



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**MICROORGANISMOS EFICIENTES (MES): POTENCIAL DE
BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO, APLICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ELEMENTOS-TRAÇO**

NATÁLIA SANTOS PRETES

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

P942m

Pretes , Natália Santos

Microorganismos eficientes (MES) : potencial de biorremediação do solo, aplicação e identificação de metabólitos secundários e elementos-traço / Natália Santos Pretes . -- Maringá, PR, 2024.

32 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Machinski Junior.

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Crisitna Castro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2024.

1. Microorganismos eficientes. 2. Praguicidas. 3. Agricultura natural. 4. Metabólitos secundários. 5. Elementos-traço. I. Machinski Junior, Miguel , orient. II. Crisitna Castro, Juliana , coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

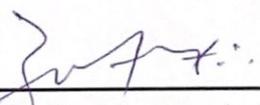
CDD 23.ed. 631.584

Ademir Henrique dos Santos - CRB-9/1065

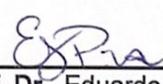
NATALIA SANTOS PRETES

**“MICRORGANISMOS EFICIENTES (MES): POTENCIAL DE
BIORREMEDIAÇÃO DO SOLO, APLICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ELEMENTOS-TRAÇO”.**

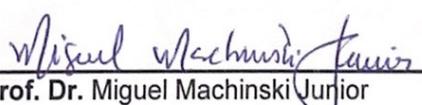
Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.



Prof. Dr. Benício Alves de Abreu Filho



Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau



Prof. Dr. Miguel Machinski Junior
Orientador

Maringá – 2024

Orientador

Prof. Dr. Miguel Machinski Junior

Co-orientadora

Profa. Dra. Juliana Cristina Castro

BIOGRAFIA

Natália Santos Pretes, nasceu em Suzano, no estado de São Paulo. Possui graduação em Biomedicina pelo Centro Universitário de Maringá (UNICESUMAR), especialização em Vigilância Sanitária na Qualidade de Alimentos pela Faculdade Venda Nova (FAVENI). Tem experiência na área de análises clínicas; Na pesquisa atua na área de Análises Toxicológicas, Toxicologia ocupacional, ambiental, clínica e de alimentos; e Microbiologia.

Dedico a

Angela da Rocha Santos Pretes;

Sidnei Carlos Pretes;

Gabriela Santos Pretes;

Vinícius Igor Manzotti;

Vagner da Rocha Santos;

...e todos aqueles que estiveram sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre foi o meu refúgio e fortaleza, sem a vontade d'Ele, nada na minha vida acontece; À Nossa Senhora Aparecida, que através da minha devoção, se fez presente em todos os momentos, me conduzindo ao melhor caminho; aos meus anjos que me amparam e consolam quando não acontece o que eu planejo.

À minha família, minha mãe Angela, meu pai Sidnei e minha irmã Gabriela, que são a minha base, o meu impulso, a minha força e fonte de amor; as minhas conquistas não seriam possíveis sem o meu lar e os vossos ensinamentos.

Ao meu companheiro de vida, Vinícius, que me apoia e acredita em mim, que é o meu melhor amigo e que me ensina a ter equilíbrio e acreditar no meu futuro.

Ao meu avô Vicente e tio Vagner, que sempre acreditaram em todos os meus sonhos e apoiaram cada momento e conquista; a nossa estrela, Tato, que sempre se fez sempre presente na minha vida. A minha avó Angelina, por todos os áudios que me fazem sentir a pessoa mais importante do mundo.

Ao Giovani, a Lucinei, aos filhos e netos, por todo apoio e carinho ao longo de todos os meus estudos.

Aos meus amigos e todos aqueles que de alguma forma me ajudam, me apoiam e torcem sempre para que eu conquiste os meus sonhos e alcance as minhas expectativas; e aos meus amigos de quatro patas, que são a minha distração diária, e me mostram como o lado simples da vida pode ser bonito.

Aos meu orientador Professor Doutor Miguel Machinski Júnior, que aceitou me orientar e esteve sempre disposto a me ajudar e ensinar; a minha co-orientadora Professora Doutora Juliana Cristina Castro, que além de professora é amiga, esteve sempre disponível e pronta para me ensinar com tanta maestria tudo o que eu preciso.

À equipe do IDR-PR de Marialva, produtores e servidores, que me ajudaram nas coletas das amostras, com experiências e financiamento.

Aos companheiros e amigos do Latox, que diariamente me ajudam e me acompanham, nessa troca mútua de conhecimentos e experiências. Ao laboratório de Microbiologia de alimentos e água que foram essenciais durante toda a pesquisa. À todos o meu muito obrigada, eu amo cada um, de forma única e especial.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada no formato de UM artigo científico:

Natália Santos Pretes; Pablo Ricardo Sanches de Oliveira; Ana Laura Castilho; Ailton Rojas Poppi; Eduardo Jorge Pilau; José Eduardo Gonçalves; Benício Alves de Abreu Filho; Juliana Cristina Castro; Miguel Machinski Junior.

Microrganismos Eficientes (MEs): potencial de biorremediação do solo, aplicação e identificação de metabólitos secundários e elementos-traço

Situação: será submetido na revista *Frontiers in Microbiology*

GENERAL ABSTRACT

The increase in agricultural areas has generated the depletion of natural soil resources. Brazil is considered one of the largest agricultural producers in the world. With this there is a concern focused on the development of new technologies aimed at environmental preservation, the reuse of soil waste and the reduction of the use of fertilizing and pesticides. One of the alternative methods in Family Agriculture is the use of Efficient Microorganisms (EM), which are defined as a community of microorganisms naturally found in fertile soil. The aim was to evaluate the EM and soils (with and without ME treatment) for their identification and quantification of secondary compounds from the metabolism of EM isolated by UHPLC-HRMS as well as the identification and quantification of the elements-soil trace. Three samples of EM manufactured in biofactories by local farmers, and the soil of three farms were sampled for the analysis of Al, As, Zn, Cd, Ni and Cu by ICP-OES. The characterization of the EM solution by UHPLC-HRMS showed secondary metabolites of fungi, such as aflatoxin G₂ and patulin. The addition of EM to the soil has contributed to the increase of microbiological diversity, which acts in the decomposition of organic matter and increase the amount of nutrients available for plant growth without the consequences caused by pesticides. However, of the 6 soil samples, with and without treatment of EM, from 3 farms in the region of Marialva-Brazil, did not show statistical differences in the amounts of trace-elements, Al (mean 26.85 mg kg⁻¹); Cu (mean 4.07 mg kg⁻¹), Zn (mean 1.34 mg kg⁻¹), As (mean 0.31 mg kg⁻¹) and Ni (mean 0.23 mg kg⁻¹). Given these results and the increasing use of EM by natural agriculture, we emphasize the need for constant evaluation of these solutions and the impact on the environment. Once in the present study were demonstrated the presence of toxigenic fungi in ME and there was no reduction of trace elements with toxic potential for environmental and human health.

Keywords: Efficient Microorganisms; Pesticides; Natural Agriculture; Secondary metabolites; Trace elements.

RESUMO GERAL

O Brasil é considerado um dos maiores produtores agrícolas do mundo; e o aumento das áreas agrícolas tem gerado o esgotamento dos recursos naturais do solo. Com isso há uma preocupação voltada ao desenvolvimento de novas tecnologias que visem a preservação ambiental, o reaproveitamento de resíduos de praguicidas do solo e a diminuição do uso destes produtos. Um dos métodos alternativos na Agricultura Familiar é o uso dos Microrganismos Eficientes (ME), que são definidos como uma comunidade de microrganismos naturalmente encontrados em solo fértil. Diante do exposto, amostras de ME e solos, com e sem o tratamento destes foram coletados e avaliados quanto a sua identificação e quantificação de compostos secundários provenientes do metabolismo dos ME isolados por UHPLC-HRMS, bem como a identificação e quantificação dos elementos-traço nos solos, com e sem tratamento da solução de ME. Três amostras de ME, amplamente utilizadas em Marialva, Brasil, fabricadas por agricultores locais em biofábricas nas próprias lavouras, e o solo de três propriedades rurais foram amostradas para a análise de Al, As, Zn, Cd, Ni e Cu por ICP-OES. A caracterização da solução de ME por UHPLC-HRMS apresentou metabólitos secundários de fungos, como a aflatoxina G₂ e a patulina. A adição de ME ao solo tem contribuído para o aumento da diversidade microbiológica, que atuam na decomposição da matéria orgânica e aumentam a quantidade de nutrientes disponíveis para o crescimento da planta sem as consequências causadas pelos praguicidas. No entanto, das 6 amostras de solo, com e sem tratamento de ME, de 3 propriedades rurais da região de Marialva-Brasil, não apresentaram diferenças estatísticas das quantidades de elementos-traço, Al (média 26,85 mg kg⁻¹); Cu (média 4,07 mg kg⁻¹), Zn (média 1,34 mg kg⁻¹), As (média 0,31 mg kg⁻¹) e Ni (média 0,23 mg kg⁻¹). Frente a estes resultados e ao crescente uso de ME pela agricultura natural, enfatizamos a necessidade de avaliação constante destas soluções e o impacto no meio ambiente. Uma vez que no presente estudo foram demonstrados a presença de fungos toxigênicos e não houve redução de elementos traços com potencial tóxico para a saúde ambiental e humana.

