contemplados em cada uma delas, “Ano 1” se refere às estações amostrais monitoradas 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 monitoradas a partir de agosto de 2022, à exceção do grupo da Ecotoxicologia, que iniciou a amostragem referente ao Novo Ciclo em janeiro de 2023.

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 agosto de 2022 (e dezembro de 2022 para o Tema Ecotoxicologia). 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.

2.2 COLETA

2.2.1 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 inclui as três formações vegetais (herbácea, arbustiva e arbórea) amostradas em cada estação do Tema Restinga. 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 com 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.

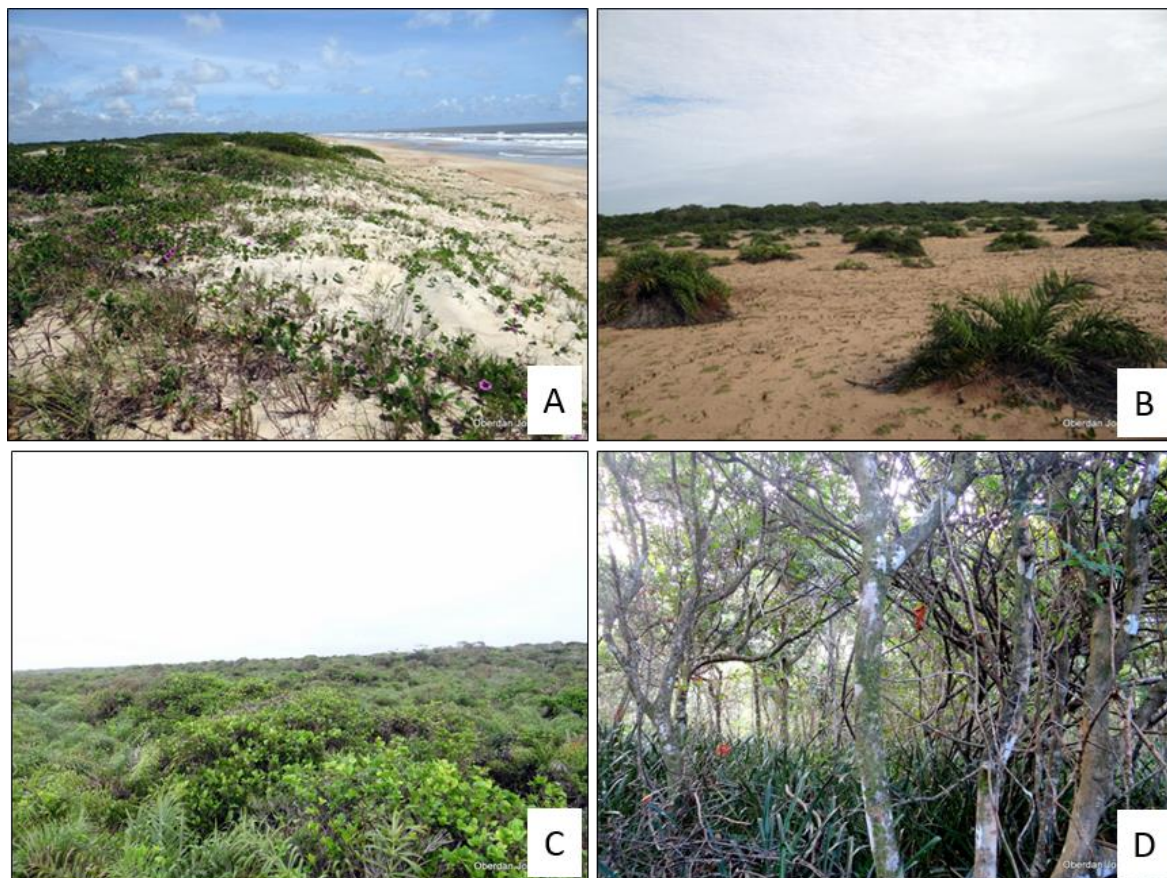
Coleta de recursos florais: a análise de estruturas reprodutivas e recompensas florais considera a amostragem de pólen e mel, as quais permitem a determinação da origem floral e presença de pólen das espécies mais frequentes encontradas nas estações amostrais de acordo com cada localidade de produção. 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 (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 atende aos critérios de avaliação de uso dos recursos no ecossistema estudado. Um total de cinco colmeias de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) foram avaliadas. 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. As amostras foram acondicionadas em tubos falcon esterilizados e acondicionados a 22°C. Após processamento, alíquotas de 1g de pólen e mel foram encaminhadas em triplicata ao Laboratório de Espectrometria Atômica do Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo (LEA/UFES) para a determinação de elementos químicos.

2.2.2 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 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 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 setembro/2023. 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. 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 e 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), para acompanhar a dinâmica da vegetação no espaço e tempo. 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 três avaliações foram efetuadas em fevereiro/2021 (período Chuvoso Ano 3), janeiro/2022 (período Chuvoso Ano 4) e abril/2023 (período Seco Ano 5). Nessa formação, utilizou-se o método de parcelas alternadas de Mueller-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 (MUELLER-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 abrangessem mais tempo. Assim, as avaliações seguintes foram efetuadas em abril/2021 (período Seco Ano 3), maio/2022 (período Seco Ano 4) e abril/2023 (período Seco Ano 5). 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), sumarizada 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) e outubro/2022 (período Chuvoso Ano 4).

A coleta de **dados fenológicos da vegetação** da Restinga durante o Ano 1 permitiram 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).

2.2.3 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 .

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

2.2.4.1 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.

2.2.4.2 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 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 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 nas restingas 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 salzmannii*, *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. salzmannii*, 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.

2.3 ANÁLISE

2.3.1 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 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 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 das restingas, 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 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).

2.3.2 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 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 exsicatas 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 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).

O **inventário polínico** das amostras do mel de abelha produzido no entorno da Estação 10 (Degredo - Linhares) foi realizado a fim de determinar a origem floral e presença de pólen 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 com gelatina glicerínada. 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:

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

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 $CT = \sum nCi$, n é o número de parcelas, C é a cobertura da espécie por m^2 , 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:

$$DoR = 100 \times DoA / DoT,$$

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.

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 provindas 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.

2.3.3 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 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 genotoxicológicas *in vivo*, na vegetação das restingas monitoradas, 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.

2.3.4 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, 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 ± 2 °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 ± 2 °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 ± 2 °C com fotoperíodo de 12h luz/escuro e avaliadas aos 7, 14, 21 e 28 dias; d) *M. parvifolia* (tratamento 1- controle, tratamento- 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 ± 2 °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 restingas 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 N₂, produção de auxinas, produção de ACC Deaminases.

2.3.5 Identificação da causa-efeito entre danos ecofisiológicos e contaminação de metais em espécies da restinga

2.3.5.1 Ensaios com extrato solubilizado em espécies modelos

O efeito dos contaminantes presentes no sedimento das restingas monitoradas no âmbito do PMBA/Fest, 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 µm 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 toxicogênico dos tratamentos. A citotoxicidade foi avaliada por meio do índice mitótico, determinado pela razão do número de células em divisão (interfase, 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).

2.3.5.2 Ensaios com extrato solubilizado em espécies de restinga

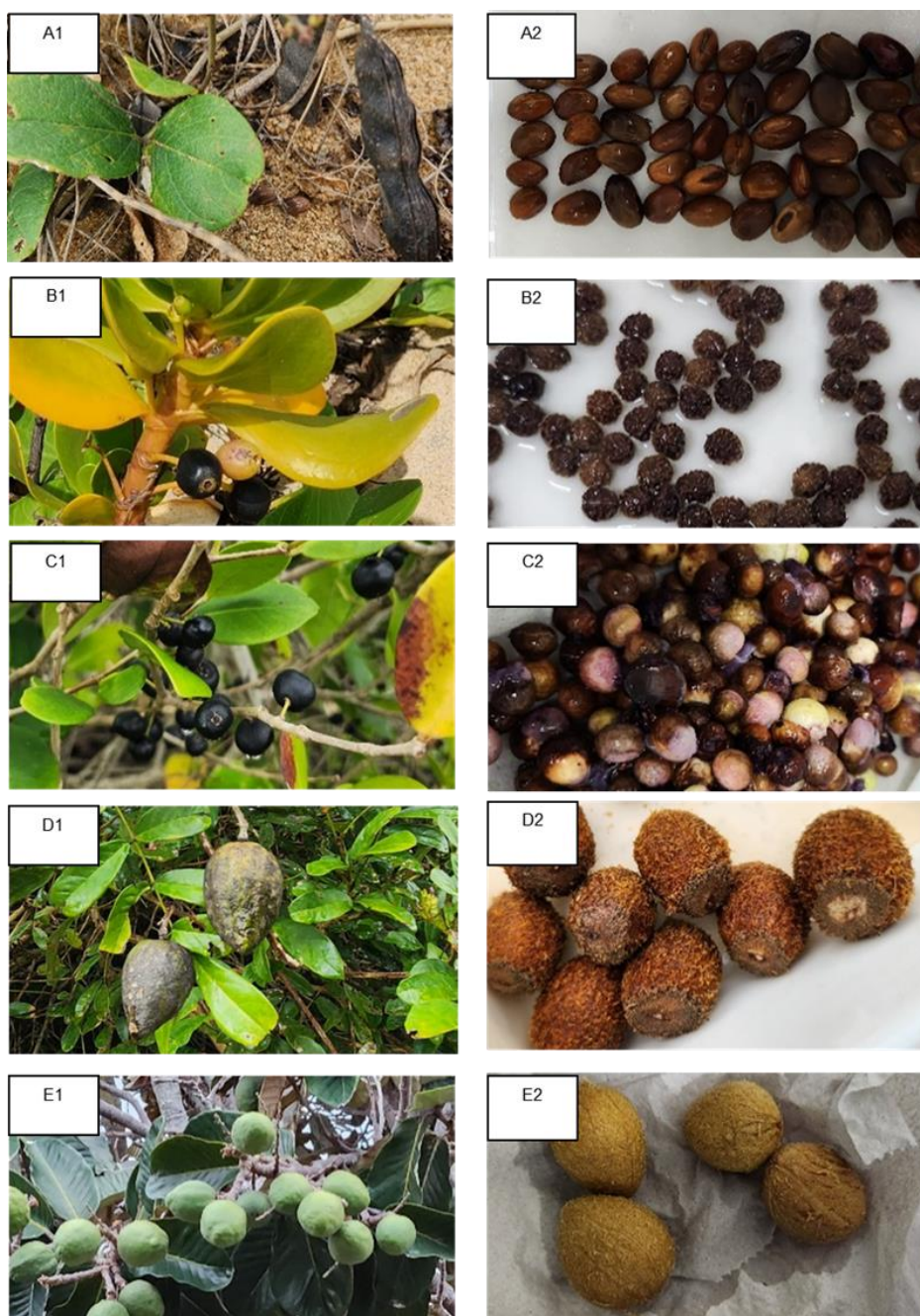
A fim de avaliar a respostas de plantas de restinga, frutos de espécies representativas da restinga foram coletados nas estações monitoradas e levados ao Núcleo de Estudos da Fotossíntese (NEF) na Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Goiabeiras, Vitória, ES (Figura 2). Os frutos foram despulpados com auxílio de peneira, e as sementes desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio (SILVA, 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, 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*, *A. fraxinifolia* e *C. 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 das 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.

