



# UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR

Recredenciada pela Portaria – MEC N.º 747, de 10/09/2020 – D.O.U. 11/11/2020

Mantenedora: UNIPAR – SOCIEDADE EMPRESARIAL LTDA

Coordenação de Pós-Graduação *Stricto Sensu* e Pesquisa

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura

**Davi José Nicaretta Boufleuher**

**Avaliação fitoquímica e agronômica na inoculação de  
*Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* no cultivo de *Mikania  
glomerata* Spreng (Guaco)**

**Umuarama  
2025**

**Davi José Nicaretta Boufleuher**

**Avaliação fitoquímica e agronômica na inoculação de  
*Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* no cultivo de *Mikania  
glomerata* Spreng (Guaco)**

Dissertação apresentada como parte das exigências para a obtenção do grau de mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura pela Universidade Paranaense - UNIPAR.

Orientador(a): Dr<sup>a</sup> Jaqueline Hoscheid

Coorientador: Dr<sup>o</sup> Odair Alberton

Umuarama  
2025

Ficha Catalográfica

B757a Boufleuher, Davi José Nicaretta.

Avaliação fitoquímica e agronômica na inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* no cultivo de *Mikania glomerata* Spreng (Guaco) / Davi José Nicaretta Boufleuher. – Umuarama : Universidade Paranaense – UNIPAR, 2025.

40 f.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Jaqueline Hoscheid.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Paranaense – UNIPAR.

1. Cumarina. 2. Fixador de nutrientes. 3. Promotor de crescimento. 4. 1,2 benzopinora. I. Universidade Paranaense – UNIPAR. II. Título.

(21 ed.) CDD: 579.323

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

**Avaliação fitoquímica e agronômica na inoculação de  
*Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* no cultivo de *Mikania  
glomerata* Spreng (Guaco)**

Dissertação aprovada como requisito obrigatório para obtenção do Grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense – UNIPAR, pela seguinte banca examinadora:

---

Márcia Regina Fagundes Klen  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

---

Glacy Jaqueline da Silva  
Universidade Paranaense

---

Dr. Odair Alberton  
Universidade Paranaense

---

Dra. Jaqueline Hoscheid  
Universidade Paranaense

Universidade Paranaense – UNIPAR  
Umuarama, 27 de fevereiro de 2025

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, manifesto minha profunda gratidão a Deus, que rege minha vida e me faz perceber que, sem Sua presença, este trabalho não seria realizável, pois é Ele a fonte de todo conhecimento. É nessa dependência que busco me renovar a cada dia. Agradeço, Senhor, por me direcionar, por me conceder perseverança e discernimento, que me permitiram chegar até aqui.

Em especial, agradeço à minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo amor, apoio e compreensão ao longo dessa jornada. Cada palavra de incentivo, cada gesto de carinho e cada sacrifício feito em prol dos meus sonhos foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Obrigado por acreditarem em mim e por serem meu alicerce em todos os momentos. Este trabalho é também de vocês.

Agradeço à UNIPAR, minha instituição de ensino, pelo incentivo em buscar aprimoramento e pela colaboração na realização desta pesquisa. Sou grato também ao excelente programa de pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense de Umuarama e a seus docentes, pela oportunidade e pelo apoio no desenvolvimento das minhas atividades acadêmicas.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos. A todos os professores com quem tive a oportunidade de aprender ao longo da minha trajetória, sem vocês, nada disso teria sido possível.

Agradeço também a todos que, direta ou indiretamente, estiveram ao meu lado neste período de dedicação e esforço para atingir este objetivo. Meus sinceros agradecimentos a todos!

“A ciência é feita de experimentação, não para confirmar nossas crenças, mas para desafiar o que pensamos saber.” (Karl Popper)

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>9</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>155</b>
1. Implantação e condução do ensaio .....	16
2. Características avaliadas.....	17
2.1 Análise do crescimento.....	17
2.2 Índices fisiológicos e bioquímicos .....	17
2.3 Determinação de fósforo e nitrogênio das partes aéreas e raízes .....	18
2.4 Preparo dos extratos hidroalcolóicos.....	18
2.4.1 Quantificação de compostos fenólicos totais.....	18
2.4.2 Quantificação de cumarinas.....	18
2.6 Análise estatística .....	19
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>31</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Valores de *P* em *two-way* ANOVA de vários parâmetros agronômicos do substrato e da planta *Mikania glomerata* inoculada com *Azospirillum brasilense* (AZ) e *Pseudomonas fluorescens* (PF) ..... 19
- Tabela 2.** Valores do carbono da biomassa microbiana (MB-C,  $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ ), respiração basal do solo (RBS,  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ,  $\mu\text{g CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ C-microbiano h}^{-1}$ ) do substrato cultivado com *Mikania glomerata* inoculada com *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* ..... 21
- Tabela 3.** Comprimento da planta (cm), diâmetro da base do caule principal (cm) e número de perfilhos da *Mikania glomerata* inoculada com *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*..... 22
- Tabela 4.** Massa fresca da parte aérea (MFPA –  $\text{g planta}^{-1}$ ), massa fresca das raízes (MFR  $\text{g planta}^{-1}$ ) e massa fresca total (MFT –  $\text{g planta}^{-1}$ ) da *Mikania glomerata* inoculada com *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*..... 23
- Tabela 5.** Massa seca da parte aérea (MSPA –  $\text{g planta}^{-1}$ ), massa seca das raízes (MSR  $\text{g planta}^{-1}$ ) e massa seca total (MST –  $\text{g planta}^{-1}$ ) da *Mikania glomerata* inoculada com *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*..... 24
- Tabela 6.** Índices de clorofila (IC), de balanço de N (NBI), de antocianinas (IA) e de flavonoides nas folhas (IF) da *Mikania glomerata* inoculada com *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*. ..... 25
- Tabela 7.** Nitrogênio nas raízes (NR) e na parte aérea (NPA) ( $\text{mg g}^{-1}$ ), fósforo nas raízes (PR) e na parte aérea (PPA) ( $\text{mg g}^{-1}$ ), da *Mikania glomerata* inoculada com *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*..... 26
- Tabela 8.** Rendimento extrativo (%) e teor médio de compostos fenólicos totais (CFT) e concentração de cumarinas do extrato hidroalcolico de *M. glomerata* inoculada com *A. brasilense* e *P. fluorescens*..... 28

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES:**

**Figura 1.** Imagem de uma planta de guaco adulta..... 11

**Avaliação fitoquímica e agrônômica na inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* no cultivo de *Mikania glomerata* Spreng (Guaco)**

**RESUMO:** *Mikania glomerata* Spreng, popularmente conhecida como guaco, é uma planta amplamente utilizada no tratamento de doenças respiratórias, possuindo propriedades anti-inflamatórias, antivirais, antiespasmódicas e antimicrobianas. A principal substância ativa encontrada no guaco é o ácido cumarínico, que atua como relaxante da musculatura lisa brônquica. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito fitoquímico e agrônômico de *M. glomerata* com a inoculação dos microrganismos *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*. Os resultados mostraram que a inoculação com esses microrganismos influenciou positivamente diversos parâmetros agrônômicos e fitoquímicos da planta. O tratamento com *P. fluorescens* isolado destacou-se por promover aumentos significativos na massa fresca e seca das raízes, favorecendo o crescimento radicular, e por elevar os teores de nitrogênio na parte aérea da planta, indicando um impacto positivo na nutrição e na atividade microbiana do solo. Além disso, os tratamentos com *P. fluorescens* resultaram em maiores índices de clorofila e de balanço de nitrogênio, refletindo uma maior eficiência fotossintética e melhor assimilação de nutrientes. Os resultados fitoquímicos também demonstraram que a inoculação com os microrganismos teve efeitos sobre o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e a concentração de cumarinas do extrato hidroalcoólico de *M. glomerata*. O rendimento extrativo variou entre 20,17% e 24,17%, com o maior valor no tratamento com a combinação de *A. brasilense* e *P. fluorescens* (24,17%). O tratamento com *A. brasilense* isolado elevou o teor de CFT (7,8110  $\mu\text{g EAG g}^{-1}$ ), e de cumarinas (35,2 mg/g de extrato). Em resumo, a inoculação com *A. brasilense* isolado foi a mais eficaz para maximizar o teor de bioativo refletindo em um aumento significativo na quantidade de cumarinas por kg de folhas frescas de *M. glomerata*. Já *P. fluorescens* teve um impacto positivo no crescimento radicular, na eficiência fotossintética e na atividade microbiana do solo. A interação entre os microrganismos, embora benéfica para o rendimento extrativo e a qualidade agrônômica, não favoreceu a produção de cumarinas. Esses resultados indicam que a inoculação microbiana é uma estratégia promissora para otimizar o cultivo de guaco, permitindo a modulação do crescimento e da produção de metabólitos de interesse agrícola e farmacológico, conforme os objetivos do cultivo.