Palavras-chave: Microrganismos Eficientes; Praguicidas; Agricultura Natural; Metabólitos secundários; Elementos-traço.

1 **Caracterização de Microrganismos Eficientes (MEs) produzidos**
2 **artesanalmente no Brasil, identificação de metabólitos secundários e a**
3 **biorremediação de elementos-traço em solo**

4 Natália Santos Pretes¹, Pablo Ricardo Sanches de Oliveira¹, Ana Laura
5 Castilho², Ailton Rojas Poppi³, Eduardo Jorge Pilau⁴, José Eduardo
6 Gonçalves⁵, Benício Alves de Abreu Filho¹, Juliana Cristina Castro⁶, Miguel
7 Machinski Junior⁶

8 ¹ Programa em Ciência dos Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Av.
9 Colombo, 5790, Maringá 87020-900, Paraná, Brasil;

10 ² Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo,
11 5790, Maringá 87020-900, Paraná, Brasil;

12 ³ Instituto Desenvolvimento Rural do Paraná – Iapar-Emater (IDR-PR), Av. Rui
13 Barbosa, 221, Marialva, 86990-000, Paraná, Brasil;

14 ⁴ Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo,
15 5790, Maringá 87020-900, Paraná, Brasil;

16 ⁵ Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Limpas e Instituto Cesumar de
17 Ciência, Tecnologia e Inovação – ICETI. Universidade Cesumar - Unicesumar,
18 Av. Guedner 1610, Maringá, 87050-900, Brasil;

19 ⁶ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de
20 Maringá, Av. Colombo, 5790, Maringá 87020-900, Paraná, Brasil.

21

22 E-mail:

23 Natália Santos Pretes: nataliapretes@gmail.com

24 Pablo Ricardo Sanches de Oliveira: prsanchesoliveira@gmail.com

25 Ana Laura Castilho: analauracastilhoof@hotmail.com

26 Ailton Rojas Poppi: ailtonpoppi@idr.pr.gov.br

27 Eduardo Jorge Pilau: ejpilau@uem.br

28 José Eduardo Gonçalves: jose.goncalves@unicesumar.edu.br

29 Benício Alves de Abreu Filho: baafilho@uem.br

30 Juliana Cristina Castro: jccastro2@uem.br

31 Miguel Machinski Junior: mmjunior@uem.br

32

33 *Autor correspondente: Departamento de Ciências Básicas da Saúde,
34 Universidade Estadual de Maringá. Av. Colombo 5790, Campus Universitário.
35 87020-900 Maringá, Paraná, Brasil. Tel.: +55 (44) 3011-4565; E-mail:
36 mmjunior@uem.br

37

38 **RESUMO:**

39 O Brasil é considerado um dos maiores produtores agrícolas do mundo e em
40 consequencia gera o esgotamento dos recursos naturais do solo. Com isso,
41 métodos alternativos como o uso dos Microrganismos Eficientes (ME) na
42 agricultura familiar tem sido utilizado para a biorremediação do solo. O objetivo
43 deste trabalho foi caracterizar os ME produzidos em três *biofábricas* no
44 município de Marialva, Brasil. Além da caracterização microbiológica foi
45 proposto a identificação de compostos provenientes do metabolismo
46 secundário destes ME por UHPLC-HRMS. O solo com e sem biorremediação
47 por ME em três propriedades rurais foram amostradas para a análise de Al, As,
48 Zn, Cd, Ni e Cu por ICP-OES. Os ME analisados foram caracterizados como
49 uma mistura de bactérias e fungos. Foram encontrados Bacilos Gram
50 Negativos e Bacilos Gram Positivos. Dos fungos foram caracterizados os
51 gêneros *Penicillium*, *Rhizopus* e *Fusarium*. A identificação dos ME com
52 UHPLC-HRMS demonstrou a presença de metabólitos secundários de fungos,
53 como a aflatoxina G₂ e a patulina. No entanto, não observou-se uma
54 biorremediação do solo quanto a quantificação dos elementos-traço. Não
55 houve diferença significativa destes elementos em solo com e sem tratamento
56 por ME. Tanto no solo tratado como sem tratamento observou-se a presença
57 de Al (média 26,85 mg kg⁻¹); Cu (média 4,07 mg kg⁻¹), Zn (média 1,34 mg kg⁻¹)
58 ¹), As (média 0,31 mg kg⁻¹) e Ni (média 0,23 mg kg⁻¹). Uma vez que no
59 presente estudo foi demonstrada a presença de fungos toxigênicos nos ME
60 avaliados, enfatizamos a necessidade de um monitoramentos destes e o
61 impacto no meio ambiente, bem como a biorremediação do solo.

62

63 **Palavras-chave:** Microrganismos Eficientes; Praguicidas; Agricultura Natural;
64 Metabólitos secundários; Elementos-traço.

65

66 **1. Introdução**

67 Os MEs são definidos como uma comunidade de microrganismos que
68 são naturalmente encontrados em solo fértil (Ayan et al., 2022; Şahan et al.,
69 2021), seu uso é crescente e vem se destacando diante de outras alternativas
70 viáveis para controle de pragas e otimização do plantio na agricultura familiar.

71 O Brasil é considerado um dos maiores produtores agrícolas do mundo.
72 Entretanto, o aumento da produção e o esgotamento de recursos naturais do

73 solo, gerou uma preocupação voltada à criação de novas tecnologias que
74 atendessem a maior demanda da produtividade, preservação ambiental,
75 reaproveitamento de resíduos do solo e diminuição do uso de praguicidas nas
76 culturas agrícolas (Magalhães Filho et al., 2021).

77 Desta forma, há um crescente aumento na busca de compostos
78 naturais, biológicos e de menor toxicidade para substituir o uso de
79 agroquímicos nas aplicações agrícolas. A *agricultura natural* é fundamentada a
80 partir de tecnologias ecológicas que não utilizam produtos químicos ou esterco
81 animal e visa produzir alimentos de qualidade com vantagens econômicas, de
82 qualidade de vida e com capacidade de produção em quantidades
83 proporcionais ao aumento populacional (Andrade, 2020). Em 1970, o professor
84 Doutor Teruo Higa de uma Universidade do Japão, iniciou os estudos sobre os
85 Microrganismos Eficientes (MEs), com o objetivo de melhorar a utilização da
86 matéria orgânica na agricultura natural e diminuir o uso substâncias químicas, e
87 consequentemente, a contaminação do solo e alimentos por produtos de
88 conversão e/ou degradação (Gomes et al., 2021)

89 Frente ao crescente uso de ME pela agricultura natural, se faz
90 necessário a avaliação quanto a sua identificação de isolados fungicos e
91 microbianos, bem como a identificação de compostos secundários
92 provenientes do metabolismo dos microrganismos presentes no ME pelo
93 método de UHPLC-HRMS, e a identificação e quantificação dos elementos-
94 traço dos solos, com e sem tratamento destes com os ME.

95

96 **2. Material e Métodos**

97 **2.1. Obtenção das amostras de Microrganismos Eficientes (MEs)**

98 Os MEs foram obtidos em diferentes propriedades da região de
99 Marialva-PR, doadas pelos agricultores. A partir de amostras de arroz cozido
100 (ME sólido), conforme a Tabela 1. As amostras permaneceram refrigeradas a 4
101 °C até o momento da análise.

102

103

104 Tabela 1. Amostras de Microrganismos Eficientes (MEs) coletadas no
105 Município de Marialva-Brasil.

Amostras	Dados geográficos	Período da coleta	Quantidade
ME1 sólido	23°29'08.0"S 51°45'58.7"O	29/03/2023	119 g
ME2 sólido	23°27'48.3"S 51°47'50.5"O	29/03/2023	950,5 g
ME1 líquido	23°29'08.0"S 51°45'58.7"O	26/04/2023	2 L
ME2 líquido	23°27'48.3"S 51°47'50.5"O	05/09/2023	2 L
ME3 líquido	23°28'17.0"S 51°46'11.3"O	06/09/2023	2 L

106 Legenda: ME: Microrganismos eficientes; ME1 sólido: Amostra 1 de microrganismo eficiente
107 sólido; ME2 sólido: Amostra 2 de microrganismo eficiente sólido; ME1 líquido: Amostra 1 de
108 microrganismo eficiente líquido; ME2 líquido: Amostra 2 de microrganismo eficiente líquido;
109 ME3 líquido: Amostra 3 de microrganismo eficiente líquido; S: Direção sul da coordenada
110 geográfica; O: direção oeste da coordenada geográfica. g: gramas; L: litros.

111 Fonte: Autoria própria.

112

113 **2.2. Caracterização dos microrganismos isolados dos MEs de Marialva-** 114 **Brasil**

115 **2.2.1. Caracterização microbiológica**

116 Primeiramente foi realizado a identificação prévia dos microrganismos
117 que compunham o bioproduto; para isso foram consideradas as características
118 macroscópicas e microscópicas de isolados do ME sólido que foram cultivados
119 em meio de cultura que propuseram ambiente favorável para o crescimento de
120 fungos e bactérias de formas distintas.