2.3.5.3 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 quebra da dormência, sementes foram inicialmente colocadas em uma caixa plástica junto com 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 nutriente 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 -difênil- β -picrilhidrazila (DPPH) de acordo com as espécies e tecidos vegetais analisados (RUFINO et al., 2006; TEXEIRA et al. 2008; MELO, 2022; PIRES et al. 2017).

2.3.6 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
$V_{min} \leq V \leq y_1$	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 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:

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

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) apresenta 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.

2.3.7 Monitoramento das restingas via sensoriamento remoto

Para o monitoramento das restingas 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 impossibilita a análise da formação herbácea, que continuará sendo 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 CO_2 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 a 2023 (período de monitoramento pelo PMBA/Fest). 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 CO_2 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, auxiliam 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.

2.3.8 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 nas Restingas 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 nas Restingas do Rio Doce, através da ciência cidadã.

2.4 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, 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 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. 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 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 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 realizada 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.

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 em relação à obtenção do material de estudo. Na metodologia anterior era utilizado material 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 são 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 da 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).

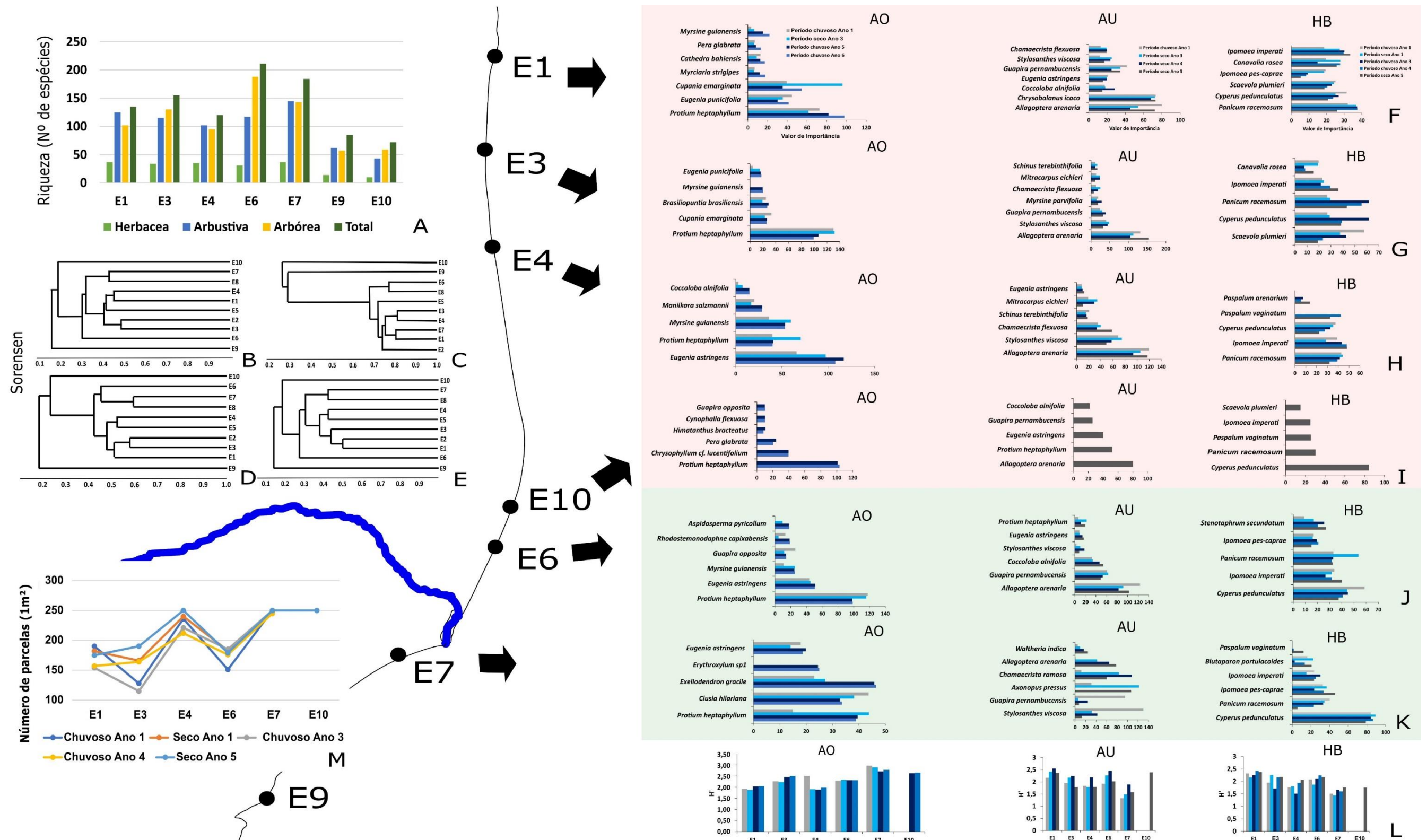
3 RESULTADOS DOS INDICADORES

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 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 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

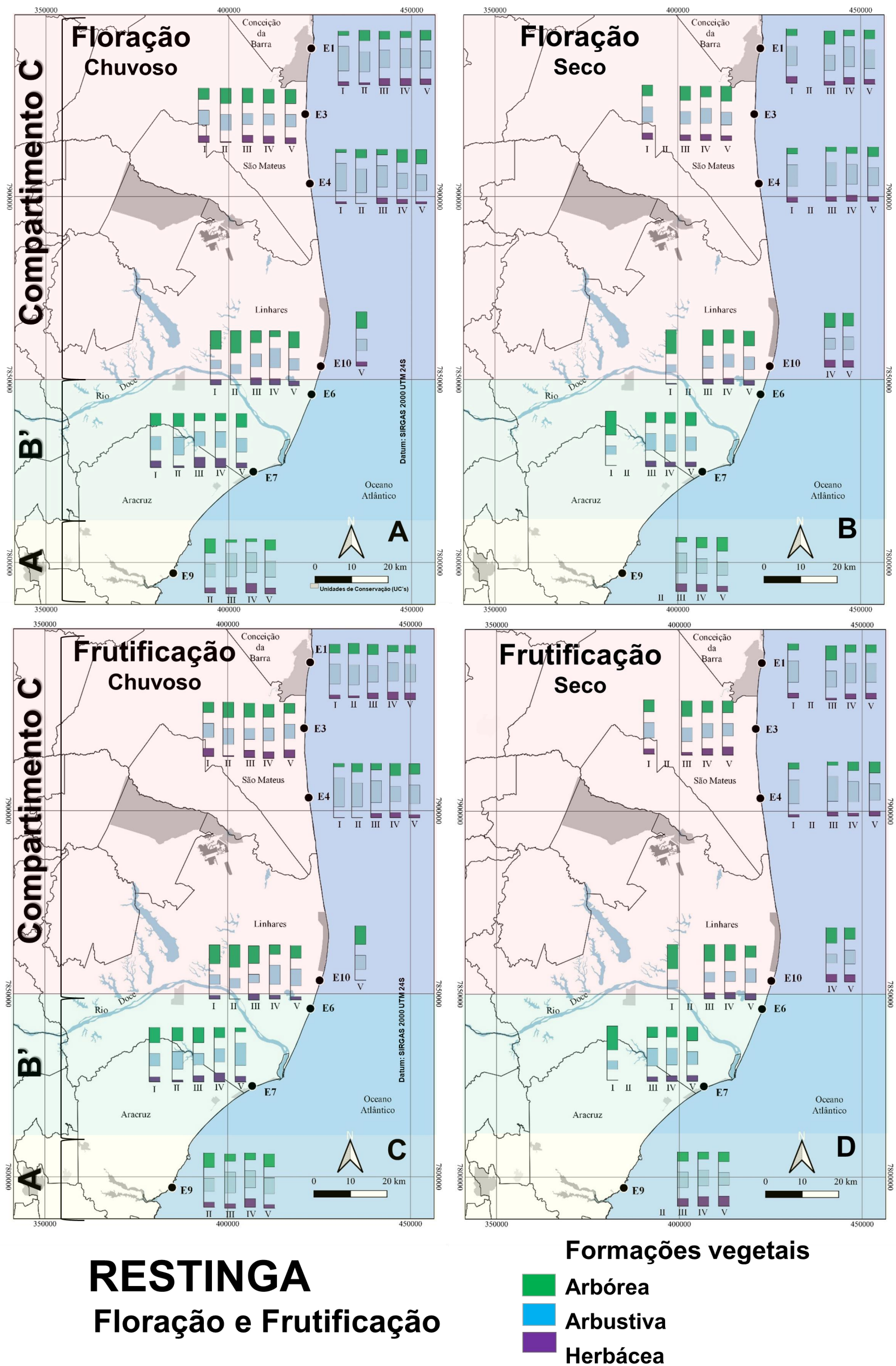
Figura 3: Resultados espaço-temporais dos parâmetros florístico-fitosociológicos avaliados em cada formação vegetal (HB = Herbácea; AU = Arbustiva; AO = Arbórea) das restingas monitoradas no PMBA/Fest entre períodos Chuvoso Ano 1 (2018) a Chuvoso Ano 6 (outubro de 2023). Riqueza florística das formações 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 K). 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 (M).