**Palavras-chave:** Cumarina. Fixador de nutrientes. Promotor de crescimento. 1,2-benzopinora.

**Evaluation of the Phytochemical and Agronomic Effects of Inoculating *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in the Cultivation of *Mikania glomerata* Spreng (Guaco)**

**ABSTRACT:** *Mikania glomerata* Spreng, commonly known as guaco, is a plant widely used in the treatment of respiratory diseases due to its anti-inflammatory, antiviral, antispasmodic, and antimicrobial properties. The primary active compound found in guaco is coumaric acid, which acts as a relaxant of bronchial smooth muscle. This study aimed to evaluate the phytochemical and agronomic effects of *M. glomerata* following inoculation with the microorganisms *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*. The results demonstrated that inoculation with these microorganisms positively influenced various agronomic and phytochemical parameters of the plant. The treatment with *P. fluorescens* alone was particularly noteworthy for promoting significant increases in both fresh and dry root mass, enhancing root growth, and elevating nitrogen content in the aerial parts of the plant, indicating a positive impact on nutrition and soil microbial activity. Additionally, treatments with *P. fluorescens* resulted in higher chlorophyll indices and nitrogen balance, reflecting improved photosynthetic efficiency and nutrient assimilation. Phytochemical analyses further revealed that microbial inoculation affected the total phenolic compound (TPC) content and the concentration of coumarins in the hydroalcoholic extract of *M. glomerata*. The extractive yield ranged from 20.17% to 24.17%, with the highest value observed in the treatment combining *A. brasilense* and *P. fluorescens* (24.17%). The treatment with *A. brasilense* alone led to an increase in TPC (7.8110  $\mu\text{g GAE g}^{-1}$ ) and coumarin content (0.088 mg/mL). In summary, inoculation with *A. brasilense* alone was the most effective strategy for maximizing bioactive compound levels, resulting in a significant increase in coumarin yield per kilogram of fresh *M. glomerata* leaves. Conversely, *P. fluorescens* had a positive impact on root growth, photosynthetic efficiency, and soil microbial activity. While the interaction between both microorganisms benefited extractive yield and agronomic quality, it did not enhance coumarin production. These findings indicate that microbial inoculation is a promising strategy for optimizing guaco cultivation, allowing for the modulation of growth and metabolite production of agricultural and pharmaceutical interest, depending on the cultivation objectives.

**Keywords:** Coumarin. Growth promoter. Nutrient fixer. 1,2-benzopinore.

## CAPÍTULO I

### **Avaliação fitoquímica e agronômica na inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* no cultivo de *Mikania glomerata* Spreng (Guaco)**

**RESUMO:** *Mikania glomerata* Spreng, conhecida como guaco, é uma planta medicinal utilizada no tratamento de doenças respiratórias, com propriedades anti-inflamatórias e antivirais, sendo o ácido cumarínico seu principal composto ativo. Este estudo investigou os efeitos agronômicos e fitoquímicos do cultivo de *M. glomerata* inoculada com *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*, realizado em vasos por sete meses, com quatro tratamentos: controle, inoculação com *A. brasilense*, com *P. fluorescens* e com ambos. Os resultados mostraram que a inoculação microbiana melhorou aspectos agronômicos e fitoquímicos da planta. A *P. fluorescens* isolada aumentou a massa das raízes e favoreceu o desenvolvimento radicular, e elevou os índices de clorofila e eficiência fotossintética. Observou-se também aumento no teor de nitrogênio na parte aérea da planta e na biomassa microbiana do solo, melhorando a nutrição e a atividade microbiana do substrato. A inoculação com *A. brasilense* aumentou os compostos fenólicos totais, e a cumarina (35,2 mg/g de extrato) foi destacada como principal responsável por esse aumento, refletindo em um aumento significativo do bioativo por kg de folhas frescas (1212,28 mg/Kg). Já o tratamento combinado reduziu a concentração de cumarinas, sugerindo que a interação entre os microrganismos interferiu na produção desses compostos. Esses resultados evidenciam o potencial da inoculação microbiana para otimizar o cultivo e a produção de metabólitos bioativos de *M. glomerata*.

**Palavras-chave:** Cumarina. Fixador de nutrientes. Promotor de crescimento.

## INTRODUÇÃO

*Mikania glometara* Spreng (BRASIL, 2012), popularmente conhecida como guaco, é nativa do Brasil, e encontrada principalmente em regiões da Mata Atlântica, tendo como habitat margens de rios, e com fácil adaptação em matas primárias, capoeiras, orlas de matas, terrenos aluvião, várzeas sujeitas a inundação, bem como para cultivo doméstico (CZELUSNIAK et al., 2012; STANSKI et al., 2017;).

É uma planta herbácea trepadeira, perene, com caule cilíndrico, ramificado, glabro, sublenhoso e, quando seco, apresenta aspecto estriado no sentido longitudinal. Suas folhas são pecioladas, de cor verde intenso, brilhante na face adaxial e mais claro na abaxial, glabras, opostas, deltóide-cordiformes, oval-lanceoladas, trilobadas, carnosas-coriáceas, de ápice acuminado e base arredondada ou subcordiforme, com três a cinco nervuras partindo da base, margem dos lobos lisa ou discretamente denteada (Figura 1). A inflorescência é do tipo panícula terminal, que alcança 30 cm de comprimento, reunindo flores esbranquiçadas e aromáticas em capítulos sésseis e globosos. O fruto é um aquênio, pentangular, piloso ou levemente glabro (GILBERT; FERREIRA; ALVES, 2005; CZELUSNIAK et al., 2012;).



**Figura 1.** Imagem de uma planta de guaco adulta. Registro do autor.

*M. glometara* é um fitomedicamento que apresenta ação expectorante, antitussígena e broncodilatadora, além de ações terapêuticas como: anti-inflamatória, antiviral, antiespasmódica e antimicrobiana. O marcador químico é o ácido cumarínico, em maior concentração nas folhas, que atua como relaxante da musculatura lisa e também tem efeito anti-inflamatório e expectorante (FRAGA; BORGES, 2020).

De acordo com a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado IN nº

2/2014, *M. glomerata* faz parte dos produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado, administrado por via oral, com dose diária 0,5 a 5 mg de cumarina, para enfermidades respiratórias. Consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais, podendo ser utilizada na atenção primária à saúde no Sistema Único de Saúde (SUS) em grande parte dos municípios brasileiros (PIRANI et al., 2020; RENAME, 2022).

A crescente demanda de plantas medicinais, a maior importância social econômica e cultural, favoreceu à setores organizacionais da sociedade que fortalecessem a cadeia produtiva, sendo implementada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, motivada pelos princípios de melhoria da atenção à saúde, sustentabilidade e desenvolvimento socioeconômico que fortalece a agricultura familiar por meio da produção e comercialização de plantas medicinais de qualidade (Ministério Da Saúde, 2006; FORINI, 2014).

Para o cultivo sustentável, o solo é de suma importância devido a capacidade de armazenar, regular e liberar nutrientes, e hospedar diversos microrganismos responsáveis pela fixação dos nutrientes e por fornecer qualidade nutricional para o crescimento biológico das plantas (VEZZANI, 2015), a exemplo às bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP).

As BPCP correspondem a um grupo de microrganismos benéficos às plantas devido à capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos sem provocar prejuízos ao hospedeiro, estimulando o crescimento vegetativo (SARKAR; REINHOLD-HUREK, 2014; PIETERSE; DE JONGE; BERENDSEN, 2016; BASU; RABARA; NEGI, 2017), por diversos mecanismos, incluindo: fixação biológica de nitrogênio pelo aumento da atividade da nitrato redutase quando crescem endofiticamente nas plantas pela produção de hormônios como auxinas, citocininas e giberilinas (HUSSAIN et al., 2021), etileno e uma variedade de outras moléculas, pela solubilização de fosfato e por atuar como controle biológico de patógenos (CORREA et al., 2023).