121 Para identificação de espécies de bactérias, utilizou-se de 10 g de grãos
122 de arroz de ME sólido por placa em meio Ágar Triptona de Soja (TSA), depois
123 foi utilizado 2 mL de Tween 80 1% para retirar os interferentes, dessa solução
124 pegou-se 20 µL do líquido de lavagem, espalhado com uma alça de Drigalski, e
125 deixado por mais 24h em estufa à 35 °C, depois com uma alça descartável,
126 uma parte da colônia foi semeado em 16 placas contendo meio Ágar Triptona
127 de Soja (TSA) e incubadas à 35 °C por 24h. Realizou-se a coloração de
128 Gram dos isolados e fez-se a análise microscópica das lâminas.

129 Para o isolamento de fungos, utilizou-se de 10 g de grãos de arroz do
130 ME sólido por 7 placas em meio Ágar Batata Dextrose (BDA, por 7 dias a 25 °C
131 em incubadora. As colônias foram lavadas com 2 mL de tween 80 1% para

132 diminuir a quantidade de interferentes, e re-isolada por mais 7 dias e mantidas
133 em incubadora à 25 °C. A partir das características como à aparência de
134 colônias, forma do micélio, cor e tempo de crescimento, foi realizada a
135 caracterização macroscópica. A caracterização microscópica foi realizada pela
136 técnica de microcultivo (Ribeiro e Soares, 2005). Os isolados foram vistos sob
137 um microscópio *Olympus* e e documentados por um sistema de captura de
138 imagem. Os isolados foram identificados por meio de caracterização
139 morfofisiológica e chaves de identificação (Hoog et al., 2000).

140

141 **2.2.2. Caracterização por UHPLC-HRMS dos metabólitos secundários de** 142 **fungos**

143 Os reagentes foram todos de grau HPLC. A água ultrapura foi obtida pelo
144 sistema Milli-Q® em 18,2 MΩ/cm (Millipore, Billerica, MA, EUA) para extração e
145 análise cromatográfica.

146 Para a determinação dos compostos, alíquotas da solução de ME
147 filtradas em filtro PVDF 0,45 µm (13 mm de diâmetro, Millex™, Darmstadt,
148 Alemanha) foram analisados por UHPLC-HRMS utilizando um sistema de
149 cromatografia líquida de ultra alta eficiência Nexera X2 (Shimadzu Europa,
150 GmbH, Duisburg, Alemanha) equipado com 2 bombas LC-30AD (Duisburg,
151 Alemanha) e coluna Symmetry C18 (75 x 4,6 mm), mantida a 40 °C, com um
152 gradiente linear de eluição utilizando como solvente água (0,1% de ácido
153 fórmico) (A) e acetonitrila (0,1% de ácido fórmico) (B). A separação
154 cromatográfica foi efetuada em 20 minutos.

155 O gradiente utilizado foi: 1 minuto, 95% solvente A e 5% solvente B; 10
156 minutos, 50% solvente A e 50% solvente B; 12 minutos, 5% solvente A e 95%
157 solvente B; 13 minutos, 5% solvente A e 95% solvente B; 17 minutos, 95%
158 solvente A e 5% solvente B e 20 minutos, 95% solvente A e 5% solvente B. O
159 Fluxo foi mantido em 0,20 mL minutos⁻¹ durante toda a separação
160 cromatográfica.

161 O espectrômetro de massas utilizado foi do tipo Q-tof Impact II (Bruker,
162 Alemanha), com fonte de ionização do tipo *electrospray*, operado com modo de
163 aquisição AutoMS/MS, onde os 3 íons mais intensos de cada pico
164 cromatográfico foram selecionados, com taxa de aquisição de 5 Hz (MS e
165 MS/MS) e *tune* do equipamento na faixa de *m/z* 70 – 1200. O espectro de
166 massas foi coletado usando modo de ionização ESI positivo e negativo, com

167 voltagem do capilar de 4,50 kV; temperatura da fonte 200°C; e fluxo do gás de
168 dessolvatação 8 L minutos⁻¹. Os experimentos de varredura de íons-produto
169 (*daughter scan*) foram realizados utilizando dissociação induzida por colisão
170 (CID) obtidas utilizando uma rampa de energia de colisão na faixa de 15 – 40
171 eV e pressão do gás de colisão de $3,06 \cdot 10^{-3}$ mBar, na câmara de colisão.

172 O cromatograma de íons e os espectros de MS e MS/MS obtidos foram
173 visualizados através do *software Data Analysis 4.3*, comparados com a
174 literatura e analisados com auxílio de bancos de dados de espectrometria de
175 massas de acesso livre. A metodologia foi seguida conforme Castro et al.
176 (2018).

177

178 **2.3. Amostras de solo em propriedades rurais de Marialva-Brasil**

179 A coleta das amostras de solos foi realizada em outubro de 2023 com
180 ajuda da equipe de análises de solo do Instituto de Desenvolvimento Rural do
181 Paraná (IDR-PR) de Marialva, PR, em três propriedades rurais localizadas no
182 município de Marialva, PR de acordo com as coordenadas geográficas
183 23°29'08.0"S 51°45'58.7"O, 23°27'48.3"S 51°47'50.5"O e 23°28'17.0"S
184 51°46'11.3"O.

185 Em cada propriedade foram retiradas duas alíquotas de solo para
186 análise, um solo com tratamento de solução ME e outro sem tratamento. Estes
187 foram nomeadas como S1 (sem o tratamento de ME), S2 (com o tratamento de
188 ME), S3 (sem o tratamento de ME), S4 (com o tratamento de ME), S5 (sem o
189 tratamento de ME), S6 (com o tratamento de ME). O solo foi retirado uma
190 profundidade de 0-20 cm e cada amostra com aproximadamente 900 g. As
191 amostras foram mantidas em embalagem plástica e refrigeradas a 4 °C por 30
192 dias até digestão ácida em microondas.

193

194 **2.4. Preparação das amostras de solo por Digestão em microondas**

195 O equipamento utilizado foi o Digestor por Microondas modelo DGT 100
196 Plus da Provecto Analítica de 900 watts (São Paulo, Brasil). Foram usadas 2 g
197 de amostra (em duplicata) em 20 mL de ácido nítrico 10% na programação
198 passo 1: 02 minutos a 700 W; Passo 2: 12 minutos a 230 W; Passo 3: 08
199 minutos a 450 W; Passo 4: 20 minutos a 060 W e Passo 5: 05 minutos a 800
200 W, conforme descrito e orientado pelo fabricante do equipamento. Após a
201 extração, as amostras foram filtradas em filtro qualitativo com sistema à vácuo,

202 ressuspendidas em 20 mL de ácido nítrico 10% e armazenada em refrigeração
203 a 4 a 8 °C para análise em Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma
204 Acoplado Indutivamente (ICP-OES). Um branco foi usado como controle
205 negativo, substituindo amostra por 2 g de água destilada e repetido o processo
206 de extração (Moreno-Gordaliza et al., 2023, com modificações; Salles et al.,
207 2023).

208

209 **2.5. Determinação de elementos-traço por ICP-OES**

210 A análise de elementos-traço empregando plasma de argônio
211 indutivamente acoplado – ICP-OES (iCAP PRO XP, Thermo Fisher®,
212 Walthaman, MA USA). Para a análise, foi preparada uma curva de calibração
213 de 0,01 a 1 mg L⁻¹ a partir do padrão multielementar puro contendo: alumínio
214 (Al), Arsênio (As), Zinco (Zn), Cádmio (Cd), Níquel (Ni), e Cobre (Cu) (Sigma-
215 Aldrich, São Paulo, Brasil). Para eliminar o efeito de matriz, foi utilizado uma
216 solução aquosa com 10 % de ácido nítrico como branco (Habte et al., 2016;
217 com modificações; Salles et al., 2023)

218

219 **2.6. Análise estatística**

220 Os dados obtidos para os elementos traço foram analisados por meio do
221 programa SAS.agri (Canteri et al., 2001) para análise de variância, comparados
222 pelo teste de Tukey (p< 0,05).