Os maiores valores de riqueza estão concentrados no Compartimento B', seguidos pelo Compartimento C e A (Figura 3A). A compartimentação do litoral segue os resultados obtidos no dendrograma de **riqueza florística** entre as estações (Figura 3B), refletido principalmente pela formação arbórea de restinga (Figura 3E). O posicionamento intermediário de E10, quanto à sua similaridade florística em relação às demais restingas, entre os Compartimentos B' e C é refletido na análise. A singularidade dos Compartimentos A e C é reproduzida principalmente pela **exclusividade de espécies** na formação arbustiva (Figura 3D) ou ausência de espécies na formação herbácea de restinga (Figura 3C). Na comunidade herbácea do Compartimento B', os dados obtidos no Ano 5 indicaram tendência de redução dos **valores de importância** de *Panicum racemosum* e *Cyperus pedunculatus* em relação ao Ano 2 (Figura 3J-K). 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 desenvolvimento não alcançou os valores de importância obtidos durante o Ano 1, indicando declínio continuado. As informações obtidas para a comunidade herbácea indicaram melhora na taxa de cobertura da vegetação sobre as dunas (Figura 3M) dentro do Compartimento C, embora, pontualmente, valores de importância inferiores na APA de Conceição da Barra (E1), como em *P. racemosum* e *C. pedunculatus*, indiquem contínua perda de cobertura vegetal. 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). Em relação à estrutura da comunidade arbustiva, os resultados demonstraram flutuações nos valores de importância (Figura 3F-K), sem correlação com os contaminantes oriundos do rejeito. Alterações de origem antrópica ocorreram no Compartimento C (E1 e E4), o que tem indicado declínios pontuais nesta comunidade. A partir dos resultados obtidos em E10, dentro do Novo Ciclo de monitoramento do PMBA/Fest, constatou-se que esta comunidade apresentou valores de diversidade muito destoantes em relação às outras estações, o que pode estar relacionado ao seu posicionamento espacial próximo ao Compartimento B'. Alterações antrópicas também influenciaram na alternância de posições entre as espécies mais importantes da comunidade arbórea. Tensões como queimadas e corte seletivo de madeira foram os principais fatores que dificultaram a mensuração dos dados em E2 e E4 ao longo de todo o monitoramento. Os dados atuais não indicam mudanças significativas na estrutura da comunidade arbustiva relacionadas com as flutuações de contaminação capturadas ao longo do monitoramento. As avaliações na comunidade arbórea do Compartimento B indicaram manutenção do ranking de espécies mais importantes, com destaque para *Exellodendron gracile* na E7. Neste compartimento, alterações estruturais estiveram associadas à dinâmica natural da comunidade, envolvendo queda de árvores (e.g. *Clusia hilariana*) e abertura de clareira, sem associação com o evento. A avaliação da comunidade arbórea no Compartimento C, durante o Ano 6, agravou-se em E1 e E4, quando comparados com os parâmetros obtidos no Ano 1, associada a ações antrópicas como queimadas e corte seletivo de madeira (Figura 3F e H). Neste Compartimento, a

primeira avaliação desta comunidade na E10 indicou que a estrutura da vegetação acompanha o padrão regional esperado contendo alta dominância e frequência de *Protium heptaphyllum* (Figura 3I). Alternâncias entre os valores das espécies mais importantes ocorreram dentro do intervalo de confiança nos dois compartimentos avaliados (Figura 3F a K). Destaca-se que características como distância da praia e rugosidade das copas (refletida pela diversidade de Shannon – Figura 3L) influenciam na **captura de contaminantes veiculados pelo aerossol marinho** e, neste caso, mudanças no metabolismo são esperadas. Até o presente, não foi possível determinar se as mudanças estruturais observadas estão correlacionadas com a contaminação oriunda do rejeito, embora a contaminação sobre a comunidade arbórea tenha sido detectada. Porém, seus efeitos sobre a organização da comunidade são lentos e requerem estudos ao longo do tempo.

Figura 4: Amplitude fenológica das espécies chave avaliadas em cada formação vegetal encontrada nas estações amostrais durante os períodos chuvosos nos Anos I (2018/2019), II (2019/2020), III (2020/2021), IV (2021/2022) e V (2022/2023) da vegetação de restinga monitorada no âmbito do PMBA/Fest. Dados não mostrados no Ano II referem-se ao período de interrupções devido ao COVID-19.

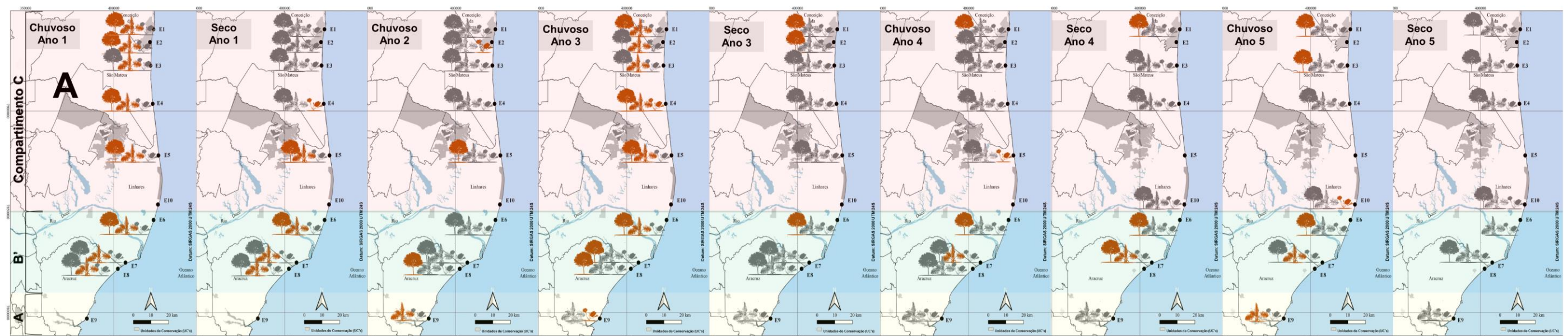


As comunidades herbácea e arbustiva foram as que melhor responderam aos eventos morfodinâmicos da praia, em relação aos padrões fenológicos do Compartimento A (Figura 4). Mesmo com ocorrência variável de espécies na comunidade herbácea, a avaliação temporal demonstrou fenologia reprodutiva dentro dos intervalos de confiança em relação ao Ano 1 (Figura 4A e B). Ao longo do monitoramento, a comunidade arbustiva apresentou fenologia vegetativa influenciada por eventos isolados de inundação durante períodos morfodinâmicos acentuados, com consequente queda de folhas. No entanto, as análises fenológicas indicaram não haver mudanças relevantes quanto à produção de flores, mesmo havendo variações no período chuvoso (Figura 4A). Quanto à frutificação, a média demonstrou aumento em relação ao Ano 1, indicando melhora dos **eventos de polinização abióticos e bióticos**. Quanto à comunidade arbórea, os padrões fenológicos sempre destoaram dos Compartimentos B' e C, provavelmente em consequência das diferenças de riqueza encontradas neste setor. Temporalmente, esta comunidade demonstrou melhora na fenologia reprodutiva das espécies. Um panorama geral do monitoramento indica tendência de melhora nos valores obtidos para a comunidade arbustiva e arbórea do Compartimento B', no entanto, os dados atuais continuam demonstrando prolongamento da taxa de floração da comunidade herbácea a partir de Seco Ano 3, destoando do padrão encontrado preliminarmente no início do monitoramento. Como resultado, frutos anemocóricos, dispersos durante o período de menores valores de cobertura vegetal, tendem a ficar retidos próximo da planta mãe durante o período chuvoso, diminuindo a taxa de dispersão das espécies. Apesar disso, as médias de frutificação no período seco aumentaram (Figura 4D), cujo cenário principal aponta para alteração do padrão fenológico subanual para o contínuo. No caso da comunidade arbórea, apesar dos dados atuais apontarem para a tendência de aumento da frutificação no período seco, a contribuição sobre a média pode ser explicada devido à floração de espécies arbóreas supra-anuais que contribuem para as flutuações dentro desta comunidade. No que diz respeito à fenologia da comunidade herbácea do Compartimento C, a análise temporal indicou aumento das médias em ambos os períodos, com destaque para E1 que alcançou taxas de floração muito superiores a partir do período Chuvoso Ano 3. No geral, a menor capacidade reprodutiva da vegetação no Ano 1 foi substituída pelo aumento da produção de flores e frutos, indicando alteração no padrão fenológico de subanual para contínuo. É importante destacar que as espécies que ocorrem sobre dunas têm preferência pela germinação de seus propágulos no período seco, uma estratégia utilizada como forma de escapar das condições de maior temperatura e evapotranspiração do período chuvoso. Assim, destaca-se que o aumento da taxa de dispersão de frutos no período seco representa melhora em relação aos valores obtidos durante o Ano 1. No entanto, a floração acentuada obtida em E1 indica que tensores ainda pouco compreendidos podem estar alterando a **sincronia floral** deste setor, principalmente em função deste resultado ser recorrente. Essa característica destoante de E1 também foi registrada a partir do período Chuvoso Ano 3 na comunidade arbustiva, no entanto, conforme discutido anteriormente, a ocorrência de impactos de origem antrópica, além de causar alterações estruturais, também cria condições nas quais as plantas aumentam a taxa de floração e consequente frutificação (Figura 4C e D). Isso foi acompanhado também pela E4 ao longo do monitoramento, cujos tensores são semelhantes. No entanto, áreas com características ainda preservadas contidas neste Compartimento demonstraram aumento da taxa de floração, outrora restrita apenas às espécies

anemocóricas. Em ambos os níveis de preservação, as taxas de floração aumentaram principalmente a partir do Ano 3. O cenário envolvendo impactos antrópicos também interferiu nos dados fenológicos da comunidade arbórea. Esse resultado foi mais evidente em E4, onde o corte seletivo de madeira interferiu tanto no recrutamento quanto no ingresso de espécies. Porém, em áreas onde esta comunidade encontra-se preservada (E3), a fenologia sofreu influência de espécies supra-anuais, com picos periódicos que indicam melhora nas condições em relação ao Ano 1.

Em relação aos dados fenológicos obtidos para o Período Chuvoso Ano 6, todos os Compartimentos apresentaram intensidade floral reduzida nas três comunidades. A intensidade de frutificação oscilou entre algumas estações, não sendo possível definir padrões em nenhum Compartimento. Assim, a fenologia reprodutiva apresentou resultados incoerentes com as tendências capturadas nos anos anteriores, em virtude de o esforço amostral ter sido incompleto, e não representam o padrão temporal para o período.