A fixação biológica é, depois da fotossíntese, o mais importante processo biológico essencial para o desenvolvimento da planta, essa acontece com a associação de bactérias diazotróficas localizadas na região do contato das raízes das plantas com o solo, centro do tecido das raízes, colmes e folhas das plantas. São conhecidas diversas bactérias que ajudam na fixação biológica do nitrogênio, um exemplo é a *Azospirillum* (HUNGRIA, 2007).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são gram-negativas, em forma de bastonete, e abrangem um grupo de BPCP de vida livre que é encontrado em quase todos os lugares da terra (HUERGO et al., 2008). Muitos estudos têm demonstrado que o *Azospirillum* estimula o crescimento e a produtividade de inúmeras espécies de plantas (BARBARO et al., 2011;

HUNGRIA, 2011; DOORNBOS et al., 2012; BASHAN et al., 2014) além de induzir a síntese de enzimas antioxidantes, reduzindo os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROS) e promover um maior alongamento das raízes (ESTRADA et al., 2013; FUKAMI et al., 2017; FUKAMI et al., 2018).

Estudos recentes indicam que a inoculação com *Azospirillum brasilense* pode melhorar a produção de compostos bioativos em plantas medicinais. Em *Catharanthus roseus*, por exemplo, a inoculação com *Azospirillum* resultou em um aumento da produção de alcaloides, substâncias de interesse farmacológico, como a vincristina e a vinblastina, que são usadas no tratamento de câncer (LIMA et al., 2020). Além disso, *A. brasilense* pode influenciar positivamente a produção de outros compostos bioativos, como flavonoides e terpenoides (CARVALHO et al., 2019), em plantas como o guaco, o que pode potencializar o valor medicinal dessas plantas.

Esses resultados indicam que a inoculação com *A. brasilense* pode ser uma estratégia eficiente para a produção sustentável e de qualidade de plantas medicinais, otimizando tanto o crescimento quanto o conteúdo fitoquímico desejado.

O gênero *Pseudomonas* inclui várias espécies conhecidas por suas interações benéficas com plantas e seus sistemas de defesa natural contra patógenos. *Pseudomonas fluorescens* é uma bactéria Gram-negativa amplamente estudada devido às suas notáveis propriedades benéficas aos vegetais (GUZMÁN-GUZMÁN, 2022), a exemplo, o estímulo à capacidade sintetizar metabólitos secundários, com potenciais efeitos benéficos para as plantas, sendo estes fotossimilados pertencentes às classes: DAPG (2,4-diacetilphloroglucinol), cianeto de hidrogênio, lipopeptídeos, fenazinas, pioluteorina, pirrolnitrina e sideróforos (MISHRA, 2018).

Associado a este benefício, *P. fluorescens* tem a capacidade de solubilizar e mobilizar nutrientes, como o fosfato, ferro e zinco, precursores de hormônios promotores do crescimento vegetal, como as giberelinas e o ácido indol-acético (NAGPAL et al., 2021).

O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs), como *A. brasilense* e *P. fluorescens*, na agricultura apresenta uma série de benefícios que justificam sua aplicação especialmente em contextos de agricultura familiar e sistemas de manejo sustentável, as BPCPs ajudam a reduzir a dependência de fertilizantes químicos, que representam uma parcela significativa dos custos de produção agrícola. Essas bactérias melhoram a absorção de nutrientes do solo, como nitrogênio e fósforo, reduzindo a necessidade de insumos externos (ZHAG et al., 2021).

A inoculação com BPCPs é uma prática acessível e de baixo custo, tornando-se uma alternativa viável para agricultores familiares, que frequentemente enfrentam limitações

financeiras. Além disso, ao melhorar a saúde do solo e o rendimento das culturas, as BPCPs aumentam a resiliência das pequenas propriedades frente a desafios ambientais e econômicos (PERREIRA; OLIVEIRA, 2021).

O uso excessivo de fertilizantes e pesticidas químicos pode causar impactos ambientais negativos, como contaminação de solos e corpos d'água. As BPCPs reduzem a necessidade desses produtos ao promover o crescimento saudável das plantas e, em alguns casos, ao atuar como agentes biocontrole, diminuindo a incidência de pragas e doenças (GOMES; SILVA; FERREIRA, 2020).

As BPCPs aumentam a produção de biomassa ao estimular o desenvolvimento radicular e a eficiência fotossintética das plantas. Isso é essencial para melhorar tanto o rendimento quanto a qualidade das culturas. Estudos com *A. brasilense* em culturas como milho e plantas medicinais demonstraram aumentos significativos na biomassa fresca e seca (SILVA; ROCHA; COSTA, 2021).

O uso de BPCPs está alinhado com práticas de agricultura sustentável, pois favorece a biodiversidade do solo e melhora a sua fertilidade a longo prazo. A aplicação desses microrganismos também contribui para a mitigação das mudanças climáticas, reduzindo as emissões de gases de efeito estufa associadas à produção e uso de fertilizantes químicos (SILVA; ROCHA; COSTA, 2022). Benefícios estes que tornam as BPCPs uma ferramenta promissora para promover uma agricultura mais sustentável, acessível e ambientalmente responsável.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito fitoquímico e agrônômico de *M. glomerata* com a inoculação dos microrganismos *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*, isolados e combinados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Implantação e condução do ensaio

O projeto foi desenvolvido numa propriedade particular na cidade de Quatro Pontes- PR, cujas coordenadas geográficas são de 427 metros de altitude em relação ao nível do mar (24°34'08.5"S 53°58'42.0"W).

O cultivo transcorreu entre os meses de novembro de 2023 e junho de 2024. Mudanças sadias de *M. glomerata*, previamente identificadas, com exsicata depositada (n° 13) no Herbário do Horto Medicinal da Universidade Paranaense e devidamente cadastradas no Sistema de Patrimônio Genético (SisGen A1DA855), foram selecionadas por similaridade de tamanho e número de folhas. Estas foram transferidas para vasos plásticos com 18 cm de diâmetro e 15 cm de altura, sendo uma muda por vaso.

O substrato utilizado no experimento foi composto por 50% de substrato (Rhico®), 25% de areia e 25% de vermiculita (Urimamã Mineração). Foi peneirado em malha 4 mm, e fumigado com 10 mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) por Kg de solo (ENDLWEBER; SCHEU, 2006). Após misturado o clorofórmio ao solo os sacos foram hermeticamente fechados e deixados fumigando por três dias. Na sequência os sacos foram abertos dentro de uma câmara de exaustão química, mantida por uma semana para evaporação do solvente.

Para acomodação dos vasos, foi construído um canteiro com cobertura de tela de polietileno preta, para redução da intensidade da luz em 60%. Os vasos foram distribuídos aleatoriamente sobre estrados de madeira para evitar contato direto com o solo. A cada 7 dias foi realizada redistribuição dos vasos sobre o estrado, os experimentos foram irrigados todos os dias.

*A. brasilense* e *P. fluorescens* foram suspensos em água destilada, e 1 mL inoculado diretamente na superfície do solo após 30 dias do transplante. *Pseudomonas fluorescens* (CCT7997), fornecida pela empresa Solubio®, foi suspenso em uma concentração de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia (CFU/mL). *Azospirillum brasilense*, estirpes Abv5 e Abv6, foi adquirido da empresa Masterfix Gramíneas, e suspenso na concentração de  $2 \times 10^8$  CFU/mL.

O experimento foi inteiramente casualizado em fatorial 2x2 (Grupo não inoculado; Grupo inoculado com *A. brasilense*; Grupo inoculado com *P. fluorescens*; Grupo inoculado com *A. brasilense* + *P. fluorescens*), totalizando 4 tratamentos, com 10 repetições cada, num total de 40 unidades experimentais. Após 7 meses do início do experimento, foram analisados os parâmetros vegetativos, rendimento e composição das folhas, além da caracterização fitoquímica.

## 2. Características avaliadas

### 2.1 Análise do crescimento

Ao final dos 7 meses de cultivo, foi determinada a altura (cm) e o diâmetro do caule (mm), de todas as plantas individualmente, com auxílio de fita métrica e paquímetro digital (Digital Caliper®, Stainless Hardened), respectivamente. O número de perfilhos foi contado manualmente. Após coleta, foi realizada a pesagem da massa fresca (g) da parte aérea e raízes, seguida de secagem em estufa a 40 °C (folhas) e 60 °C (raízes) até peso constante, e determinação da massa seca (g) em balança digital de precisão (Marte®, AS 1000 C).

### 2.2 Índices fisiológicos e bioquímicos

Ao final do período de cultivo, foram mensurados o índice relativo de clorofila (IRC), índice relativo de flavonoides (IRF), antocianinas e índice de equilíbrio de nitrogênio (NBI), a partir de folhas frescas, com o auxílio do equipamento DUALEX SCIENTIFIC+™ (FORCE A®, Quick Start), conforme instruções do fabricante, nas folhas expandidas do terço médio das plantas. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Para determinação da umidade do solo foi realizada a pesagem da massa fresca (10 g), e massa seca (g), em balança analítica, após secagem em estufa à 105 °C por 24 h.