223

224 **3. Resultados e discussão**

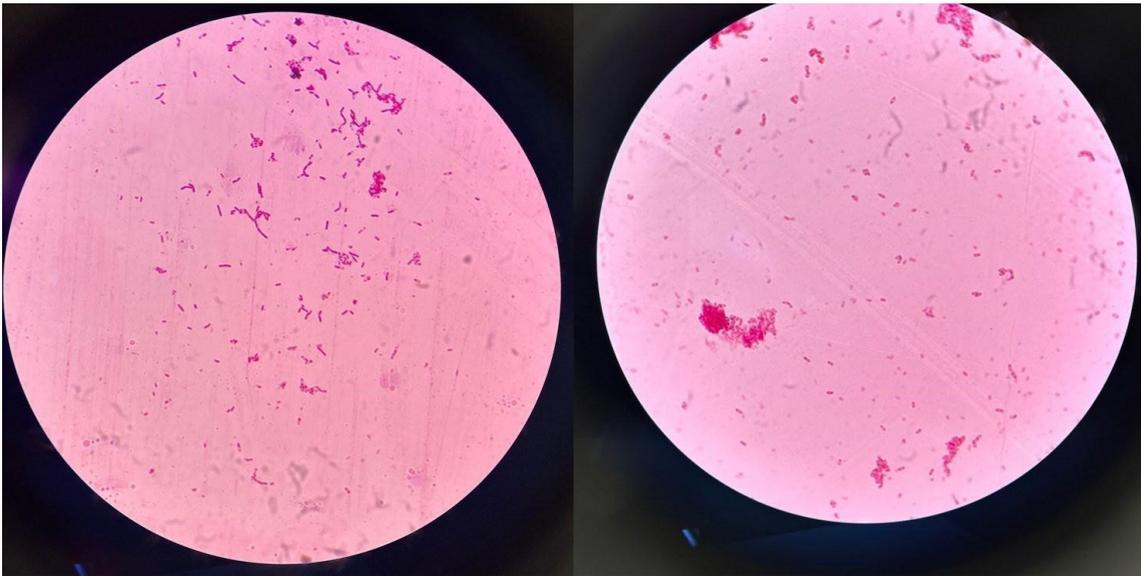
225 **3.1. Caracterização dos microrganismos isolados dos MEs de Marialva-** 226 **Brasil**

227 No isolamento bacteriano, obteve-se 16 isolados caracterizados de
228 acordo com as características das colônias. Após a obtenção da cultura pura, foi
229 realizadas a coloração de Gram para evidenciar características morfo-toriais.
230 Os grupos bacterianos apresentam como sendo cocos e bacilos Gram-
231 negativos (Figura 1); 8 placas se caracterizaram como bacilos Gram-positivos
232 (Figura 2).

233

234

235 Figura 1. Características microscópicas das bactérias isoladas de ME sólido
236 por microscopia de luz óptica.

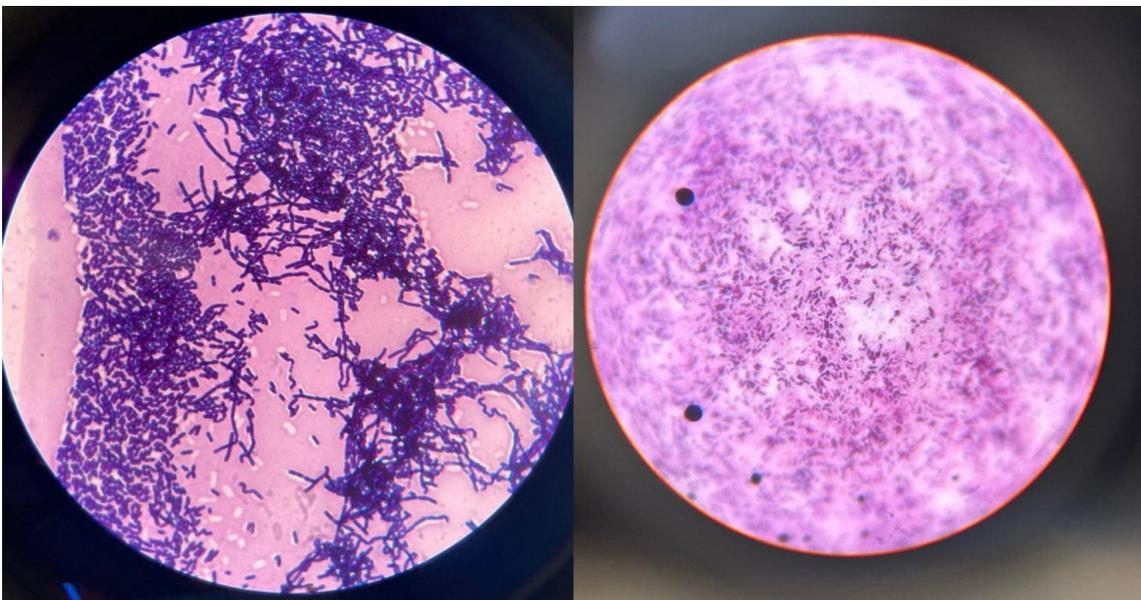


237
238 Legenda: Captura de imagem em microscopia óptica comum de cocos e bacilos Gram-
239 negativos.

240 Fonte: autoria própria.

241

242 Figura 2. Características microscópicas das bactérias isoladas de ME sólido
243 por microscopia de luz óptica.



244
245 Legenda: Captura de imagem em microscopia óptica comum de bacilos Gram-positivos.

246 Fonte: autoria própria.

247

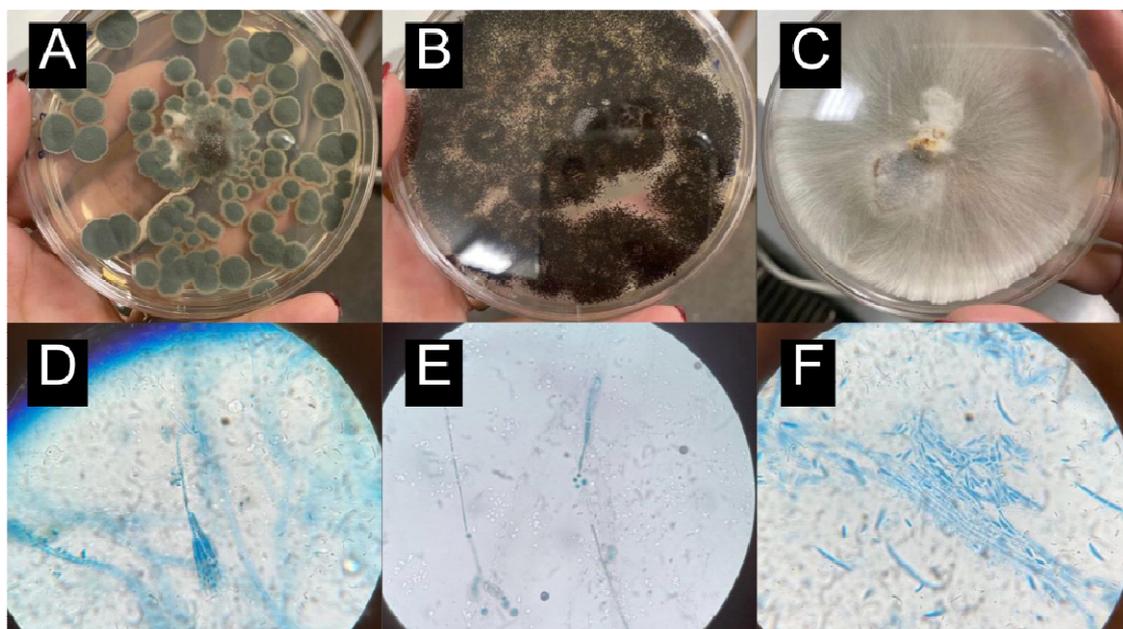
248 Os microrganismos são comumente utilizados na agricultura para
249 aumentar a quantidade de nutrientes, enzimas e vitaminas para as plantas, a

250 fim de diminuir os impactos de degradação e acúmulo de resíduos no solo
251 causados pelo uso de agrotóxicos (Assunção et al., 2024).

252 Para a identificação de fungos foram considerados as características
253 deaparência de colônias, forma do micélio, cor e tempo de crescimento, a partir
254 de parâmetros macroscópicos e microscópicos. Em 3 das 7 placas cultivadas,
255 identificou-se a presença dos fungos dos gêneros *Penicillium*, colônia de cor
256 verde (Figura 3.A), fiálides e conídios com formato de “pincel” (Figura 3.D);
257 *Rhizopus*, colônia de cor preta (Figura 3.B) e esporângio arredondado (Figura
258 3.E); e *Fusarium*, colônia de cor branca com estruturas finas (Figura 3.C) e
259 conídios septados em formato de meia lua (Figura 3.F).

260

261 Figura 3. Características macroscópicas e microscópicas de fungos isolados de
262 ME sólido



263

264 Legenda: A: Placa de Petri do gênero *Penicillium*; B: Placa de Preti característica do gênero
265 *Rhizopus*; C: Placa de Petri característica do gênero *Fusarium*; D: Captura de imagem
266 microscópica com identificação fúngica *Penicillium*; E: *Rhizopus*; F: *Fusarium*.

267 Fonte: Autoria própria.

268

269 O gênero de fungo *Penicillium* foi identificado no ME, este é classificado
270 como um microrganismo endofítico, que pode estar no interior da estrutura da
271 planta e atuar como fonte de compostos bioativos (Bogas et al., 2024),
272 usualmente utilizado para aumento da produção de enzimas como as α -
273 amilase, β -amilase, CMcase e proteases; entretanto a atividade enzimática é
274 dependente de fator climático, umidade do ambiente e pH, pois está

275 diretamente ligada ao crescimento do fungo (Cunha et al., 2016). O fungo
276 *Penicillium* também age na degradação de resíduos químicos acumulados no
277 solo. Singh e Singh (2016) e Correa et al. (2023) demonstraram que o
278 *Penicillium* usa resíduos do herbicida glifosato como fonte de energia, fósforo,
279 nitrogênio e carbono por meio de vias catabólicas e produz a sarcosina,
280 produto da degradação de glifosato.