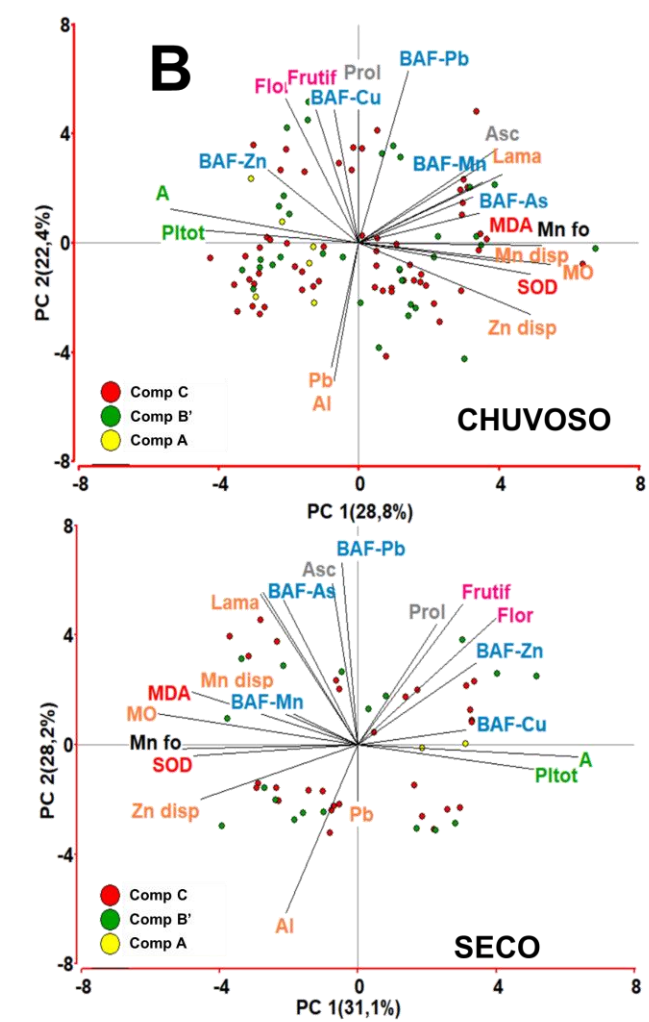
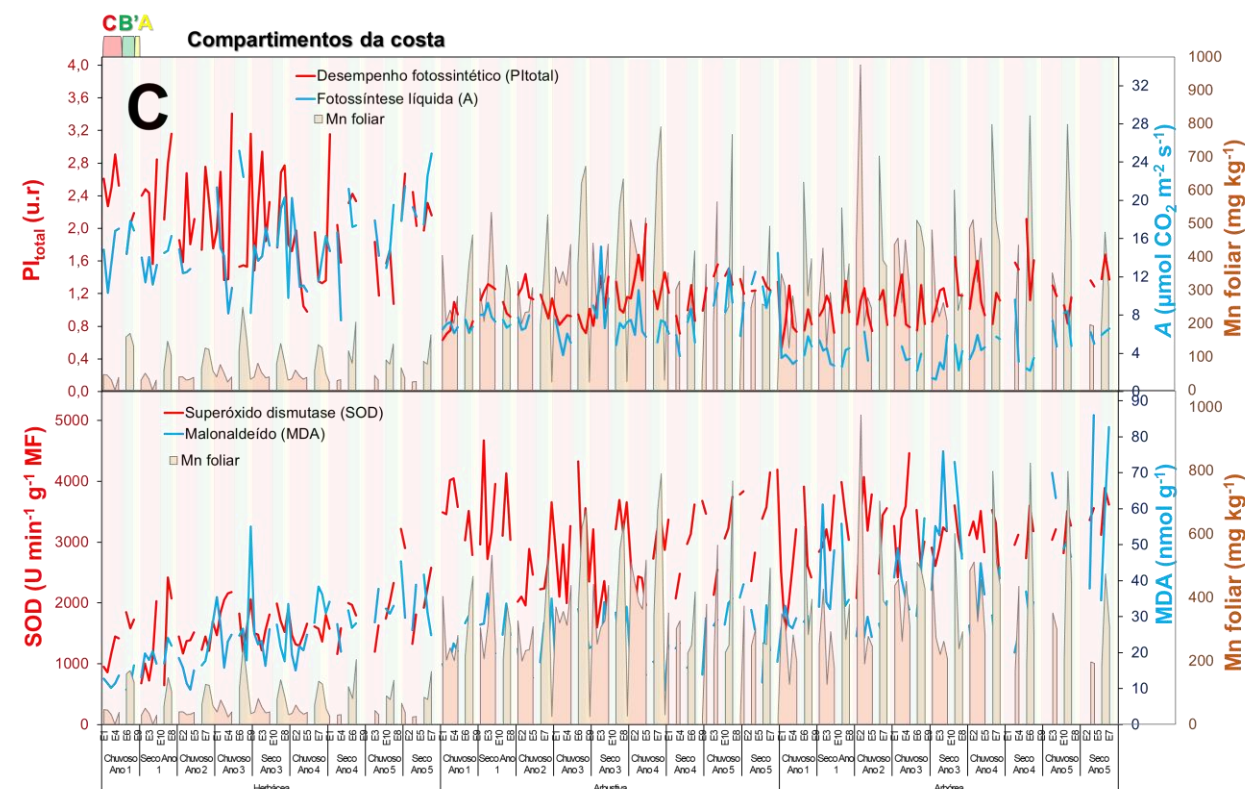
Figura 5: Alerta de Perigo Biológico para plantas herbáceas, arbustivas e arbóreas das restingas monitoradas pelo PMBA/Fest nos períodos Chuvoso Ano 1 (2018) a Seco Ano 5 (2023) (A). Análise de Componentes Principais (PCA) entre variáveis abióticas e biológicas de resposta da vitalidade (B): Floração (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 à concentração de manganês (C).



RESTINGA VITALIDADE DA VEGETAÇÃO

■ Não perigo
■ Perigo

Formações vegetais:



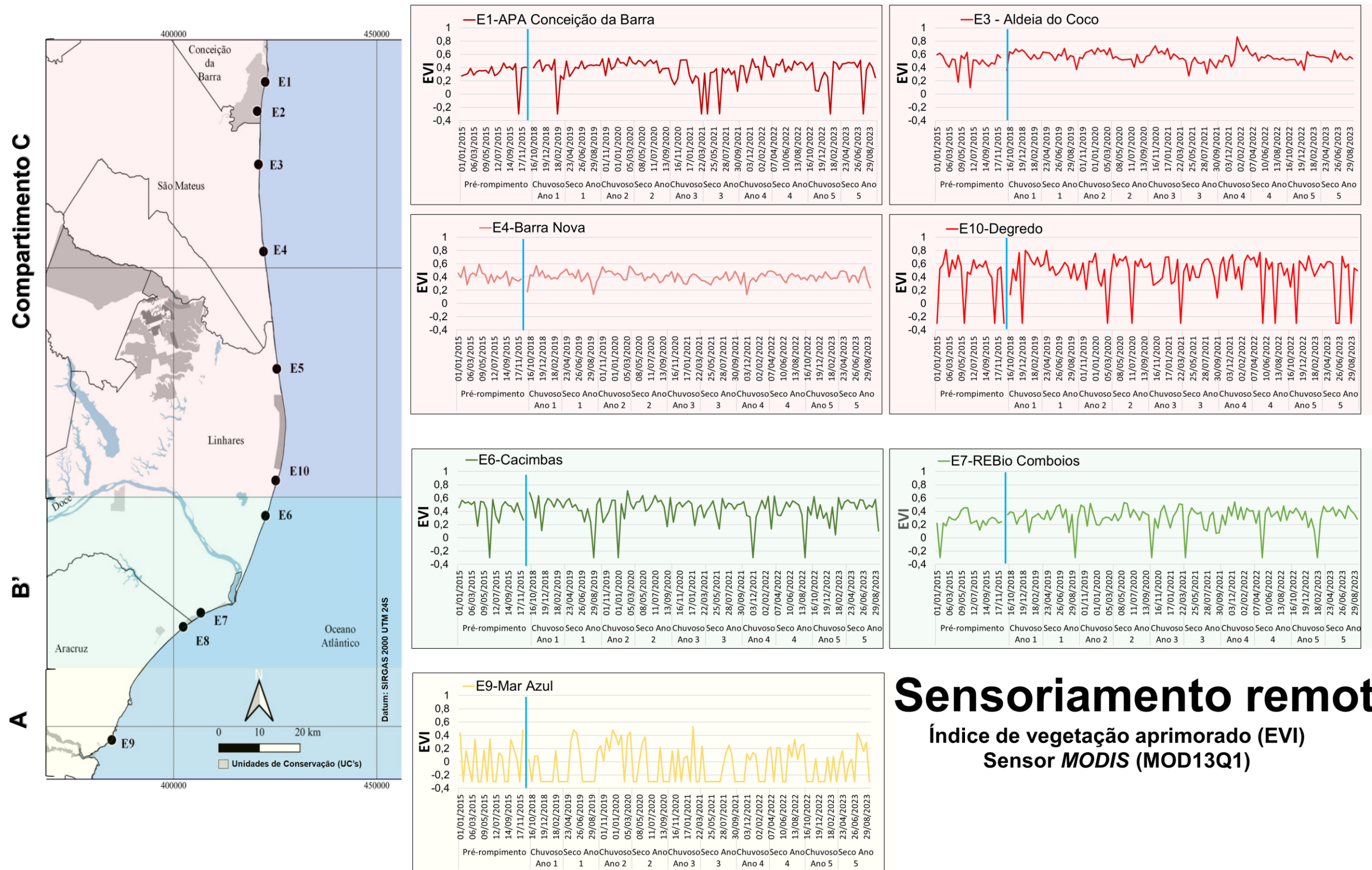
O mapeamento da **Vitalidade da vegetação da Restinga**, por meio da análise integrada do **Alerta de Perigo Biológico**, mostra sazonalidade ao longo do monitoramento (Figura 5A), integrando quatro categorias biológicas de resposta: Produtividade primária, Metabolismo primário, Estresse oxidativo e Reprodução, para identificar as potenciais respostas espaço-temporais aos elementos químicos. A análise global das respostas da biota apontam para maiores impactos nos compartimentos B' e C, com respostas agudas para a área próxima à Foz, em virtude da variação dos eventos abióticos, e de maneira crônica na porção norte e extremo norte da área monitorada, expressivamente, entre a APA Conceição da Barra (E1) e Aldeia dos Cocos (E3) e também em Cacimbas (E6) e na REBio Comboios (E7). A restinga de Cacimbas apresenta características transicionais entre os compartimentos da região costeira, conforme corroborado pela avaliação florística da área, e vem apontando resultados desfavoráveis à vitalidade da sua vegetação. A análise do perfil funcional, estrutural e reprodutivo da vegetação mostra persistência de impactos frente à contaminação no Compartimento B'. Ao longo do monitoramento, a menor Vitalidade de espécies arbustivas e arbóreas, tanto ao norte quanto ao sul da desembocadura, sugere maior sensibilidade destas comunidades que, mesmo afastadas da linha da costa, são impactadas quanto aos seus aspectos funcionais e reprodutivos pela combinação de fatores edafoclimáticos e o aporte a região costeira. Por outro lado, a vegetação herbácea se mostra mais suscetível ao predominante efeito da dinâmica marinha e ação de ventos na contribuição de elementos minerais via aerossol, devido a sua proximidade à linha da costa. Nestas plantas, estratégias como morfologia caulinar, crescimento rápido e resposta fenológica flexível acarretam em maior eficiência frente à contaminação, visto seu crescimento em regiões com alto grau de exposição às ondas. A PCA (Figura 5B) indicou que acúmulos de Mn, As, Pb, Cu, Al V e Zn impactaram negativamente as formações vegetais com influência persistente sobre as categorias biológicas. O depósito de metal(oide)s, carregados pelo aerossol marinho sobre a flora da Restinga, foi associado significativamente ao acúmulo de Mn, As e Cr nos tecidos foliares. Assim como para os níveis de contaminação, os Anos 1 e 3 persistem como os mais críticos à Vitalidade da vegetação, corroborando o maior impacto dos fatores abióticos à biota. A **Produtividade primária** das comunidades indica forte associação de acúmulos de Mn com a redução de PI_{tot} ($r=-0,67$) e A ($r=-0,61$); ($p<0,001$) da vegetação. Tais associações também puderam ser observadas em relação ao aumento na concentração de Zn no sedimento e bioacúmulo de Mn. Igualmente, o **Estresse oxidativo** da vegetação relaciona-se com as variações foliares e bioacúmulos de Mn ($r>0,64$; $p<0,01$). O **manganês** continua acima da referência em todas as estações amostrais, incluindo Degredo (E10), e o excesso reflete diretamente no impacto às categorias biológicas analisadas, como a Produtividade Primária e o Estresse oxidativo (Figura 5C), cujo aumento pode ser uma estratégia de atenuação de possíveis impactos resultantes da bioacumulação nas plantas. Dentre os metais(lóides) associados ao rejeito, o acúmulo de Mn, Pb, Zn e Cu relacionou-se ao aumento na produção dos **Metabólitos primários** Prol e Asc, principalmente nos períodos chuvosos, especificamente para a concentração de prolina. As tendências da **Reprodução** das comunidades mostram sazonalidade que se associou significativamente aos acúmulos de Mn, Zn, Al, Cu e Pb. Vale ressaltar que Mn, As e V também apresentaram impacto sob aspectos genotóxicos na vegetação, acarretando em aumentos em danos ao DNA em plantas herbáceas no Ano 5. Embora a adição do período Seco do Ano 5 corrobore a tendência delimitada a

partir do período Chuvoso do Ano 3, caracterizada pelo aumento da vitalidade ao longo das suas três formações vegetais, os dados atuais indicam alta variação de respostas das categorias biológicas componentes da Vitalidade da vegetação. Este resultado confirma os efeitos das oscilações de distribuição de elementos minerais sobre a vegetação e sedimento no padrão espacial de níveis integrados de resposta à vegetação.