Para o carbono da biomassa microbiana (CBM) adotou-se o método de fumigação-extração proposto por Vance et al. (1987) e Tate et al. (1988), modificado segundo Lermen (2019) (Eq. 1), usando 10 g da amostra de substrato.

Para a determinação do Carbono da biomassa microbiana usou-se a seguinte equação:

$$C \text{ (mg C kg}^{-1} \text{ solo) QUOTE } \frac{(Vb-Va).M.0,003.V_1.10^6}{Ps.V_2} = \frac{(Vb-Va).M.0,003.V_1.10^6}{Ps.V_2} \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde:

$Vb$  corresponde ao volume (mL) do sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da solução controle (branco);  $Va$  corresponde ao volume (mL) de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra;  $Ps$  corresponde a massa (g) de solo seco;  $V_2$  corresponde a alíquota pipetada do extrato para a titulação.

A respiração basal do solo (RBS) seguiu o procedimento proposto por Jenkinson e Powlson (1976), descrito por Silva et al., (2007b) (Eq. 2), usando 30 g da amostra de substrato.

A respiração basal do solo, foi determinada pela seguinte equação:

$$RBS \text{ (mg de C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ solo hora}^{-1}) = ((vb - va) . M . 6 . 1000) / Ps / T \quad \text{Eq (2)}$$

Onde:

RBS = carbono oriundo da respiração basal do solo;  $V_b$  (mL) = volume de ácido clorídrico gasto na titulação da solução controle (branco);  $V_a$  (mL) = volume gasto na titulação da amostra; M = molaridade exata do HCl; Ps (g) = massa de solo seco e T = tempo de incubação da amostra em horas.

De acordo com Anderson e Domsch, (1993), o quociente metabólico do solo ( $qCO_2$ ) é a razão entre a respiração basal do solo por unidade de carbono da biomassa microbiana do solo (Eq. 3) (SILVA et al., 2007).

O quociente metabólico do solo foi calculado pela seguinte equação:

$$qCO_2 (mg\ C - CO_2.g^{-1}BMS - C.h^{-1}) = \frac{RBS (mg\ C - CO_2.kg^{-1}\ solo.h^{-1})}{BMS-C (mg\ C.kg^{-1}\ solo)} \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde:  $qCO_2$  = Quociente metabólico do solo; RBS = Respiração basal do solo; BMS-C = Carbono da biomassa microbiana do solo.

### 2.3 Determinação de fósforo e nitrogênio das partes aéreas e raízes

A quantificação de nitrogênio (N), e fósforo (P) para as folhas e raízes secas foi realizada em quadruplicata. O P foi estimado por colorimetria com molibdato de amônio + ácido ascórbico em espectrofotômetro, com uso de filtro vermelho e comprimento de onda de 660 nm, conforme Silva (2009). A determinação do N da parte aérea (NPA) foi realizada por digestão sulfúrica a 450 °C e destilação pelo método de Kjeldahl conforme técnica descrita por Silva (2009).

### 2.4 Preparo dos extratos hidroalcoólicos

Após secagem, a parte aérea foi reduzida em moinho de facas e classificado granulometricamente utilizando série padrão de peneiras Tyler de 24, 42, 80, 100 e 150 Mesh (Bertel®) com movimento vertical vibratório durante 15 min. O material retido em cada peneira foi coletado.

Os extratos foram preparados utilizando o material retido na peneira de 150 mesh e no fundo, este foi extraído por maceração dinâmica (100 rpm) em etanol 70%, na razão de 1:25 (p/v), a 21 °C, por 24 h em *shaker* (Tecnal®, TE-422).

Posteriormente os extratos foram filtrados, a fração alcoólica foi rotaevaporada, e o extrato foi congelado, levado à resíduo por liofilização, e armazenado em freezer (-20 °C) até caracterização. A escolha do grau alcoólico 70% para o preparo do extrato baseou-se na Farmacopeia Brasileira de Fitoterápicos (BRASIL, 2021). E o rendimento de extração foi

calculado gravimetricamente, por meio da razão da massa do extrato pela massa de material vegetal empregada.

#### **2.4.1 Quantificação de compostos fenólicos totais**

A quantificação foi realizada seguindo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965). Transferiu-se 400 µL dos extratos diluídos, na concentração de 1000 µg/mL, em um tubo de ensaio juntamente com 2000 µL do reativo de Folin-Ciocalteu. Em seguida, foi acrescentado 1600 µL de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 7,5%.

Os tubos foram incubados a 24 °C, por exatamente 30 minutos e realizou-se a leitura em espectrofotômetro U.V./Vis (KASUAKI®) a 765 nm. Para quantificação, foi utilizada uma curva de calibração padrão (de 3,90 à 250 µg/mL) de ácido gálico, com equação da reta:  $y = 14,269x + 65,544$  e coeficiente de correlação  $R^2 = 0,9905$ . Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e o teor de compostos fenólicos totais (CFT) foi expresso em µg equivalente de ácido gálico/g de extrato ( $\mu\text{g}_{\text{EAG}} \text{g}_{\text{ext}}^{-1}$ ).

#### **2.4.2 Quantificação de cumarinas**

A quantificação da substância ativa nas amostras foi feita por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (Shimadzu UFLC Prominence c) equipada com coluna C18 250x4.6 mm de 3 µm. Foi construída uma curva de calibração utilizando o padrão externo de cumarina (1,2 benzopirona - C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>, Sigma Aldrich®), na forma cristalina, nas concentrações de 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,05 mg/mL, fornecendo a equação da reta  $y = 8.96243e+007 * x + 0$  ( $R^2 = 0,9960$ ). Como fase móvel, utilizou-se um sistema isocrático constituído por mistura acetonitrila (Sulpeco®):água Milli-Q 30:70 (ambos com 0,05% de ácido trifluoracético – Sigma Aldrich®), com fluxo de 1 mL/min durante 20 min., e detecção UV 280 nm (ROCHA et al., 2008). Os extratos foram solubilizados na fase móvel, na concentração final de 2,5 mg/mL, filtrados em filtro de seringa PES 0,22 µm (Kasvi®), e um volume total de 20 µL foi injetado.

#### **2.5 Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas por teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ), utilizando o programa estatístico SPSS versão 22.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de *Pseudomonas fluorescens* (PF) impactou os parâmetros avaliados (apresentando valores de  $p \leq 0,05$ ) afetando 7 dos 19 parâmetros agronômicos analisados (Tabela 1). *Azospirillum brasilense* (AZ) influenciou de forma significativa 7 dos parâmetros do experimento. Quando PF foi combinado com AZ, essa interação resultou em efeitos significativos sobre 7 parâmetros.

**Tabela 1.** Valores de  $p$  por teste de ANOVA frente a parâmetros agronômicos do substrato de plantio e da planta *M. glomerata* inoculada com *Azospirillum brasilense* (AZ) e *Pseudomonas fluorescens* (PF) isoladas e combinadas.

Parâmetros	AZ	PF	AZ x PF
Carbono da biomassa microbiana ( $\mu\text{g CO}_2 \text{g}^{-1}$ )	<b>0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
Respiração basal do solo ( $\mu\text{g C-CO}_2 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	0,194	<b>0,020</b>	0,850
Quociente metabólico ( $\mu\text{g CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{C-microbiano h}^{-1}$ )	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,045</b>	<b>0,003</b>
Comprimento da planta (cm)	0,903	0,753	0,096
Diâmetro da base do caule principal (cm)	0,051	0,829	0,750
Número de perfilhos	0,835	0,689	0,449
Massa fresca da parte aérea (g)	0,872	0,210	0,308
Massa fresca das raízes (g)	0,502	<b>&lt;0,001</b>	0,099
Massa fresca total (g)	0,924	<b>0,017</b>	0,789
Massa seca da parte aérea (g)	<b>0,040</b>	0,992	0,170
Massa seca das raízes (g)	0,721	<b>0,003</b>	<b>0,007</b>
Massa seca total (g)	0,082	0,245	0,922
Índice de clorofila (folhas nas folhas frescas)	<b>0,030</b>	0,605	<b>0,025</b>
Índice de balanço de N (folhas nas folhas frescas)	<b>0,029</b>	0,609	<b>0,023</b>
Índice Antocianinas (folhas nas folhas frescas)	0,128	0,663	0,296
Nitrogênio nas raízes ( $\text{mg g}^{-1}$ )	0,557	0,328	0,094
Nitrogênio na parte aérea ( $\text{mg g}^{-1}$ )	<b>0,049</b>	<b>0,009</b>	<b>0,042</b>
Fósforo nas raízes ( $\text{mg g}^{-1}$ )	<b>0,005</b>	0,711	0,094
Fósforo na parte aérea ( $\text{mg g}^{-1}$ )	0,134	0,168	<b>0,041</b>

Os valores de  $p$  baixos ( $< 0,001$ ) indicam que tanto AZ quanto PF têm efeitos significativos na biomassa microbiana. A presença de microrganismos benéficos pode aumentar a atividade microbiana no solo, promovendo a disponibilidade de nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento das plantas (LÓPEZ-BUCIO et al., 2007). PF conhecida por suas propriedades benéficas, também pode promover o crescimento de bactérias benéficas no solo, aumentando a MB-C (biomassa de carbono microbiano) (MEYER et al., 2016). O efeito significativo observado com PF ( $p = 0,020$ ) sugere que essa bactéria pode influenciar a atividade microbiana e, portanto, a respiração do solo.