281 O gênero *Rhizopus*, que também foi identificado, são microrganismos
282 utilizados na biotecnologia, devido às suas propriedades fermentativas, como
283 produção de ácidos orgânicos, entre eles, ácidos fumárico e láctico; produção
284 enzimática (lipase) e em processos de biodegradação de resíduos químicos,
285 como praguicidas (Barghini, 2020). Nas lavouras, o *Rhizopus* age como parte
286 do mecanismo de defesa da planta, no estímulo do fator de crescimento, no
287 aumento de nutrientes do solo, remoção de íons metálicos e na remoção de
288 polímeros sintéticos e fracionados (Zerpa et al., 2017).

289 Também foi encontrado o gênero *Fusarium*, fungo que atua como
290 controle biológico nas lavouras pois são altamente específicos e patogênicos à
291 pragas; entretanto, o uso é dependente de diversos fatores e deve ser
292 controlado, uma vez que é preciso fazer a correta identificação da espécie,
293 concentração da solução fúngica, época para aplicação no solo ou planta e em
294 qual tipo de planta aplicar, pois há espécies de *Fusarium* que causam efeitos
295 fitopatológicos e são produtores de micotoxinas, que provocam efeitos
296 adversos à saúde humana e animal (Bastos et al., 2017; Prestes et al., 2019).

297 A presença destes microrganismos demonstram a variedade genética
298 dos MEs utilizados na região de Marialva-PR, e podem impactar na viabilidade
299 do solo e produção das culturas. A identificação de fungos produtores de
300 micotoxinas foi realizada por UHPLC-HRMS, uma vez que estes metabólitos
301 secundários irão estar presentes no meio que contém fungos toxigênicos.

302

303 **3.2 Caracterização dos metabólitos secundários produzidos pelos ME por** 304 **UHPLC-HRMS**

305 Diante do exposto acima, após a identificação macroscópica e
306 microscópica das espécies fúngicas e bacterianas, foi realizada a
307 caracterização dos MEs, frente a composição das substâncias químicas
308 (metabólitos secundários) dos microrganismos isolados (Abd-Elsalam et al.,
309 2023). Para esta técnica, foram pesquisados os seguintes compostos:

310 Ocratoxinas A, B e C; aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂; citrinina; esterigmatocistina;
 311 patulina; toxina T2 tetrol; nivalenol; zearalanona; ácido láctico; auxina;
 312 plantaricina BN; pantetina; sarcosina; colina; quitosana; ergosterol; lacase e
 313 colistina (Guterres et al., 2017; Agriopoulou et al., 2020). Entretanto, os
 314 metabólitos identificados foram apenas a aflatoxina G₂, (Negativo ID:
 315 HMDB0030475 e Positivo ID:HMDB0030475, Wishart et al., 2013) (Tabela 2;
 316 Figura 4) e a Patulina (HMDB, ID: HMDB0034299, Wishart et al., 2013) (Tabela
 317 2; Figura 5), micotoxinas confirmadas pelo espectro de fragmentação.

318

319 Tabela 2. Metabólitos identificados das soluções de microrganismos eficientes
 320 (ME) provenientes da cidade de Marialva-Paraná, de modo positivo e negativo.

Amostra	Compostos	TR (min)	[M+H] ⁺	m/z	Erro (ppm)
ME	Aflatoxina G ₂	7,73	331,0812	331,0812	0,0000
Amostra	Compostos	TR (min)	[M-H] ⁻	m/z	Erro (ppm)
ME	Aflatoxina G ₂	10,63	329,0667	271,0239; 299,0180; 314,0413; 329,0647	-6,3817
	Patulina	7,07	153,0193	91,0175; 109,0292; 153,0195	-1,3070

321 Legenda: ME: Microrganismo eficiente; TR: Tempo de retenção; Min: Minuto; ppm: Partes por
 322 milhão; [M+H]⁺: Modo de energia de fragmentação positivo; [M-H]⁻: Modo de energia de
 323 fragmentação negativo.

324 Fonte: autoria própria.

325

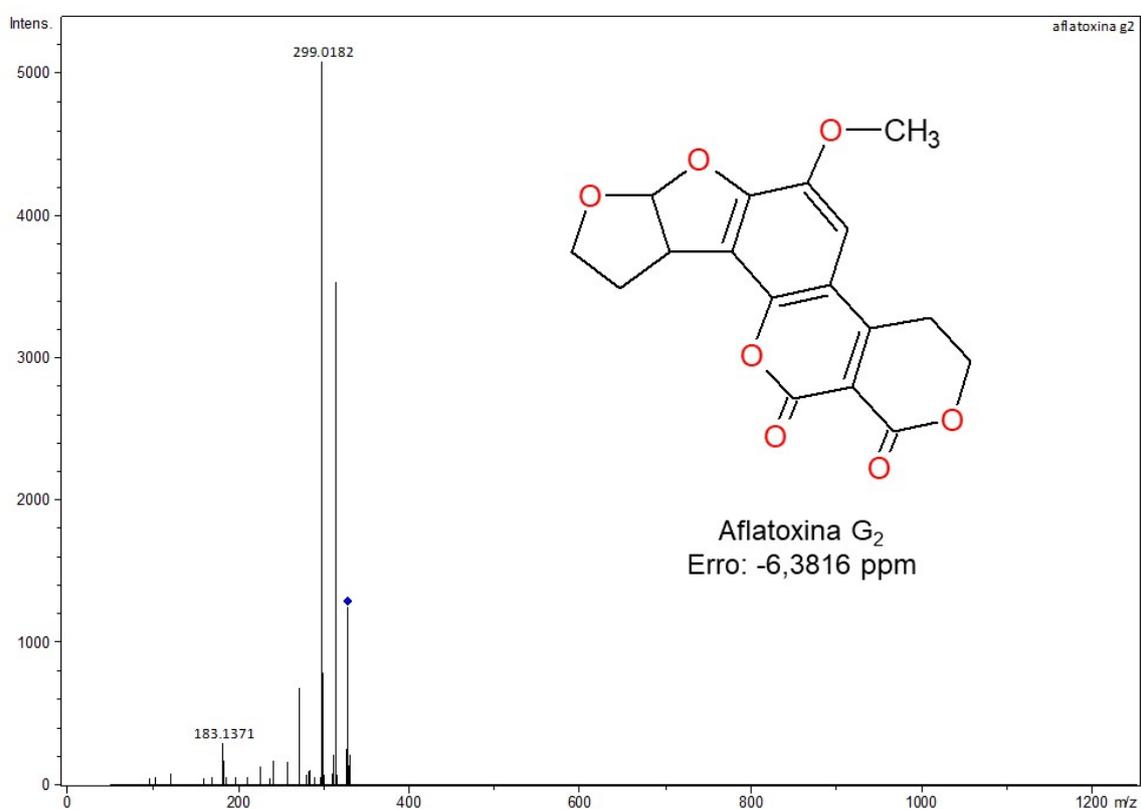
326 A aflatoxina G₂ é um metabólito secundário proveniente de fungos dos
 327 gênero *Aspergillus* e de algumas espécies de *Penicillium*, foi detectado no
 328 espectro de fragmentação em modo negativo e positivo. É potencialmente
 329 tóxica, causando prejuízos econômicos nas lavouras e efeitos clínicos
 330 negativos em humanos e animais. Essa espécie de fungo está diretamente
 331 relacionada à contaminação da indústria alimentícia, principalmente no cultivo
 332 de grãos que são amplamente utilizados na fabricação de ração animal (Calvet
 333 et al., 2015; Kobashigawa et al., 2019). A exposição direta ou indireta causa
 334 intoxicações agudas ou crônicas a depender da concentração de aflatoxina e
 335 tempo de exposição (Katsurayama e Taniwaki, 2017).

336 A solução de ME, pode se tornar um produto potencialmente tóxico, uma
 337 vez que os fungos identificados produzem metabólitos secundários como as
 338 micotoxinas que contaminam alimentos e causam prejuízos a saúde humana e

339 animal e na economia para a produção agrícola, pois quando contaminados,
340 esses alimentos não podem ser comercializados. É importante ressaltar que o
341 ME é um produto utilizado na agricultura natural como um possível substituto
342 dos praguicidas do tipo fertilizantes que aumentam a quantidade de
343 microrganismos que favorecem a elevação da concentração de nutrientes para
344 o crescimento das plantas, entretanto, frente aos resultados deste estudo, há a
345 necessidade de pesquisas avançadas que assegurem o uso correto deste
346 bioproduto.