Para o Ano 6, a resposta da Vitalidade da vegetação da Restinga indica reduções da produtividade primária no Compartimento C para as três formações vegetais. Para aspectos reprodutivos, diminuições na frequência foram observadas para floração e frutificação em todos os compartimentos monitorados. Entretanto, vale destacar que estes resultados não representam o padrão temporal do período, pois apenas as categorias de Produtividade primária e Reprodução foram avaliadas, visto a periodicidade de coletas, as quais também apresentam apenas dados parciais do período.

Em suma, temporalmente, ainda não há tendência de estabilidade nas condições e respostas da vegetação da Restinga, apesar da tendência de melhora do Ano 1 para o Ano 5. Contudo, os resultados confirmam o papel do **As, Mn, Zn e Pb como os de maior recorrência de impacto à Vitalidade das restingas**, impactando as categorias biológicas e confirmando crítica vitalidade das restingas para os períodos chuvosos.

Figura 6: Análise do vigor da vegetação das restingas monitoradas pelo PMBA/Fest 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 2023. 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)

Na Figura 6, da série temporal do **Índice de vegetação aprimorado (EVI)** nas estações amostrais monitoradas pelo PMBA/Fest, observa-se nos valores médios variação sazonal ao longo do período analisado, denotando a dinâmica da vegetação e corroborando resultados diretamente associados à sua **Vitalidade**. Pelos resultados, o EVI mantém um padrão temporal, geralmente com valores decrescentes no verão (período chuvoso). O comportamento dinâmico observado reflete a resposta fenológica do dossel da vegetação analisada dentro dos polígonos amostrais definidos em cada estação. Essa resposta varia no tempo em razão do espectro de reflexão da cobertura vegetal incidente nos sensores remotos, e quanto mais próximo de 1, maior o vigor da vegetação monitorada.

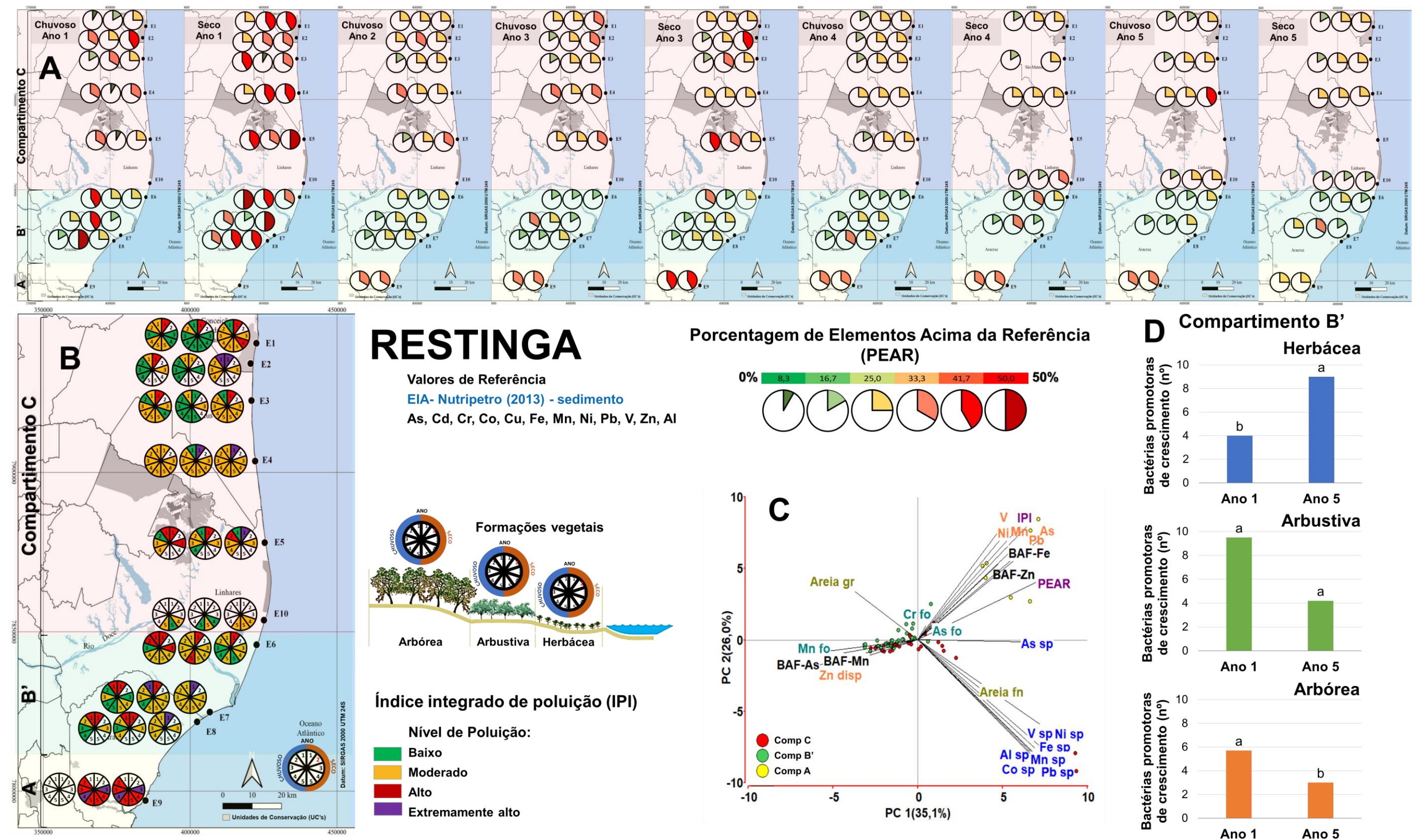
Especialmente, as estações do compartimento C apresentam plantas mais vigorosas e com menores amplitudes de valor em relação às demais estações, dos compartimentos B' e A. Ressalta-se neste compartimento, os resultados para Aldeia do Coco (E3) e Degredo (E10), nas quais os valores máximos estiveram próximos ou muito próximos de 0,8, indicativo de elevado vigor da vegetação. Em contrapartida, a estação Mar Azul (E9) foi a que apresentou resultados do EVI atingindo valores mínimos, em torno de -0,3, em muitos pontos de captura de dados, semelhante ao que já era observado para o período pré-rompimento, não sendo, dessa forma, um indicativo direto da influência do rejeito sobre o perfil de resposta da vegetação.

A análise estatística apontou uma relação significativa entre os valores de EVI e Floração ($r=-0,74$; $p<0,01$) e Frutificação ($r=-0,74$; $p<0,01$) da vegetação, o que possibilita o rastreamento dos ciclos fenológicos e identificação de padrões sazonais e, em uma abordagem secundária, identificar distúrbios desse padrão, como a ocorrência de eventos estressores. Durante os períodos chuvosos, foram registrados os menores valores para o EVI, conforme observado em Degredo (E10), Cacimbas (E6) e REBio Comboios (E7), cuja amplitude do índice é reduzida durante todo o monitoramento. Esse padrão de redução coincide com a proximidade da Foz do Rio Doce e pode estar relacionado à influência de fatores abióticos ou condições naturais decorrentes das fenofases da vegetação, como o desenvolvimento natural, descoloração e senescência das folhas e floração, podendo resultar em um comportamento sazonal da resposta espectral da vegetação (LEIVAS et al., 2022). Segundo Huete et al. (2002), o EVI é mais responsivo às variações estruturais, incluindo o índice de área foliar (IAF), tipo e arquitetura de dossel e fisionomia da planta. A identificação remota da fenologia em ciclos ou padrões sazonais em séries temporais de dados permite a observação direta dos ciclos fenológicos e, indiretamente, de anomalias e efeitos de mudanças climáticas ou ambientais nesses ciclos.

Na análise temporal das estações, embora não se tenha visualizado um padrão que denote mudanças para resultados obtidos desde 2018 até o presente momento, cabe ressaltar a captura de valores mínimos do EVI, muito próximos ou inferiores a zero, referentes à superfície de solo exposto, com baixa cobertura ou verdor vegetal, ou ainda de intensa atividade reprodutiva da vegetação, o que corrobora o que já tem sido reportado para o Ano 3 na APA Conceição da Barra (E1), marcada por taxas de floração muito superiores, com aumento da produção de flores e frutos, indicando **alteração no padrão fenológico** de subanual para contínuo. Mudanças sazonais na disponibilidade dos recursos naturais,

atuam de forma potencializadora ou limitante no crescimento da vegetação, alterando a taxa de acumulação de biomassa e a taxa de senescência (LEE et al., 2002).

Figura 7: 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 5 (2023) no âmbito do PMBA/Fest. 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).



Dentre as variações abióticas que influenciam diretamente a resposta do indicador **Vitalidade da vegetação** da Restinga, o monitoramento no âmbito do PMBA/Fest continua a destacar, para o Ano 5, elementos minerais em excesso no sedimento, como As, Co e Mn, assim como Zn e Ni, quando analisada a Porcentagem de Elementos Acima da Referência (PEAR) (Figura 7A), com incrementos em estações próximas à Foz, em Cacimbas (E6) e na REBIO Comboios (E7), confirmando uma condição de persistência desde o Ano 1 do monitoramento. Especialmente, o Índice Integrado de Poluição (IPI) (Figura 7B) evidenciou tendência global de diminuição da poluição a partir do Ano 4, apontando tendência de melhora para estações do Compartimento B'. Vale o destaque para redução no Índice para herbáceas e arbustivas de Cacimbas (E6).