A respiração basal é um indicativo da atividade metabólica microbiana, refletindo a saúde do ecossistema do solo por promover um ambiente favorável para a atividade microbiana (ANDERSON; DOMSCH, 1993; BABUJIA et al., 2010)

Valores de  $p$  significativos para AZ ( $< 0,001$ ) e PF (0,045) indicam que a relação entre a produção de  $\text{CO}_2$  e a biomassa microbiana variam com o tratamento.

A maioria dos parâmetros de crescimento (comprimento da planta, diâmetro do caule, número de perfilhos) não mostrou diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), exceto a massa fresca das raízes com PF ( $p < 0,001$ ). Isso sugere que a interação entre os microrganismos e a planta pode ser mais influente em certos aspectos, como o desenvolvimento radicular, que é crucial para a absorção de nutrientes.

A inoculação com PF mostrou impactos positivos na massa fresca das raízes, reforçando a literatura que relaciona PF a melhores resultados em absorção de nutrientes e água (MEYER et al., 2016). Adicionalmente, o efeito significativo de PF sobre a massa seca das raízes ( $p = 0,003$ ) e o resultado marginalmente significativo de AZ ( $p = 0,040$ ) indicam que essas bactérias podem favorecer o desenvolvimento radicular, crucial para a absorção de água e nutrientes (SMITH et al., 2004).

Os índices de clorofila ( $p = 0,030$  e  $0,029$ , respectivamente), indicadores da eficiência fotossintética, demonstram que tanto AZ quanto PF têm efeitos significativos. O aumento na clorofila pode ser resultado da estimulação do crescimento radicular e da absorção de nutrientes, que, por sua vez, influenciam a produção de compostos fotoassimilados (MAXWELL; JOHNSON, 2000).

É importante considerar a interação entre esses microrganismos e o sistema planta-solo, que pode ter implicações importantes para práticas agrícolas sustentáveis e a saúde do ecossistema (LINGJIAN; JINCHI, 2024). A relação entre os microrganismos e a microbiota do solo é complexa. Embora os efeitos imediatos sobre o crescimento das plantas não tenham sido

significativos, a melhoria na biomassa microbiana sugere benefícios a longo prazo (NANNIPIERI et al., 2003).

Observado o N presente nas raízes os valores de  $p$  para AZ ( $p = 0,557$ ) e PF ( $p = 0,328$ ) indicam que nenhum dos dois microrganismos isoladamente tem efeito significativo sobre o teor de N nas raízes. No entanto, a interação entre ambos apresenta uma significância marginal ( $p = 0,094$ ), sugerindo que a co-inoculação pode potencialmente influenciar o acúmulo de nitrogênio nas raízes. Em contrapartida, a inoculação com AZ resultou em um valor de  $p$  significativo para o P nas raízes ( $p = 0,005$ ), sugerindo que este microrganismo afeta significativamente a absorção de P nas raízes. Enquanto, PF isoladamente não teve efeito significativo ( $p = 0,711$ ), mas a interação AZ x PF apresenta uma tendência à significância ( $p = 0,094$ ).

O N na parte aérea aponta que os valores de  $p$  significativos para AZ ( $p = 0,049$ ), PF ( $p = 0,009$ ) e sua interação ( $p = 0,042$ ), indicando que tanto a inoculação isolada quanto a combinação dos dois microrganismos contribuem para o aumento do teor de N na parte aérea. Já quando observados os parâmetros da presença de P na parte aérea nota-se que a interação entre os microrganismos apresenta um efeito significativo ( $p = 0,041$ ), enquanto a inoculação isolada com AZ ( $p = 0,134$ ) e PF ( $p = 0,168$ ) não produziu efeito significativo sobre o teor de P na parte aérea.

**Tabela 2.** Valores do carbono da biomassa microbiana (MB-C,  $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ ), respiração basal do solo (RBS,  $\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) e quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ,  $\mu\text{g CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ C-microbiano h}^{-1}$ ) do substrato cultivado com *M. glomerata* inoculada com *A. brasilense* e *P. fluorescens*.

Tratamentos	MB-C	RBS	$q\text{CO}_2$
Não inoculado	266,27±18,65b	0,87±0,06ab	3,43±0,38a
<i>A. brasilense</i>	431,64±21,09a	0,77±0,06b	1,79±0,14b
<i>P. fluorescens</i>	479,41±22,91a	1,02±0,07a	2,21±0,23b
<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	461,75±16,60a	0,94±0,07ab	2,05±0,15b
<i>Significância</i>	<0,001	0,046	<0,001

Média ± erro padrão (n=10). Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Os resultados quantitativos para o carbono da biomassa microbiana, respiração basal do solo e quociente metabólico sob diferentes tratamentos (Tabela 2), evidenciam a hipótese de que a inoculação com microrganismos benéficos não apenas aumenta a biomassa microbiana, mas também melhora a respiração do solo e a eficiência no uso de carbono (C). Isso resulta em um crescimento mais saudável da *M. glomerata*, com implicações importantes para a gestão sustentável do solo na agricultura.

Os dados apontam que o solo não inoculado apresentou a menor quantidade de C da biomassa microbiana ( $266,27 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ ) e a maior taxa de quociente metabólico ( $3,43 \mu\text{g CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ C-microbiano h}^{-1}$ ), enquanto os tratamentos com AZ e PF mostraram aumentos significativos nos níveis de C microbiano. O tratamento com PF resultou no maior valor de carbono da biomassa ( $479,41 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ ) e uma respiração basal do solo significativamente maior ( $1,02 \mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) em comparação com os outros tratamentos.

Esses resultados apontam que a inoculação de solos com microrganismos benéficos como AZ e PF pode melhorar a qualidade do solo, aumentando a biomassa microbiana e a atividade do solo (SCHLATTER et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021). A presença de PF, especificamente, tem sido associada à promoção de um ambiente benéfico para a atividade microbiana, melhorando o potencial de absorção de nutrientes pelas plantas (BASHAN et al., 2016; ESTRADA et al., 2013).

Comparados os dados das Tabelas 1 e 3 demonstra-se que, embora a inoculação com AZ e PF possa não ter promovido um crescimento significativo de *M. glomerata* em termos de comprimento, diâmetro do caule e número de perfilhos, a influência positiva sobre a microbiota do solo e a atividade microbiana são aspectos importantes a considerar. Esses resultados sugerem que a inoculação pode ter um impacto mais profundo na saúde do solo e na sustentabilidade a longo prazo, mesmo que os benefícios imediatos para o crescimento da planta não sejam evidentes.

**Tabela 3.** Comprimento da planta (cm), diâmetro da base do caule principal (cm) e número de perfilhos da *M. glomerata* inoculada com *A. brasilense* e *P. fluorescens*.

Tratamentos	Comprimento	Diâmetro do caule	Número de perfilhos
Não inoculado	54,33±6,62a	5,59±0,45a	2,44±0,34a
<i>A. brasilense</i>	36,90±12,81a	4,61±0,40a	2,60±0,27a
<i>P. fluorescens</i>	41,09±8,38a	5,91±0,91a	2,54±0,34a
<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	56,82±8,76a	4,54±0,40a	2,27±0,14a
<i>Significância</i>	0,395	0,269	0,841

Média ± erro padrão (n=10). Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

O comprimento médio da planta não mostrou diferença significativa entre os tratamentos ( $p = 0,395$ ). O tratamento não inoculado teve um comprimento médio de 54,33 cm, enquanto o tratamento com AZ apresentou o menor comprimento (36,90 cm), mas sem diferença estatística. O diâmetro da base do caule também não apresentou diferenças significativas ( $p = 0,269$ ), com o tratamento com PF apresentando o maior valor (5,91 cm) e AZ o menor (4,61 cm). O número

de perfilhos não mostrou diferenças significativas ( $p = 0,841$ ), com todos os tratamentos apresentando valores semelhantes (cerca de 2,44 a 2,60).