347

348 Figura 4. Espectro de fragmentação UHPLC-ESI(-)-Qtof-MS/MS da micotoxina
349 aflatoxina G₂.



350

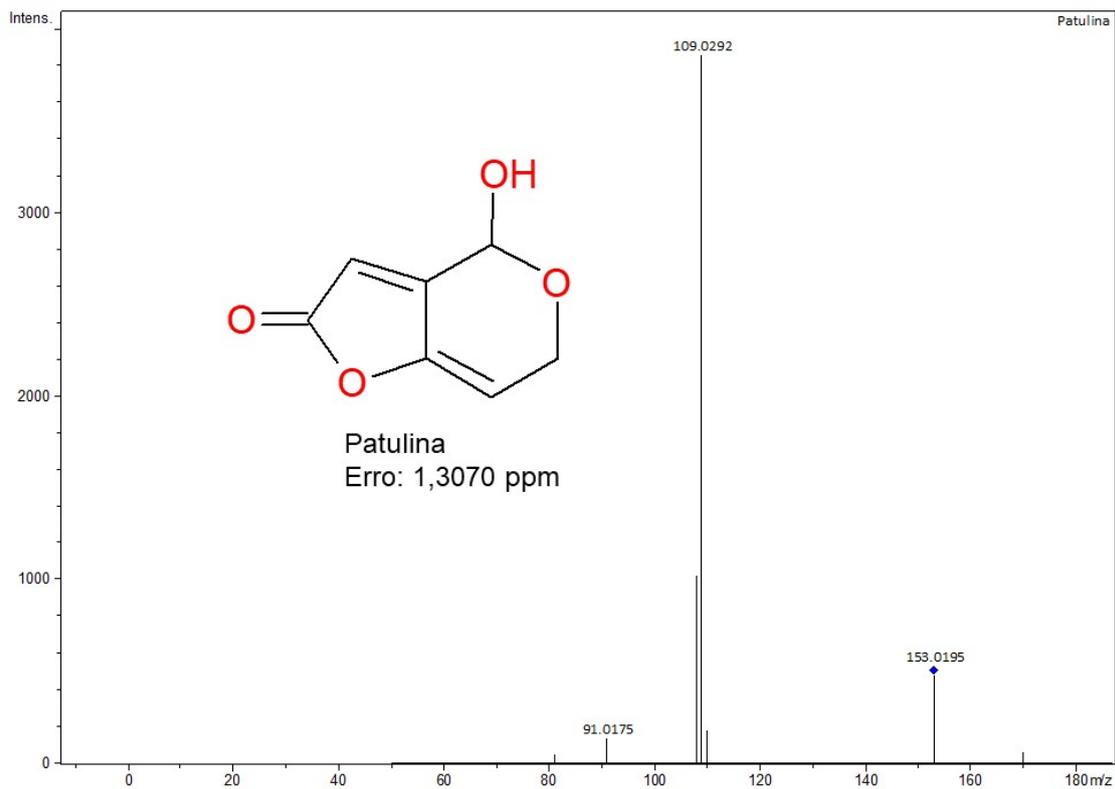
351 Fonte: Autoria própria.

352

353 A patulina é um metabólito secundário de fungos do gênero *Penicillium*,
354 e a identificação deste composto é um indicativo da presença desta cepa
355 fúngica na solução de ME. Altas concentrações de patulina causam efeitos
356 mutagênicos e genotóxicos; e ainda, levam a inflamação intestinal grave e
357 hepatopatias (Garcia et al., 2019; Zheng et al., 2021).

358

359 Figura 5. Espectro de fragmentação UHPLC-ESI(-)-Qtof-MS/MS da micotoxina
360 patulina.



361

362 Fonte: Autoria própria.

363

364 A detecção de micotoxinas na solução de ME é um indicativo de que
365 para o uso do bioproduto na agricultura, é preciso analisar e conhecer os
366 microrganismos que fazem parte da composição, pois quando ocorre a
367 contaminação por fungos micotoxigênicos, o produto se torna um risco a saúde
368 dos agricultores e dos consumidores finais dos alimentos que são cultivados
369 com ME, uma vez que a via alimentar é a principal causa de intoxicação por
370 micotoxícoses. Finalmente, embora a presença de microrganismos, como
371 bactérias foram confirmadas segundo Santos et al. (2020), compostos
372 característicos de sua presença não foram caracterizados.

373

374 **3.3. Determinação de Al, As, Zn, Cd, Ni e Cu por ICP-OES**

375 A aplicação de ME nos solos para a agricultura natural consiste em,
376 melhorar as características físico-químicas e microbiológicas dos solos;
377 biorremediar os solos contaminados, neutralizando os metais e os resíduos de
378 praguicidas; adiantar o processo de compostagem de resíduos (Andrade,
379 2020). Para avaliar se há diminuição no conteúdo de metais para aplicação do

380 ME, foram coletadas 3 amostras de solo, com e sem o tratamento de ME da
381 zona rural da região de Marialva-PR, a fim de comparar a quantidade de
382 elementos não essenciais e potencialmente tóxicos (Tabela 3).

383

384 Tabela 3. Quantificação de elementos-traço dos solos com e sem a solução de
385 microrganismos eficientes (ME) de Marialva-Paraná.

Amostras	Média (mg kg ⁻¹) ± DP					
	Al	As	Zn	Cd	Ni	Cu
S1+	26,82 ^a ± 0,81	0,27 ^a ± 0,12	2,16 ^a ± 0,19	ND	0,35 ^a ± 0,06	3,29 ^a ± 0,11
S1-	26,77 ^a ± 0,75	0,44 ^a ± 0,04	1,78 ^a ± 0,52	ND	0,30 ^a ± 0,03	2,58 ^a ± 0,57
S2+	27,17 ^a ± 0,56	0,24 ^a ± 0,18	1,65 ^a ± 0,19	ND	0,25 ^a ± 0,04	4,05 ^a ± 0,85
S2-	26,77 ^a ± 0,77	0,35 ^a ± 0,01	1,08 ^a ± 0,19	ND	0,22 ^a ± 0,03	3,57 ^a ± 1,17
S3+	26,77 ^a ± 0,78	0,29 ^a ± 0,10	1,54 ^a ± 0,76	ND	0,24 ^a ± 0,05	4,37 ^a ± 0,79
S3-	26,77 ^a ± 0,79	0,29 ^a ± 0,12	1,265 ± 0,18	ND	0,24 ^a ± 0,02	5,08 ^a ± 0,13
mdia± DP	26,85 ± 0,29	0,31 ± 0,06	1,34 ± 0,26	-	0,23 ± 0,02	4,07 ± 0,45

386 Legendas: Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística a 5%
387 de probabilidade; S1+: Amostra de solo com o tratamento de ME; S1-: Amostra de solo sem o
388 tratamento de ME; S2+: Amostra de solo com o tratamento de ME; S2-: Amostra de solo sem o
389 tratamento de ME; S3+: Amostra de solo com o tratamento de ME; S3-: Amostra de solo sem o
390 tratamento de ME; ND: Não detectado; DP: Desvio padrão; Al: Alumínio; As: Arsênio; Zn: Zinco;
391 Cd: Cádmio; Ni: Níquel; Cu: Cobre.

392 Fonte: autoria própria.

393

394 Os resultados apresentados demonstraram que não houve diferença
395 estatística ($p < 0,05$) entre os solos com e sem o tratamento de ME, isso pode
396 ser justificado por diversos fatores, como a forma de cultivo de ME coletados, o
397 clima, pH e tipo de vegetação da região, bem como o tempo de ação do
398 bioproduto nas plantações, que foi em média 6 meses, relatado pelos
399 agricultores, donos das propriedades que foram realizados as coletas de solo.

400 Entretanto, apesar da não eficácia do bioproduto na neutralização dos
401 elementos essenciais e não essenciais, as quantidades encontradas é um fator
402 preocupante uma vez que, a detecção destes podem causar danos à saúde
403 humana e animal, intoxicações e perdas econômicas significativas de
404 alimentos.

405 O alumínio (Al) foi o principal elemento encontrado em ambos os solos,
406 com e sem tratamento com ME, média 26,85 mg kg⁻¹) isso ocorre devido às
407 características do solo, clima, acidez e tipo de vegetação. Este elemento não

408 essencial para o organismo humano e animal, quando consumido de forma
409 irregular e em grandes quantidades, pode ser prejudicial levando a casos de
410 intoxicações reprodutivas, imunotoxicidade, entre várias outras anormalidades
411 (Brylinski et al, 2023). Para as plantas, o Al provoca danos ao sistema radicular
412 e conseqüentemente menor desempenho produtivo; e aumenta as
413 concentrações de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) a partir do estresse
414 oxidativo causado pelo processo de toxicidade (Silva et al., 2018).

415 O Cobre (Cu) apresentou média de 3,28 mg kg⁻¹ nas amostras de solo,
416 seguido do Zinco (Zn), 1,34 mg kg⁻¹. Esses elementos são considerados
417 micronutrientes que são essenciais a alguns processos fisiológicos das plantas,
418 entretanto em altas concentrações podem interferir no processo de crescimento
419 vegetal, inibição fotossintética, desenvolvimento e diminuição da produção do
420 fruto (Tiecher et al., 2016; Cambrollé et al., 2015).