No Compartimento A, após o aumento para níveis extremamente altos do período Seco do Ano 3, a poluição dos sedimentos retorna a índices altos no Ano 5, caracterizando este compartimento como de persistente poluição. Temporalmente, as maiores contribuições para o aumento de IPI nos períodos chuvosos estiveram relacionadas à Mn ($r=0,99$), Pb ($r=0,80$), Ni ($r=0,87$), As ($r=0,95$) e V ($r=0,88$) e Co ($r=0,66$); ($p < 0,01$). Entretanto, os maiores níveis de poluição do sedimento foram encontrados em períodos secos, em geral associados a eventos de alta morfodinâmica marinha (Ano 1 e Ano 3). Os níveis de poluição dos períodos secos apresentaram maiores contribuições dos elementos As ($r=0,92$), Mn ($r=0,95$), V ($r=0,92$), Ni ($r=0,94$) e Pb ($r=0,83$); ($p < 0,001$).

O período Seco Ano 5 apresentou sinais de melhora da poluição comparado ao Ano 3, como observado em Cacimbas (E6) e Mar Azul (E9), cujos níveis de poluição reduziram de moderado a baixo nas herbáceas de E6 e de extremamente alto para alto em Mar Azul (E9). O depósito sobre a flora da Restinga de elementos associados ao rejeito de mineração, como Mn, As e Cr, corrobora o padrão de elementos químicos observados em períodos anteriores. Com a adição do período Seco do Ano 5 ao monitoramento, caracterizou-se um aumento da abundância de elementos sobre as três formações vegetais, mas principalmente sobre a vegetação arbustiva entre Degredo (E10) e REBio Comboios (E7), mais expostas à combinação do aporte constante de elementos minerais provenientes do Rio Doce, da maior energia de ondas e velocidade de ventos, característica desse período, além de outros fatores característicos da morfodinâmica dessas praias. A elevada concentração de elementos minerais sobre a vegetação herbácea, que foi observada no período chuvoso para algumas estações como a APA Conceição da Barra (E1), Compartimento C, não teve destaque no período seco atual.

Para o sedimento, a análise global da contribuição do material depositado sobre a vegetação evidencia a influência do aporte de elementos minerais no aumento das concentrações no sedimento para As, Cr, Co, Mn, V, Ni e Pb nos períodos secos e especificamente de Co para o período Seco do Ano 5 (Figura 7C), favorecendo o aumento da porcentagem total no ambiente (PEAR). Este resultado apontou maior influência dos aumentos nas concentrações de elementos que chegam à costa via aerossol marinho sobre os níveis de poluição. Tem sido recorrente o resultado que indica maiores depósitos de elementos do aerossol na vegetação localizada ao norte para as formações herbácea e arbustiva, potencialmente decorrente das particularidades da distribuição da vegetação, da energia de ondas, e, em especial, da direção e velocidade do vento dos períodos secos. Para a vegetação, as contribuições significativas do aerossol marinho foram associadas a acúmulos de As e Fe nos tecidos foliares. O

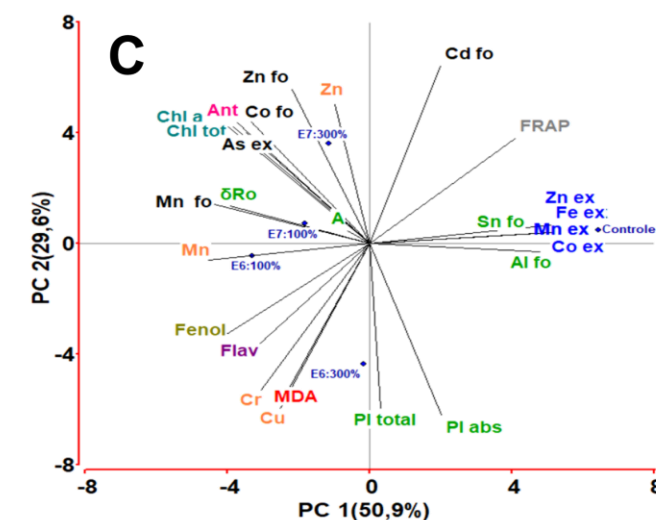
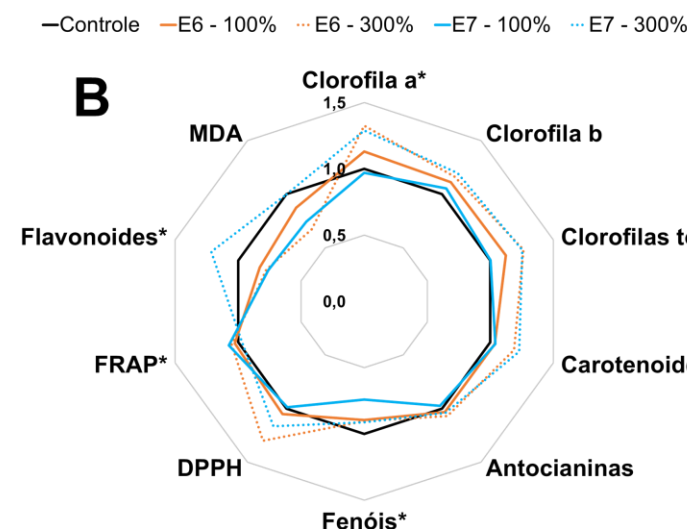
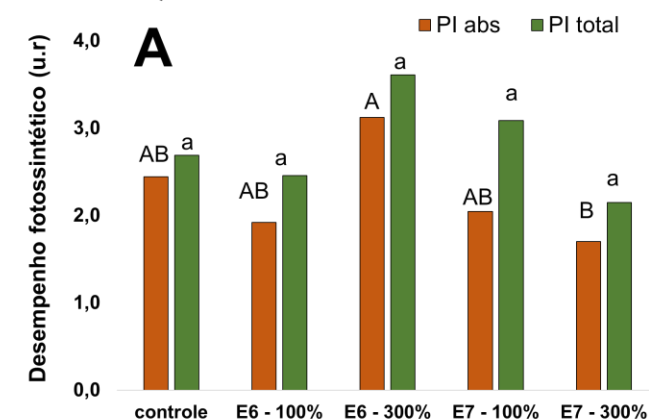
Fator de Bioacumulação (BAF) de As, Mn, Cu, Pb e Zn, e teores de matéria orgânica (MO) e lama do sedimento apresentaram direta relação com a vitalidade da vegetação da restinga. Maiores teores de MO e de grãos finos podem favorecer a retenção dos elementos minerais próximos à rizosfera e o aumento da efetividade de acumulação dos mesmos no tecido vegetal, como em espécies arbustivas e arbóreas no Compartimento C. Por outro lado, os maiores acúmulos de elementos minerais nas herbáceas entre Degredo e REBio Comboios podem estar associados à influência do aporte contínuo de elementos na região da Foz, tornando-as mais suscetíveis e favorecendo a deposição sobre a vegetação, caracterizada por plantas de crescimento e ciclo de vida rápido, respondendo a fatores como a direção e velocidade dos ventos, a qualidade da água no período e o alto grau de exposição às ondas, típico do perfil praias dessa região.

Associado à granulometria das praias e consequente retenção de elementos minerais próximos à rizosfera, os estudos atuais buscaram identificar o potencial uso de microrganismos promotores de crescimento vegetal nas áreas costeiras, destacando seu potencial de colonização. Especificamente para a formação herbácea, na qual as plantas crescem em solo com baixa concentração de matéria orgânica e argila, foi analisada a capacidade da microbiota associada ao sistema radicular das espécies, que demonstrou importante papel na promoção do crescimento. As herbáceas demonstraram ainda maior capacidade de solubilização de fosfatos e de produção de quitinases, em comparação às plantas arbustivas e arbóreas.