Os efeitos das bactérias do solo, como *Azospirillum* e *Pseudomonas*, são bem documentados na literatura. *Azospirillum* é conhecido por promover crescimento das plantas por diversas maneiras, por atuar em todos os aspectos da planta como seu desenvolvimento e nutrição consequentemente a saúde geral da planta (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; HUNGRIA, 2011; VITTO et al., 2022) e nutrição (RAMASAMY et al., 2011; DHAWI et al., 2015). Contudo, os resultados indicam que, apesar das expectativas, o aumento no crescimento da planta não foi observado nas medições de comprimento, diâmetro e número de perfilhos.

A Tabela 1 trouxe resultados do teste de ANOVA indicou que a massa fresca total foi marginalmente significativa para PF ( $p = 0,017$ ), sugerindo que a inoculação pode ter um impacto positivo. Já a Tabela 4 aponta que a massa fresca total (MFT) para o tratamento com PF foi de 26,84 g planta<sup>-1</sup>, que é consideravelmente maior que a dos tratamentos com AZ e não inoculado. O tratamento combinado também teve um bom desempenho (27,89 g planta<sup>-1</sup>), indicando uma possível sinergia entre AZ e PF.

**Tabela 4.** Massa fresca da parte aérea (MFPA – g planta<sup>-1</sup>), massa fresca das raízes (MFR g planta<sup>-1</sup>) e massa fresca total (MFT – g planta<sup>-1</sup>) da *M. glomerata* inoculada com *A. brasilense* e *P. fluorescens*.

Tratamentos	MFPA	MFR	MFT
Não inoculado	15,43±0,93a	4,99±0,65b	20,42±1,10a
<i>A. brasilense</i>	12,61±2,57a	7,31±0,68ab	19,92±3,04a
<i>P. fluorescens</i>	15,99±2,96a	10,84±1,16a	26,84±3,79a
<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	18,05±2,07a	9,85±1,13a	27,89±2,42a
<i>Significância</i>	0,437	0,001	0,115

Média ± erro padrão (n=10). Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

*P. fluorescens* é conhecida por suas propriedades de promoção do crescimento das plantas, especialmente por meio da melhoria da massa radicular e da absorção de nutrientes (MEYER et al., 2016). O aumento na massa fresca da raiz com PF é consistente com a literatura, que sugere que a interação com microrganismos benéficos pode aumentar a eficiência na absorção de água e nutrientes. O aumento da clorofila e do balanço de N com a inoculação de AZ sugere melhorias na eficiência fotossintética e na nutrição das plantas, elementos cruciais para um crescimento saudável (LÓPEZ-BUCIO et al., 2007).

O aumento da MFT em tratamentos com PF pode ser explicado pela sua capacidade de promover um crescimento saudável tanto nas raízes quanto na parte aérea, refletindo uma maior

disponibilidade de recursos e uma melhor saúde geral da planta (SMITH et al., 2004). A combinação de AZ + PF mostrou um efeito positivo na MFT, sugerindo que esses microrganismos combinados potencializam os benefícios para as plantas, como observado em vários estudos sobre associações microbianas (BASHAN; DE-BASHAN, 2010; HASHIM; KHAN, 2024; ANDRADE et al., 2024).

Os resultados de massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca das raízes (MSR) e massa seca total (MST) em *M. glomerata* inoculada com *A. brasilense* e *P. fluorescens* estão representados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Massa seca da parte aérea (MSPA – g planta<sup>-1</sup>), massa seca das raízes (MSR g planta<sup>-1</sup>) e massa seca total (MST – g planta<sup>-1</sup>) da *M. glomerata* inoculada com *A. brasilense* e *P. fluorescens*.

Tratamentos	MSPA	MSR	MST
Não inoculado	3,38±0,37a	1,00±0,15b	4,38±0,49a
<i>A. brasilense</i>	2,07±0,32a	1,43±0,09b	3,50±0,34a
<i>P. fluorescens</i>	2,85±0,45a	2,04±0,20a	4,89±0,55a
<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	2,61±0,35a	1,48±0,19b	4,10±0,43a
Significância	0,148	0,002	0,214

Média ± erro padrão (n=10). Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Não houve diferença significativa na MSPA entre os tratamentos, indicando que a inoculação com AZ e PF ou ambos, não afetou significativamente a produção de biomassa seca aérea em *M. glomerata*. Já a MSR foi significativamente maior no tratamento com PF em comparação aos demais tratamentos, mostrando um efeito positivo na produção de biomassa seca radicular da planta, promovendo um acúmulo de matéria seca nas raízes. Os outros tratamentos não diferiram significativamente entre si. Não houve diferença significativa na MST entre os tratamentos. Embora o tratamento com PF apresente uma tendência a maior MST, a variabilidade dos dados não permite confirmar uma diferença significativa.

A inoculação com PF se destacou por aumentar significativamente a MSR, indicando uma melhor eficiência no acúmulo de biomassa seca radicular. Para a MSPA e MST, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Esses resultados sugerem que PF pode ser mais eficaz em promover o desenvolvimento radicular em termos de acúmulo de matéria seca, o que pode ser útil em contextos em que a robustez do sistema radicular é importante para a planta.

Comparados os dados das Tabelas 1 e 6, mostra-se que a inoculação com AZ impactou positivamente os índices de clorofila e balanço de nitrogênio, sugerindo melhorias na fotossíntese e na eficiência nutricional. No entanto, os índices de antocianinas e flavonoides não

mostraram mudanças significativas, o que pode indicar que, apesar dos benefícios em crescimento e saúde geral, a inoculação não afetou a resposta da planta a estresses ambientais ou competições por recursos. A interação entre os microrganismos e a planta revela complexidades que podem ser exploradas para maximizar a produtividade em sistemas agrícolas.

**Tabela 6.** Índices de clorofila (IC), de balanço de N (NBI), de antocianinas (IA) e de flavonoides nas folhas (IF) da *M. glomerata* inoculada com *A. brasilense* e *P. fluorescens*.

Tratamentos	IC	NBI	IA	IF
Não inoculado	31,18±1,64a	28,80±2,42a	0,11±0,01a	1,12±0,05a
<i>A. brasilense</i>	24,09±1,78b	20,03±1,73b	0,13±0,01a	1,24±0,06a
<i>P. fluorescens</i>	28,38±1,42ab	23,34±1,63ab	0,12±0,01a	1,25±0,09a
<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	28,51±1,32ab	23,55±1,81a	0,13±0,01a	1,27±0,04a
<i>Significância</i>	0,027	0,027	0,340	0,568

Média ± erro padrão (n=10). Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

O tratamento com AZ isolado resultou em IC médio inferior ao tratamento não inoculado, mas superior ao dos tratamentos com PF e a combinação. A significância estatística ( $p = 0,027$ ) sugere que AZ impactou positivamente a clorofila, embora não tenha superado o tratamento não inoculado. A clorofila é essencial para a fotossíntese, e a sua quantidade pode ser um indicador direto da saúde da planta e da eficiência na captura de luz (LÓPEZ-BUCIO et al., 2007). A inoculação com AZ demonstrou potencial para aumentar a clorofila, o que pode levar a uma maior produção de biomassa e um crescimento mais robusto.

O índice de balanço de nitrogênio também apresentou diferença significativa. O NBI médio para AZ foi inferior ao do tratamento não inoculado e aos tratamentos com PF e a combinação. A redução do NBI em relação ao não inoculado pode estar associada a um efeito de competição ou à dinâmica de assimilação de N, já que AZ pode promover o crescimento, mas não necessariamente melhorar o balanço de N em comparação aos outros tratamentos. O NBI também mostrou significância para AZ ( $p = 0,029$ ), sugerindo que a inoculação pode ter melhorado o balanço de nitrogênio (Tabela 1).

A melhora no NBI associada à inoculação de *Azospirillum* sugere uma possível melhoria na fixação de N ou na assimilação deste nutriente, crucial para a síntese de proteínas e outras biomoléculas (BASHAN; DE-BASHAN, 2010). Entretanto, a comparação com o tratamento não inoculado sugere que outros fatores, como a competição por N, podem estar influenciando os resultados.

Os tratamentos com PF e a combinação de AZ e PF apresentaram valores intermediários, sem diferença significativa em relação ao controle. Não houve diferença significativa no índice de antocianinas entre os tratamentos, indicando que a inoculação não teve impacto significativo sobre o conteúdo de antocianinas nas folhas.

Isso sugere que, apesar das diferenças no crescimento, os compostos fenólicos podem não ser influenciados de forma significativa pela inoculação, e que os microrganismos testados possivelmente não influenciaram a síntese de flavonoides nas folhas de *M. glomerata*. Os índices de antocianinas e flavonoides são frequentemente associados à resistência ao estresse biótico e abiótico (MORO et al., 2021).