421 O Arsênio (As) é um composto classificado como contaminante natural,
422 uma vez que a contaminação pode ser devido a decomposição de fontes
423 naturais como rochas e minerais; e a sua concentração está diretamente ligada
424 às características do solo (Alonso et al., 2014). Entretanto, também pode ser
425 detectado após o uso indiscriminado de praguicidas nas lavouras (Souza et al.,
426 2016). A ingestão concentrada a longo prazo de As em alimentos, pode causar
427 danos à saúde humana e animal, como cânceres de órgãos internos e de pele,
428 cardiopatias graves, diabetes e disfunção dos sistemas reprodutivos (Singh et
429 al, 2015). As baixas concentrações de As detectadas nas amostras de solo
430 deste estudo (Tabela 5), pode ser justificada devido às características do solo
431 da região de Marialva, PR que é classificado como mais aerado, o que
432 favorece o escorregamento e perda do As no solo (Silva et al., 2020).

433 O Níquel (Ni) é um elemento importante para o meio ambiente, possui
434 propriedades benéficas para as plantações, entretanto a quantidade deve ser
435 monitorada, já que interfere diretamente na atividade enzimática do organismo
436 vegetal (Nawaz et al., 2022; Mellis et al., 2017). Nas amostras analisadas neste
437 estudo, apresentou média de 0,23 mg kg⁻¹ e os solos com o tratamento de ME
438 não mostrou diferença estatística nas concentrações que indicasse a
439 diminuição da quantidade de Ni no solo.

440 Por fim, o elemento Cádmiio (Cd) não foi detectado nas amostras de solo
441 deste estudo; porém, quando detectado, pode ser altamente tóxico, neurotóxico
442 e cancerígeno, além de prejudicar significativamente as atividades industriais e

443 agrícolas. É considerado um metal pesado não essencial, é resistente e
444 provoca quadros de intoxicação através do acúmulo nas plantas que pode ser
445 de forma natural ou por meio de resíduos do uso em excesso de praguicidas
446 (Jakovljević et al., 2022; Shaari et al., 2024; Nechytailo et al., 2024).

447 Embora a literatura demonstra que a presença de ME reduza a
448 concentração desses elementos do solo, eliminando resíduos com potencial
449 tóxico, neste estudo, não foram observados a diminuição da quantidade de
450 elementos-traço no solo, isso pode ser justificado com a forma de fabricação da
451 solução de ME, bem como a quantidade de microrganismos presentes no
452 bioproduto e/ou o tempo insuficiente de ação da solução no solo.

453

454 **4. Conclusão**

455 Esse estudo apresentou informações relevantes e de grande impacto
456 para a agricultura natural sobre o uso de Microrganismos Eficientes (MEs). Os
457 resultados indicam que, embora o uso de MEs possa contribuir para a
458 diversidade microbiológica do solo e a redução do uso de praguicidas, é de
459 suma importância que ele seja avaliado e monitorado constantemente.

460 A caracterização de aflatoxina G₂ e a patulina aborda preocupações
461 sobre a segurança e o impacto ambiental do uso desses produtos, uma vez
462 que este pode apresentar características tóxicas, pois a possibilidade de
463 proporcionar maior diversidade microbiológica, aumenta conseqüentemente a
464 concentração de microrganismos desconhecidos e que não apresentam
465 benefícios para a agricultura.

466 Também foi possível concluir que os MEs usados para a redução de
467 elementos-traço no solo e diminuir a quantidade de resíduos gerados pelo uso
468 de praguicidas, não apresentou diferenças estatísticas entre as amostras de
469 solo com o tratamento de ME e sem o tratamento. Tal fato, deve ser levado em
470 consideração e avaliado frente às condições de cultivo e aplicação nas
471 lavouras.

472

473 **5. Conflito de interesses**

474 Os autores não declararam qualquer conflito de interesses.

475

476

477 **6. Agradecimentos**

478 Este artigo faz parte do trabalho da dissertação de mestrado realizada
479 pelo primeiro autor e foi financiado pelo Conselho Nacional de
480 Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Processo nº 313035/2022-
481 9). Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento
482 de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código financeiro 001, bem
483 como ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa [Comcap - UEM] -
484 Ministério da Ciência e Tecnologia (Finep).

485

486 **7. Referências**

- 487 Abd-Elsalam, K. A., Habeeb, M. M., & Asran, A. A. (2023). Effects of cultivar,
488 storage period, and seed-borne fungi on aflatoxin content of cotton seeds.
489 **Summa Phytopathologica**, 49, e257388. [https://doi.org/10.1590/0100-](https://doi.org/10.1590/0100-5405/257388)
490 [5405/257388](https://doi.org/10.1590/0100-5405/257388)
- 491
- 492 Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas T. (2020) Advances in
493 Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. **Foods**, 20, 9(4), 518. doi:
494 [10.3390/foods9040518](https://doi.org/10.3390/foods9040518).
- 495
- 496 Alonso, D. L., Latorre, S., Castillo, E., & Brandão, P. F. B. (2014) Environmental
497 occurrence of arsenic in Colombia: A review. **Environmental Pollution**, v. 186,
498 p. 272-281. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.009>
- 499
- 500 Andrade, F. M. C. (2020) **Caderno dos microorganismos eficientes (E.M.):**
501 **instruções práticas sobre uso ecológico e social do EM**. 3. ed. Viçosa -
502 MG: UFV, IPPDS.
- 503
- 504 Assunção, R. D. V., Cassol, P. C., Granados, S. B., Mafra, Á. L., & Bittencourt,
505 R. F. P. M. (2024). Microbial-inoculated remineralizers as source of potassium
506 and other nutrients. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**,
507 **28**(2), e275193. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v28n2e275193>
- 508
- 509 Ayan, S., Çalışkan, E., ÖZEL, H. B., Çelik, E. N. Y., Yılmaz, E., Gülseven, O., et
510 al. (2022). The influence of effective microorganisms on physiological
511 characteristics of containerized taurus cedar (*Cedruslibani* A. Rich.) seedlings .
512 **CERNE**, 28, e103018. <https://doi.org/10.1590/01047760202228013018>
- 513
- 514 Barghini, A. (2020). Ethnohistoric review of amylolytic fermentation in
515 Amazonia. **Boletim Do Museu Paraense Emílio Goeldi**. Ciências Humanas,
516 15(2), e20190073. <https://doi.org/10.1590/2178-2547-BGOELDI-2019-0073>
- 517
- 518 Bastos, C. N., Vieira, R. F., & Pereira, O. L. (2017). *Fusarium* spp. no controle
519 biológico de fitopatógenos: uma revisão. **Summa Phytopathologica**, 43(1), 1-
520 12.
- 521

522 Bogas, A. C., Cruz, F. P. N., Lacava, P. T., & Sousa, C. P. (2024). Endophytic
523 fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential. **Brazilian**
524 **Journal of Biology**, 84, e258557. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.258557>
525

526 Calvet, R. M., Pereira, M. M. G., Costa, A. P. R., Torres, A. M., & Muratori, M.
527 C. S. (2015). Toxigenic mycobiota and mycotoxins in shrimp feed. **Ciência**
528 **Rural**, 45(6), 1021–1026. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140583>
529

530 Cambrollé, J., García, J. L., Figueroa, M. E., & Cantos M. (2015) Evaluating wild
531 grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, 120, 171-8. doi:
532 10.1016/j.chemosphere.2014.06.044. PMID: 25025740.
533

534 Canteri, M. G., Althaus, R. A., Virgens Filho, J. S., Giglioti, E. A., & Godoy,
535 C. V. (2001) SASM - Agri : Sistema para análise e separação de médias em
536 experimentos agrícolas pelos métodos Scoft - Knott, Tukey e Duncan.
537 **Revista Brasileira de Agrocomputação**, 1(2), 18-24.
538

539 Castro, J. C., Avicola, A. S., Endo, E. H., Silva, M. V., Dias Filho, B. P., &
540 Machinski Jr, M., et al. (2018) Mycotoxigenic potential of *Alternaria alternata*
541 isolated from dragon fruit (*Hylocereus undatus* Haw.) using UHPLC-Qtof-MS.
542 **Postharvest Biology and Technology**, 141, 71-76.
543

544 Correa, L. O., Bezerra, A. F. M., Honorato, L. R. S., Cortez, A. C. A., Souza, J.
545 V. B., & Souza, E. S. (2023). Amazonian soil fungi are efficient degraders of
546 glyphosate herbicide; novel isolates of *Penicillium*, *Aspergillus*, and
547 *Trichoderma*. **Brazilian Journal of Biology**, 83, e242830.
548 <https://doi.org/10.1590/1519-6984.242830>
549

550 Cunha, J. R. B., Santos, F. C. P., Assis, F. G. V., & Leal, P. L. (2016). Cultivo
551 de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase,
552 protease e amilase. **Revista Ceres**, 63(5), 597–604
553 <https://doi.org/10.1590/0034-737X201663050002>
554

555 Garcia, M. V., Moraes, V. M., Bernardi, A. O., Oliveira, M. S., Mallmann, C. A.,
556 Boscardin, J., et al. (2019). Mycological quality of pecan nuts from Brazil:
557 absence of aflatoxigenic fungi and aflatoxins. **Ciência Rural**, 49(6), e20190076
558 <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190076>
559