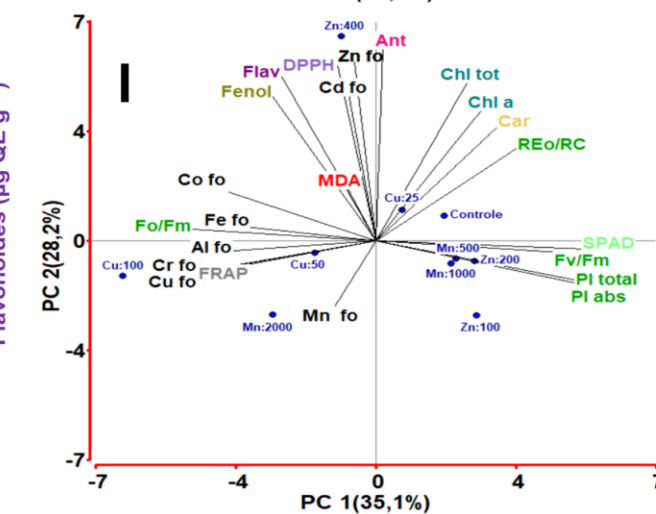
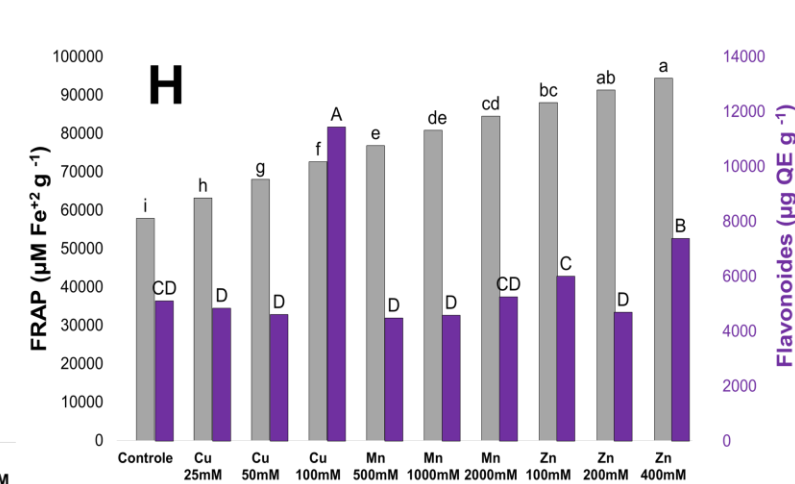
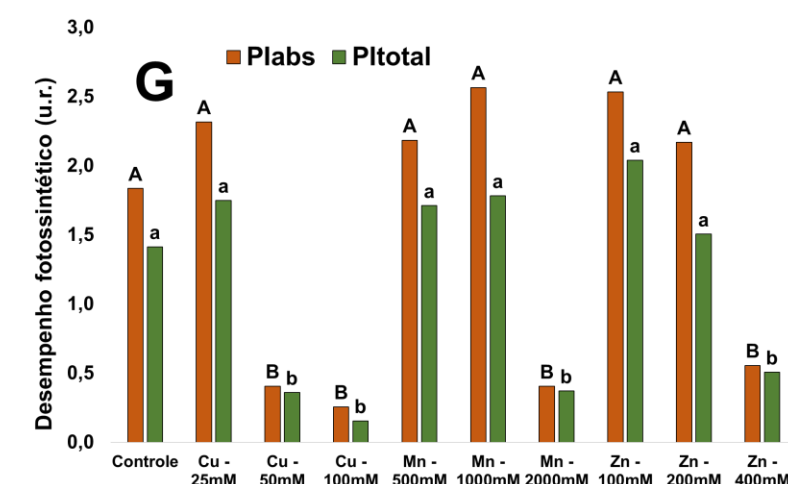
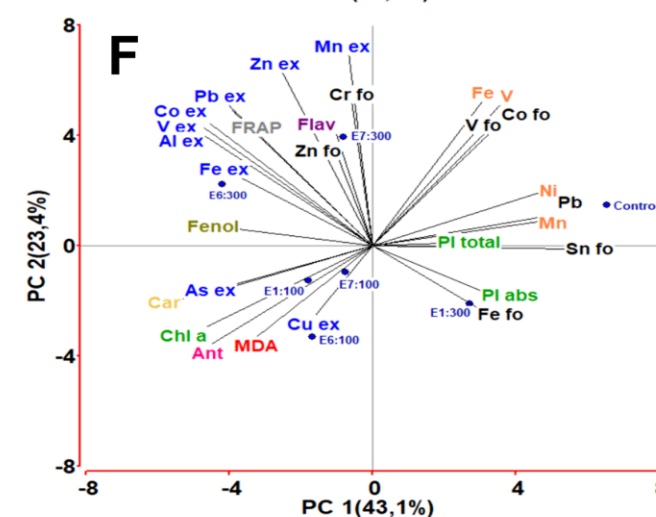
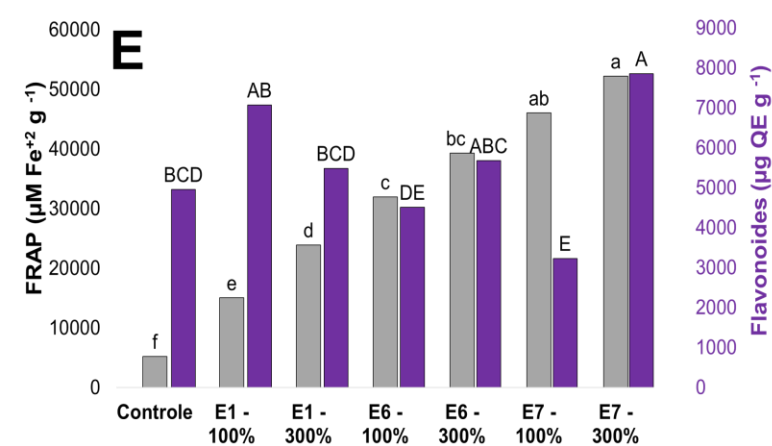
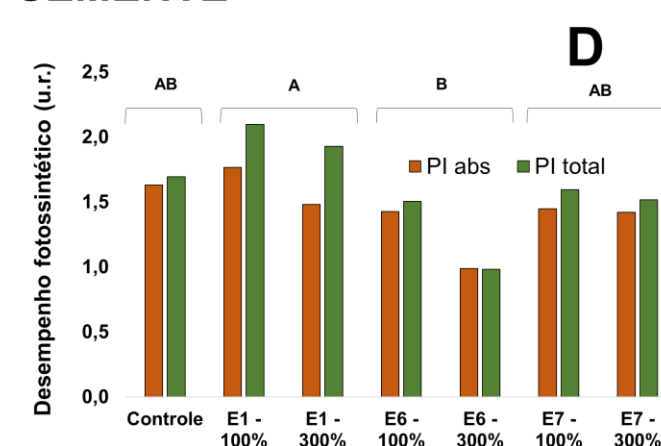
Ensaio relacionados à microbiota do solo (Figura 7D) mostraram, para a formação herbácea do compartimento B', que o número de bactérias promotoras do crescimento de plantas presentes no solo destas restingas foi maior no Ano 5 em relação ao Ano 1, ao contrário do que foi observado para a formação arbórea e arbustiva. Esses resultados indicam uma tendência de adaptação da população bacteriana proveniente das áreas atingidas pelos rejeitos e apontam para um perfil de resposta aguda da comunidade bacteriana presente na formação herbácea, frente à alta concentração de elementos minerais encontrada no início do monitoramento. Aumentos dos depósitos de V e Al nas restingas associados ao aerossol marinho apresentaram relação positiva ao número de bactérias nos solos das restingas ($r = 0,69$ e $0,62$; $p < 0,05$). Por outro lado, aumentos na concentração de elementos no solo (Mn, Ni, Pb e V) apresentaram relação negativa ($r = -0,81$; $-0,66$; $-0,53$ e $-0,73$; $p < 0,01$, respectivamente) e indicam o efeito deletério da poluição sobre a microbiota do solo das restingas (SID solo x IPI, $r = -0,78$; $p < 0,05$).

Figura 8: Padrões de respostas de plantas de restingas e plantas modelos à contaminação por elementos químicos. Plantas herbáceas de restinga obtidas por propagação vegetativa (estaquia) (A-C) e propagação por sementes (D-I) submetidas a diferentes concentrações de extratos solubilizados de sedimentos coletados nas restingas monitoradas no âmbito do PMBA/Fest. Plantas obtidas por propagação por sementes submetidas a tratamentos de dose-resposta de diferentes concentrações de cobre (Cu), manganês (Mn) e zinco (Zn) (G-I). Índices de desempenho fotossintético: eficiência de oxido-redução do fotossistema II (PI_{abs}) e desempenho total da cadeia de transporte de elétrons (PI_{total}) (A, D e G). Pigmentos fotossintéticos e Sistema oxidante (B, E e H): 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 (C, F e I). Plantas modelos expostas ao extrato solubilizado dos sedimentos das restingas: Germinação (%) (J) em *Lactuca sativa*; Índice mitótico (IM%) (K), alterações cromossômicas (AC%) e micronúcleos (MN%) (L) em células meristemáticas de *Allium cepa*. CN: Controle negativo. CP: controle positivo. Médias seguidas com (**) diferem estatisticamente do controle negativo.

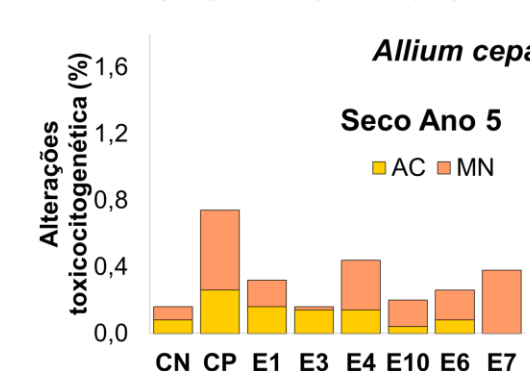
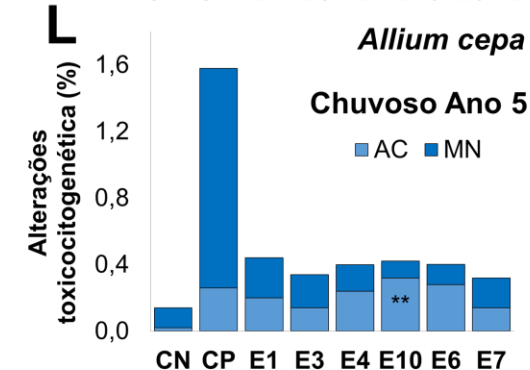
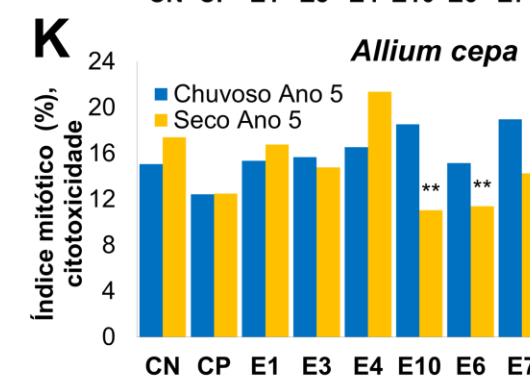
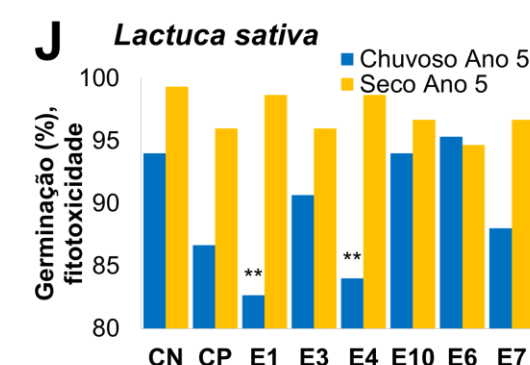
ESTAQUIA



SEMENTE



MODELOS



Os **ensaios em cultivo protegido e bioensaios com espécies modelo** buscam rastrear o efeito da presença de elementos minerais na fisiologia e crescimento das plantas da restinga, e permitiram distinguir padrões da dinâmica de distribuição de elementos minerais ao longo da costa, bem como associá-los às respostas biológicas de plantas de restingas avaliadas no monitoramento *in situ*. Sementes de espécies herbáceas, coletadas nas estações amostrais no período Seco do Ano 5, foram avaliadas quanto ao seu padrão germinativo e os resultados indicaram, por meio da porcentagem de germinação, do índice de velocidade de germinação e da emergência das plântulas, que sementes provenientes de Aldeia do Coco (E3) e Cacimbas (E6) possuem maior potencial de germinação que sementes coletadas na APA Conceição da Barra (E1), REBio Comboios (E7) e Degredo (E10). A partir destes dados, plantas jovens foram obtidas por propagação por semente e submetidas a ensaios, com diferentes concentrações de extrato solubilizado de sedimentos coletados nas restingas monitoradas, que revelaram mudanças significativas nos aspectos funcionais das plantas. Entre as variáveis que compõem a **Vitalidade da vegetação**, a produtividade primária foi afetada, sendo o desempenho fotossintético total (PI_{total}) significativamente menor nas 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 8D). Somado a isso, o aumento das concentrações de Mn, Zn, Pb, Co, V e Al em extratos de sedimentos coletados na REBio Comboios contribuíram para aumentos nos acúmulos foliares de Cr, Co, C e Zn, e na maior produção de compostos fenólicos e flavonoides em plantas (Figura 8F). 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 8E). Vale destacar que, para o período Seco do Ano 5, a concentração de Cu, Mn, Zn nesses extratos foi significativamente maior que aquela obtida nos sedimentos das estações amostrais do monitoramento *in situ*. O extrato solubilizado também foi testado em plantas herbáceas e arbustivas propagadas por propagação vegetativa (estaquia) (Figura 8A-C). Para as herbáceas, o Sistema oxidativo, como compostos fenólicos, flavonoides, atividade oxidante (FRAP) (Figura 8B) e peroxidação lipídica, também respondeu à variação da origem do sedimento, indicando que foi capaz de promover danos às membranas celulares. A partir desse resultado, foi possível observar a interação dos fatores origem do sedimento e concentração do extrato solubilizado. Nessas plantas, PI_{total} pouco diferiu entre estações de origem e concentrações (Figura 8A), embora o índice de eficiência de oxido-redução do fotossistema II (PI_{abs}) tenha sido menor com o extrato de REBio Comboios na concentração de 300%. Variáveis representativas de estresse oxidativo também responderam a presença de Cr e Cu no extrato (Figura 8C). A atividade antioxidante mostrou correlação com o Al e Cd foliar, e Cr e Co do extrato. Ensaios em espécies vegetais modelos submetidas ao extrato solubilizado apontaram redução na germinação de sementes de *Lactuca sativa* (8J), indicando o potencial fitotóxico de sedimentos de restingas do Compartimento C. Por outro lado, variações significativas de índices mitóticos (Figura 8K) e alterações cromossômicas (Figura 8L) foram encontradas em *Allium cepa*, em relação ao controle, associadas à composição dos sedimentos das restingas de Cacimbas (E6) e Degredo (E10). 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.