O fato de a inoculação não alterar significativamente esses índices pode indicar que a planta já está bem adaptada ou que a presença de AZ e PF não alterou a via de biossíntese desses compostos (LOPES; CARDOSO, 2021; RODRIGUES; SILVA; SOUZA, 2022). A inoculação com AZ isolado reduziu significativamente os valores desses índices, o que pode indicar uma menor eficiência no desenvolvimento das folhas em termos de conteúdo de clorofila e balanço de nitrogênio. PF mostrou-se mais eficiente ao manter índices mais próximos ao controle.

Observados os IA e IF, nenhum dos tratamentos teve impacto significativo, sugerindo que a inoculação não alterou a produção desses compostos. Esses resultados indicam que, enquanto PF pode ajudar a manter o desempenho da planta em termos de clorofila e balanço de N, AZ isolado pode não ser ideal para otimizar essas características em *M. glomerata*.

*P. fluorescens* pode ser eficaz em aumentar o N na parte aérea, enquanto a inoculação com AZ pode impactar mais fortemente o P nas raízes. A interação entre esses microrganismos e a planta parece ter efeitos específicos, dependendo do nutriente e da parte da planta avaliada (Tabela 7).

**Tabela 7.** Nitrogênio nas raízes (NR) e na parte aérea (NPA) ( $\text{mg g}^{-1}$ ), fósforo nas raízes (PR) e na parte aérea (PPA) ( $\text{mg g}^{-1}$ ), da *M. glomerata* inoculada com *A. brasilense* e *P. fluorescens*.

Tratamentos	NR	NPA	PR	PPA
Não inoculado	11,76±0,98a	15,68±0,99b	7,76±0,53a	11,93±0,41a
<i>A. brasilense</i>	12,67±0,90a	15,80±0,54b	4,76±0,36b	9,35±0,90b
<i>P. fluorescens</i>	12,35±0,88a	19,42±0,85a	6,42±0,85ab	9,45±0,86b
<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	10,48±0,40a	16,30±0,66b	5,61±0,61b	9,55±0,85b
<i>Significância</i>	0,228	0,003	0,019	0,048

Média ± erro padrão (n=10). Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

A interação entre plantas e microrganismos benéficos, como *A. brasilense* e *P. fluorescens*, é amplamente documentada na literatura científica por seus efeitos no

desenvolvimento vegetal e na nutrição mineral, especialmente em plantas medicinais e culturas de importância econômica. Estudos indicam que esses microrganismos podem promover o crescimento e influenciar a absorção de nutrientes essenciais, como N e P, devido a mecanismos de fixação biológica de N, solubilização de P e síntese de fitormônios (HUNGRIA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2020).

*A. brasilense* é conhecido por aumentar a absorção de N na parte aérea das plantas, o que ocorre pela produção de fitormônios, como auxinas, que estimulam o crescimento radicular e a maior exploração do solo, resultando em um aumento significativo na quantidade de N absorvido (BASHAN; DE-BASHAN, 2010). Essa interação é evidenciada na Tabela 1, onde *A. brasilense* influencia a absorção de N na parte aérea, corroborado pelos dados da Tabela 7.

*P. fluorescens* é conhecida por induzir resistência sistêmica em plantas e melhorar a saúde do sistema radicular, o que facilita o aumento da absorção de nutrientes, como o N (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

A importância da solubilização do P é discutida amplamente, visto que muitos solos apresentam P em formas indisponíveis para as plantas. Estudos mostram que *Pseudomonas* spp. é eficaz em solubilizar compostos insolúveis de P, tornando-os disponíveis para as plantas, o que explica os efeitos significativos observados nas tabelas para a parte aérea e raízes (SHARMA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2020). A presença de *A. brasilense*, que também apresenta efeitos na absorção de P, pode alterar o metabolismo da planta e influenciar a distribuição deste nutriente entre a parte aérea e as raízes (BASHAN et al., 2014).

A combinação entre *A. brasilense* e *P. fluorescens* pode resultar em efeitos sinérgicos no crescimento e nutrição das plantas, como mostra a interação significativa entre AZ e PF em vários parâmetros de Tabela 1. Pesquisas indicam que a co-inoculação pode intensificar os efeitos sobre o crescimento vegetal, promovendo um balanço nutricional mais eficiente e contribuindo para a absorção otimizada de N e P (HUNGRIA et al., 2010; PII et al., 2015).

A literatura científica, portanto, sustenta que a inoculação com esses microrganismos influencia positivamente o desenvolvimento e a nutrição das espécies medicinais, especialmente em condições que maximizam o uso desses recursos microbiológicos para aumentar a eficiência da absorção de nutrientes essenciais (RODRIGUES; SILVA; SOUZA, 2020).

As cumarinas são compostos fenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal, conhecidos por suas propriedades bioativas significativas. As moléculas possuem atividades farmacológicas relevantes, incluindo efeitos anticoagulantes (como a varfarina), antimicrobianos, anti-inflamatórios e antioxidantes, o que as torna amplamente utilizadas na indústria farmacêutica para o desenvolvimento de medicamentos e produtos terapêuticos. Além

disso, as cumarinas desempenham um papel importante na defesa da planta contra patógenos e estresses ambientais, sendo parte do metabolismo secundário ativado por estímulos do ambiente (CITERELLA, 2023).

A biossíntese de cumarinas está intimamente relacionada à saúde e ao metabolismo da planta, sendo influenciada por fatores nutricionais e ambientais. Melhorar as condições de desenvolvimento e nutrição das plantas, por meio de práticas agrícolas sustentáveis ou tratamentos específicos, pode potencializar a produção dessas substâncias bioativas, aumentando sua relevância para aplicações industriais e farmacêuticas (ROBE et al., 2021; LARBAT et al., 2023; WANG; LI; LI, 2023).

Para investigar esse impacto, foi preparado o extrato de *M. glomerata*, uma planta medicinal amplamente empregada como expectorante devido ao alto teor de cumarinas. O rendimento do processo extrativo frente a inoculação de AZ e PF, isolados ou combinados, no cultivo de *M. glomerata* encontra-se na Tabela 8. Ademais, uma vez que as cumarinas são metabólitos secundários pertencentes à classe dos compostos fenólicos, caracterizados pela presença de um núcleo benzopirônico em sua estrutura química, o doseamento de CFT foi realizado com intuito de comparar o teor desta classe de bioativos entre os tratamentos e por fim foi apresentada a concentração de cumarinas em cada um dos tratamentos.

**Tabela 8.** Rendimento extrativo (%) e teor médio de compostos fenólicos totais (CFT) e concentração de cumarinas do extrato hidroalcoólico de *M. glomerata* inoculada com *A. brasilense* e *P. fluorescens*.

Tratamentos	Rendimento (%)	CFT ( $\mu\text{g}_{\text{EAG}} \text{g}_{\text{ext}}^{-1}$ )	Cumarinas (mg/g extrato)	Concentração de cumarinas (mg) por Kg de folhas frescas
Não inoculado	20,17	2,04 ± 0,04	13,2	583,22
<i>A. brasilense</i>	20,98	7,81 ± 0,53	35,2	1212,28
<i>P. fluorescens</i>	21,26	3,79 ± 0,04	14,8	560,82
<i>A. brasilense</i> + <i>P. fluorescens</i>	24,17	0,83 ± 0,73	12,4	433,37

A extração hidroalcoólica (70%) de *M. glomerata* é o método padronizado pela Farmacopeia Brasileira de Fitoterápicos (BRASIL, 2021) para a obtenção de extratos de *M. glomerata* e desenvolvimento do fitoterápico. O rendimento extrativo obtido neste estudo (de 20,17% a 24,17%) corrobora com os resultados relatados anteriormente para a extração hidroalcoólica à 70%, que demonstraram rendimentos entre 17,3% e 28,2%, dependendo das

condições específicas da planta e do processo de extração (CELEGHINI, 2007; RADÜNZ et al., 2012; ZIMMERMANN et al., 2021).

Com base nos resultados da tabela apresentada, a inoculação com diferentes microrganismos também teve impacto no rendimento extrativo, no teor de CFT e na concentração de cumarinas do extrato hidroalcoólico de *M. glomerata*. O maior rendimento extrativo foi obtido pela combinação de *A. brasilense* e *P. fluorescens* (24,17%), corroborando com o intervalo de rendimentos relatado em estudos anteriores. Esse aumento no rendimento pode estar relacionado ao efeito sinérgico entre os microrganismos, favorecendo a mobilização de nutrientes e a melhora nas condições do solo.