560 Gomes, J. P. A., Moulin, M. M., Souza, M. N., & Santos Jr, A. C. (2021) Uso de
561 microrganismos eficientes como alternativa para agricultura sustentável: um
562 referencial teórico. **Agroecologia: Métodos e Técnicas para uma Agricultura**
563 **Sustentável**, 5, 340-355.
564

565 Guterres, K., Silva, C., Giordani, C., Matos, C., Athayde, C., Dilkin, P., et al.
566 (2017). Surto de aflatoxicose aguda em cães no município de Pelotas/RS.
567 **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 37(11), 1281–1286.
568 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001100014>
569

570 Habte, G., Hwang, I. M., Kim, J. S., Hong, J. H., Hong, Y. S., Choi, J. Y., et al.
571 (2016) Elemental profiling and geographical differentiation of Ethiopian coffee
572 samples through inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy
573 (ICP-OES), ICP-mass spectrometry (ICP-MS) and direct mercury analyzer

574 (DMA). **Food Chemistry**, 212, 512-520.
575 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.178>
576
577 Hoog, G.S., Cuarro, G.J., Figueras, M.J. (2000). **Atlas of Clinical Fungi**.
578 Second ed. American Society for microbiology, 1126 p.
579
580 Jakovljević, V., Grujić, S., Simić, Z., Ostojić, A., & Radojević, I. (2022) Finding
581 the best combination of autochthonous microorganisms with the most effective
582 biosorption ability for heavy metals removal from wastewater. **Frontiers in**
583 **Microbiology**, 13, 1017372. doi: 10.3389/fmicb.2022.1017372.
584
585 Katsurayama, A. M., & Taniwaki, M. H. (2017). Fungos e aflatoxinas no arroz:
586 ocorrência e significado na saúde do consumidor. **Brazilian Journal of Food**
587 **Technology**, 20, e2017006. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.0617>
588
589 Kobashigawa, E., Corassin, C. H., Franco, L. T., Uliana, R. D., & Oliveira, C. A.
590 F. (2019). Aflatoxins and fumonisins in feed from a broiler operation system
591 from São Paulo state, Brazil. **Ciência Rural**, 49(2), e20180888.
592 <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180888>
593
594 Magalhães Filho, F. J. C., Carvalho, W. S., Pereira, M. A. S., & Ramos, J.
595 (2021). Geotecnologias aplicadas na defesa do meio ambiente em municípios
596 da Rota de Integração Latino-Americana: a atuação do Ministério Público do
597 Estado de Mato Grosso do Sul via Centro Integrado de Proteção e Pesquisa
598 Ambiental, Brasil. *Interações (campo Grande)*, 22(1), 5–18.
599 <https://doi.org/10.20435/inter.v22i1.3040>
600
601 Mellis, E. V., Casagrande, J. C., & Soares, M. R. (2017). Nickel adsorption and
602 desorption in an acricoxisol as a function of pH, ionic strength and incubation
603 time. **Ciência e Agrotecnologia**, 41(1), 32–41. [https://doi.org/10.1590/1413-](https://doi.org/10.1590/1413-70542017411020116)
604 [70542017411020116](https://doi.org/10.1590/1413-70542017411020116)
605
606 Moreno-Gordaliza, E.; Marazuela, M. D.; Gómez-Gómez, M. M. (2023) Risk
607 assessment of silver and microplastics release from antibacterial food
608 containers under conventional use and microwave heating. **Food Chemistry**,
609 420, 136097.
610
611 Nawaz, H., Ali, A., Saleem, M. H., Ameer, A., Hafeez, A., Alharbi, K., Ezzat, A.,
612 et al. (2022). Comparative effectiveness of EDTA and citric acid assisted
613 phytoremediation of Ni contaminated soil by using canola (*Brassica napus*).
614 **Brazilian Journal Biology**, 82, e261785. [https://doi.org/10.1590/1519-](https://doi.org/10.1590/1519-6984.261785)
615 [6984.261785](https://doi.org/10.1590/1519-6984.261785)
616
617 Nechytailo, L., Danyliv, S., Kuras, L., Shkurashivska, S., & Buchko, A. (2024).
618 Dynamics of changes in cadmium levels in environmental objects and its impact
619 on the bio-elemental composition of living organisms. **Brazilian Journal of**
620 **Biology**, 84, e271324. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.271324>
621
622 Prestes, I. D., Rocha, L. O., Nuñez, K. V. M., & Silva, N. C.C. (2019). Principais
623 fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. **Scientia**
624 **Agropecuaria**, 10(4), 559-
625 570. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.13>

626
627 Ribeiro, M.C., & Soares, M.M.S.R., (2005). **Microbiologia Prática Roteiro e**
628 **Manual, Bactérias e Fungos**. Fourth ed., São Paulo.
629
630 Şahan, Z., Kutay, H., & Çelik, L. (2021). Influence of Effective Microorganism
631 Supplementation to the Drinking Water on Performance and Some Blood
632 Parameters of Laying Hens Exposed to A High Ambient Temperature. **Brazilian**
633 **Journal of Poultry Science**, 23(1), eRBCA-2020-1351.
634 <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2020-1351>
635
636 Salles, F.J., Paniz, F.P., Batista, B.L., Nardocci, A.C., & Olympio, K.P.K. (2023)
637 Potentially Toxic Elements in Costume Cosmetics Used by Children and Adults
638 Are Associated with Cancer Risk. **International Journal of Environmental**
639 **Research and Public Health**, 20, 531. <https://doi.org/10.3390/ijerph20010531>
640
641 Santos L. F. D., Lana, R. P., Silva, M. C. S. D., Veloso, T. G. R., Kasuya, M. C.
642 M., & Ribeiro, K. G. (2020). Effective microorganisms inoculant: Diversity and
643 effect on the germination of palisade grass seeds. **Anais da Academia**
644 **Brasileira de Ciências**, 92, e20180426. [https://doi.org/10.1590/0001-](https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180426)
645 [3765202020180426](https://doi.org/10.1590/0001-3765202020180426)
646
647 Shaari, N. E. M., Tajudin, M. T. F. M., Khandaker, M. M., Majrashi, A., Alenazi,
648 M. M., Abdullahi, U. A., et al. (2024). Cadmium toxicity symptoms and uptake
649 mechanism in plants: a review. **Brazilian Journal of Biology**, 84, e252143.
650 <https://doi.org/10.1590/1519-6984.252143>
651
652 Silva, B. A., Hayakawa, E. H., & Martins, V. M. (2020). Relação Solo-Relevo no
653 Oeste Do Paraná, Estudo De Caso: Folha Topográfica De Marechal Cândido
654 Rondon, Brasil. **Revista Brasileira de Geomorfologia**, 21(1).
655 <https://doi.org/10.20502/rbg.v21i1.1538>
656
657 Silva, G. B. P., Zanella, C. M., Delatorre, C. A., Chaves, M. S., Martinelli, J. A.,
658 & Federizzi, L. C. (2018). [ARTICLE PARTIAL RETRACTION] Organic acid
659 carriers in tolerance to toxic aluminum in wheat. **Ciência Rural**, 48(10),
660 e20180106. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180106>
661
662 Singh, B. & Singh, K. (2016) Microbial degradation of herbicides.
663 **Critical Reviews in Microbiology**, 42(2), 245-261. [http://](http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2014.929564)
664 dx.doi.org/10.3109/1040841X.2014.929564.
665
666 Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015) Arsenic
667 contamination, consequences and remediation techniques: a review.
668 **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 112, 247-270.
669 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.009>.
670
671 Souza, L. C., Campos, M. L., Reichert, G., & Moura, C. N. (2016) Teores de em
672 solos de três regiões do estado de Santa Catarina. **Revista Ambiente & Água**,
673 11(1), 135–144. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1746>
674
675 Tiecher, T.L., Tiecher, T., Ceretta, C.A., Ferreira, P.A., Nicoloso, F.T., Soriani,
676 H.H., et al. (2016) Physiological and nutritional status of black oat (*Avena*
677 *strigosa* Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and zinc.

678 **Plant Physiology and Biochemistry**, 106, 253-63. doi:
679 10.1016/j.plaphy.2016.05.015.
680
681 Wishart, D.S., Jewison, T., Guo, A.C., Wilson, M., Knox, C., Liu, Y., et al. (2013)
682 Scalbert HMDB 3.0—the human metabolome database in 2013
683 **Nucleic Acids Research**, 41, D801-D807.
684
685 Zerpa, J. A. M., Rincón, M. C., Rincón, D., & Colina, J. A. V. (2017). Efecto del
686 uso de quitosano en el mejoramiento del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.
687 variedad sd20a). **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, 8(2), 151-
688 165. <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/2041>.
689
690 Zheng, X., Wei, W., Zhou, W., Li, H., Rao, S., Gao, L., et al. (2021) Prevention
691 and detoxification of patulin in apple and its products: A review. **Food Research**
692 **International**, 140, 110034. doi: 10.1016/j.foodres.2020.110034.