Além desses ensaios, o efeito de concentrações crescentes de Zn, Cu e Mn sobre o desenvolvimento das mudas de espécies de restinga também foi avaliado, com o intuito de investigar o efeito da dose-resposta de metais que mostraram recorrência de impactos sobre a flora da restinga. Tais 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 8G). Além disso, maiores concentrações de Cu (100 µM) e Zn (400 µM) acarretaram em aumentos significativos de antocianinas, flavonoides e atividade antioxidante (FRAP e DPPH) (Figura 8H), envolvidos na proteção do sistema metabólico, atuando contra as espécies reativas de oxigênio (ROS). Praticamente todas as doses aplicadas induziram o aumento do composto malondialdeído (MDA). Tais modificações estiveram associadas a aumentos de acúmulos foliares de Zn, Cu, Fe, Cd e Cr nas plantas herbáceas de restinga (Figura 8I).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS 5 ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO

Dentro da análise espaço-temporal do indicador da restinga, a Vitalidade da vegetação, tanto as categorias biológicas quanto os fatores abióticos avaliados mostraram resposta sinérgica e variável, principalmente em razão da extensa variabilidade de espécies e da complexidade e sazonalidade do ecossistema. A maior recorrência de impactos biológicos à vegetação esteve associada aos períodos chuvosos e revelam a suscetibilidade do ecossistema à sazonalidade das condições ambientais.

Em contrapartida, o período Seco, característico por seus baixos índices pluviométricos, maior energia de ondas e velocidade do vento, favoreceu a maior contaminação da superfície foliar e do sedimento, e biocumulação de elementos no tecido vegetal nas restingas, o que refletiu em respostas desfavoráveis à vegetação, mais intensas na avaliação dos anos iniciais do monitoramento, entre o Ano 1 e o Ano 3.

Com os resultados obtidos, tanto de contaminação quanto da resposta biológica da vegetação, foi possível observar que, em estações próximas à Foz do Rio Doce, como Degredo, Cacimbas e REBio Comboios, a norte e a sul da desembocadura, o padrão de resposta agudo é mais marcante e denota uma maior dependência da dinâmica do rio, em relação à sua contribuição à composição da coluna d'água. Esses fatores, somados à morfodinâmica das praias, às condições climáticas e à variação suscetibilidade/sensibilidade da vegetação, marcam a pluralidade de respostas nesta região. Resultados relacionados a isto foram aqueles observados principalmente em Cacimbas, área na qual há uma recorrência de condições desfavoráveis detectadas pelos resultados obtidos nesses 5 anos de monitoramento. Os maiores impactos observados no compartimento B' também foram observados no compartimento C, com respostas crônicas e instáveis, decorrentes da grande variabilidade encontrada entre as estações amostrais monitoradas.

Para a estação amostral mais a sul do monitoramento, a composição natural do sedimento de Mar Azul, no Compartimento A, muito distinta das demais restingas, revelou padrões peculiares e que sugeriram a forte influência da Formação Barreiras no padrão de respostas, assim contribuindo para os elevados níveis de poluição ao longo do período monitorado, embora tenha sido evidente a melhora das condições ambientais no último ano de monitoramento.

Em termos de contaminação, a análise da concentração de elementos minerais no sedimento e na vegetação mostraram, por meio do Índice Integrado de Poluição (IPI) e da Porcentagem de Elementos Acima da Referência (PEAR) nos sedimentos, que mesmo com as variações típicas dependentes da sazonalidade ambiental, os resultados do Ano 1 a 3 foram os mais desfavoráveis para o ecossistema, com altos níveis de poluição, com melhora nos anos seguintes. O percentual de bactérias promotoras do crescimento de plantas presentes no sedimento das restingas foi maior no Ano 5 em relação ao Ano 1, em plantas herbáceas. Esses resultados indicam uma tendência de adaptação da população de bactérias proveniente das áreas atingidas pelos rejeitos e apontam para um perfil de resposta aguda da comunidade bacteriana presente nesta formação, frente à alta concentração de elementos minerais encontrada no início do monitoramento.

O indicador Vitalidade da vegetação da restinga, por meio da análise do Alerta de Perigo Biológico, mostra sazonalidade ao longo do monitoramento e é resultante da análise integrada de quatro categorias biológicas de resposta: Produtividade primária, Metabolismo primário, Estresse oxidativo e Reprodução, sendo ainda dependente da adição de metal(oides) via aerossol marinho, principal fonte de minerais para a vegetação costeira. Em termos desta análise, a formação herbácea apresentou maior suscetibilidade. Nestas plantas, o alto grau de exposição às ondas e ventos, crescimento rápido e resposta fenológica flexível resultaram em maior captura de elementos minerais.

Já para espécies arbustivas e arbóreas, a menor Vitalidade observada ao longo dos 5 anos sugeriu serem mais sensíveis, pois embora estejam mais afastadas da linha da costa, e menos suscetíveis ao aerossol marinho, podem ser afetadas funcional e reprodutivamente pela combinação de fatores edafoclimáticos e do aporte de contaminantes. Características como a granulometria do sedimento ou a maior complexidade estrutural da vegetação (textura do dossel) podem ser fatores responsáveis pelo aumento da retenção e absorção dos contaminantes que chegam via aerossol.

Bioensaios sob condições controladas, com o uso de extratos solubilizados de sedimentos coletados nas restingas monitoradas e do efeito da dose-resposta de metais, mostraram alterações significativas na resposta biológica em plantas de restingas 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 em 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. Ensaios em espécies vegetais modelos apontaram alterações significativas do efeito toxicogenético, em relação ao controle, associadas a extratos de sedimentos das restingas 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.

Como esperado, a riqueza encontrada em cada Compartimento sofreu poucas alterações. Provavelmente, a plasticidade adaptativa das plantas de Restinga sob diferentes tipos estruturais representa uma estratégia de manutenção de cada espécie ao longo do gradiente avaliado. No entanto, sob perspectivas estruturais, a comunidade herbácea demonstrou diferenças concentradas nos Compartimentos B' e C. Essas diferenças estão associadas aos aspectos de abrasão da linha da costa, relacionados com o assentamento do rejeito no leito do oceano, que provocou maior propagação de energia das ondas sobre as dunas. Como resultado, houve perda de cobertura vegetal e consequente comprometimento de espécies ameaçadas de extinção presentes nesta comunidade. A frequência de abrasão das dunas variou ao longo do monitoramento, porém, os valores de importância de espécies ameaçadas continuaram demonstrando declínio recorrente até o final do Ano 5.

Diferenças estruturais também foram encontradas na comunidade arbustiva e arbórea, porém, não correlacionadas com os contaminantes oriundos do rejeito. O cenário de avaliação destas comunidades é desafiador no futuro, em função de tensores antrópicos concentrados no Compartimento C, que poderão comprometer a avaliação estrutural das comunidades. Por isso, é importante destacar que os produtos destinados à educação ambiental produzidos pelo Tema Restinga poderão diminuir o distanciamento das comunidades do entorno e assim, possibilitar a diminuição dos impactos descritos dentro do período estudado.

Sob perspectiva temporal, a comunidade herbácea do Compartimento C apresentou flutuações na sincronia reprodutiva (assincronia) em algumas estações avaliadas, que podem estar associadas aos contaminantes oriundos do aerossol marinho e são corroboradas por meio da análise de imagens espectrais obtidas por sensoriamento remoto. Vários fatores podem comprometer a reprodução de espécies vegetais, mas o monitoramento demonstrou que, mesmo acompanhando as flutuações pluviométricas ao longo dos cinco anos, a comunidade herbácea apresentou picos de floração excedentes ao período esperado, o que comprometeu a maior dispersão dos propágulos dentro do período de menor cobertura vegetal (período seco). Como resultado, sementes dispersas pelo vento ficam retidas próximas da planta mãe, diminuindo a capacidade de colonização de dunas semifixas. Isso está intimamente relacionado ao impacto descrito para a comunidade (perda de cobertura vegetal) podendo acarretar delonga na capacidade de recolonização de áreas afetadas.

Finalmente, dados restritos ao último semestre de avaliação (período Seco Ano 5) indicaram que alguns elementos químicos presentes no pólen do mel de abelha (*Apis mellífera*), produzidos por apicultores 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.

Dessa forma, os resultados dos cinco anos de monitoramento mostram que as restingas associadas à foz do Rio Doce, uma região reconhecida como prioritária para a conservação e que enfrenta déficit de conhecimento de suas espécies regionais, se constituem como setor de maior recorrência de impactos à vegetação, por estarem mais sujeitas ao regime de vazão do rio e assim mais sujeitas ao impacto ambiental em função de eventos de inundação ou outras variações climáticas e morfodinâmicas que impactem tanto a Bacia do Rio Doce como a zona costeira. Somado a isso, o ecossistema Restinga é diretamente dependente da oferta de elementos minerais via aerossol marinho, os quais também são depositados sobre a vegetação e justificam a necessidade do monitoramento de seus componentes abióticos. Para a biota, assim como as avaliações dos tecidos foliares, a avaliação de órgãos reprodutivos e recursos florais reveste-se de importância, visto os potenciais impactos nas cadeias tróficas. Igualmente, outros aspectos do ponto de vista social e econômico podem ser afetados, uma vez que as comunidades de entorno das restingas, muitas das vezes, dependem dos recursos vegetais deste ecossistema para sua subsistência.

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 das restingas. 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.

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 restingas 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 restingas foram cumpridos, e incorporados ao RA2023, 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'alto 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.

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.

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)

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 Zellkernen 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>

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.

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.

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>

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>

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.

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.

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

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.

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>.

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>

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

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>

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>

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.

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>