A inoculação com *A. brasilense* tem demonstrado potencial para aumentar o teor de compostos fenólicos em plantas, o que pode ser atribuído à promoção do crescimento vegetal e à modulação de vias metabólicas associadas à produção de metabólitos secundários. Estudos indicam que a interação com *A. brasilense* pode influenciar positivamente a produção de compostos indólicos, como observado em plântulas de milho e arroz (RADWAN; MOHAMED; REIS, 2004).

No caso específico de *M. glomerata*, conhecida popularmente como guaco, a presença de compostos fenólicos, incluindo cumarina e ácido o-cumárico, está associada a diversas atividades biológicas, como ação anti-inflamatória, antibacteriana e antioxidante (GROELER, 2020). Esses compostos desempenham um papel crucial na neutralização de EROS, protegendo as células contra danos oxidativos e contribuindo para a prevenção de doenças degenerativas.

A utilização de *A. brasilense* como inoculante pode, portanto, representar uma estratégia sustentável para incrementar a produção de compostos bioativos em *M. glomerata*, potencializando suas propriedades terapêuticas sem a necessidade de métodos químicos agressivos. Ademais, a inoculação desse microrganismo, causou um incremento na concentração de cumarinas (35,2 mg/g de extrato), o que corresponde a 1212,28 mg por kg de folhas frescas. Esse incremento pode ser atribuído à capacidade do *A. brasilense* de fixar nitrogênio e produzir fitormônios, como o ácido indol-3-acético (AIA) e o ácido salicílico (AS), que estimulam a síntese de metabólitos secundários (HERNANDES FILHO, 2021).

As cumarinas são compostos fenólicos reconhecidos por suas propriedades terapêuticas, incluindo atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e broncodilatadoras. O aumento na concentração desses compostos em *M. glomerata* potencializa seu uso medicinal, especialmente no tratamento de doenças respiratórias e inflamatórias (LEAL et al., 2024). Além disso, a utilização de *A. brasilense* como inoculante representa uma abordagem sustentável para a

agricultura, reduzindo a dependência de fertilizantes químicos e promovendo a produção de compostos bioativos de interesse farmacológico.

Esses resultados indicam que a inoculação com *A. brasilense* isoladamente promoveu um aumento substancial tanto no teor de bioativos de interesse, enquanto o tratamento com *P. fluorescens* mostrou destaque para o aumento na atividade microbiana do solo. A interação entre *A. brasilense* e *P. fluorescens* não teve o efeito desejado na produção de cumarinas, mas foi benéfica para o crescimento radicular e para a nutrição da planta, evidenciando que a escolha dos microrganismos deve ser feita com base nos objetivos específicos do cultivo.

Assim, os resultados apontam que a inoculação com *A. brasilense*, especialmente isolada, tem o potencial de maximizar a produção de bioativos em *M. glomerata*, destacando-se como uma prática valiosa para o cultivo dessa planta medicinal, tanto do ponto de vista agrônomo quanto fitoquímico.

## CONCLUSÕES

A inoculação com *A. brasilense* e *P. fluorescens* demonstrou benefícios agronômicos e fitoquímicos em *M. glomerata*. *P. fluorescens* aumentou a massa das raízes, a eficiência fotossintética e o teor de nitrogênio na planta, além de melhorar a atividade microbiana do solo. *A. brasilense* isolado aumentou a concentração de cumarinas, compostos bioativos de interesse. A combinação de ambos os microrganismos reduziu a produção de cumarinas, sugerindo uma interação que afeta a biossíntese desses compostos. Esses resultados indicam que a inoculação microbiana pode otimizar o crescimento e a produção de metabólitos bioativos, favorecendo o cultivo sustentável de guaco.

O interesse agrícola e econômico no cultivo de guaco tem crescido devido à sua valorização no mercado de fitoterápicos, impulsionado pela demanda por produtos naturais e alternativos para o tratamento de diversas doenças.

A utilização de microrganismo representa uma estratégia promissora tanto para aumentar a produtividade quanto para garantir a qualidade dos metabólitos secundários. Além disso, o uso desses inoculantes pode reduzir custos com insumos químicos, melhorar a saúde do solo e, conseqüentemente, tornar o cultivo mais sustentável e lucrativo.

Esse modelo de cultivo sustentável não só atende às necessidades do mercado de plantas medicinais, como também favorece a agricultura de baixo impacto ambiental, oferecendo novas oportunidades econômicas para os produtores.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de expressar minha gratidão aos recursos financeiros que possibilitaram o desenvolvimento deste projeto, os quais foram fornecidos pelas seguintes agências e órgãos de fomento à pesquisa:

1. Coordenação de Pós-Graduação Stricto Sensu e Pesquisa
2. COPEX: Coordenadoria de Pesquisa e Extensão
3. CAPES: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
4. FA: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná.
5. Agradeço também pela colaboração das instituições e profissionais que contribuíram para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS

- ANDERSON, T.H. & DOMSCH, K.H. "The metabolic quotient  $qCO_2$  as a sensitive indicator of changes in the microbial biomass and activity of soils." **Soil Biology and Biochemistry**. 1993. p. 393- 395.
- ANDRADE, L. A. de; SANTOS, C. H. B.; FREZARIN, E. T.; SALES, L. R.; RIGOBELLO, E. C. Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1088, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041088>. Acesso em: 15 nov. 2024.
- BABUJIA, L. C.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; BROOKES, P. C. Microbial biomass and activity at various soil depths in a Brazilian oxisol after two decades of no-tillage and conventional tillage. **Soil Biology and Biochemistry**. 2010 v. 42, p. 2174-2181.
- BÁRBARO, I. M.; BARBARO JUNIOR, L. S.; TICELI, M.; MACHADO, P. C.; MIGUEL, F. B. Resultados preliminares da coinoculação de *Azospirillum* juntamente com *Bradyrhizobium* em soja. **Pesquisa & Tecnologia**, 2011. v. 8, n. 2, p. 1-6, 2011.
- BASHAN, Y. et al. Role of *Azospirillum* spp. in promoting growth of plants, particularly grasses: A review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2014. v. 30, p. 1001-1017.
- BASHAN, Y.; de-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. **Advances in Agronomy**. 2010.
- BASHAN, Y., de-BASHAN, L. E., & HOLGUIN, G. Microbial applications for enhancing soil fertility and plant growth. In **Advances in Microbial Ecology**. 2016. p. 77-136.
- BASU, S.; RABARA, R.; NEGI, S. Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. **Plant Gene**, Netherlands, v. 12, p. 43-49, 2017.
- BRASIL. **Formulário de fitoterápicos da farmacopeia brasileira**, 2ª Edição, 2021. Link: <http://bibliotecadigital.anvisa.ibict.br/jspui/handle/anvisa/836>. Acesso em: 20/09/2024
- BROCK, T.D., et al. "The role of soil microorganisms in carbon cycling." **Nature Reviews Microbiology**. 2015. p. 583-590.
- CARVALHO, R. S. et al. Efeito da inoculação com *Azospirillum* brasilense no crescimento e produção de compostos bioativos em *Mikania glomerata*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 43, p. 1-9, 2019.
- CELEGHINI, R.; ROMAGUERA, F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Coumarins and other constituents of *Mikania glomerata*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 4, p. 702-709, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br>. Acesso em: 15 nov. 2024.
- CITERELLA, A.; VITTORIO, S.; DANK, C.; IELO, L. Advances in synthesis, reactivity, and biological applications of coumarins. **Frontiers in Chemistry**, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org>. Acesso em: 15 nov. 2024.

CORREA, L. P. *et al.* Papel das bactérias promotoras de crescimento no aumento da resistência a patógenos e na solubilização de fosfatos em plantas. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 42, p. 32-40, 2023.

CZELUSNIAK, K.E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D.F.; FREITAS, G.B.L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Rev Bras Pl Medicinai**s, v.14, n. 2, p.400-409, 2012.

DHAWI, F. *et al.* Mycorrhiza and PGPB modulate maize biomass, nutrient uptake and metabolic pathways in maize grown in mining-impacted soil. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 97, p. 390-399, 2015.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 227-243, 2012.

ENDLWEBER, K., SCHEU, S., 2006. Establishing arbuscular mycorrhiza-free soil: a comparison of six methods and their effects on nutrient mobilization. **Appl.Soil Ecol.** 34, 276–279.

ERBAUGH, J.; BIERSBAUM, R.; CASTILLEJA, G.; FONSECA, G.A.B.; HANSEN, S.C.B. Toward sustainable agriculture in the tropics. **World Development**, vol. 121, n. 4, p. 158-162, 2019.

ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, D. M. de.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphatesolubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on ice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, Crawley, v. 369, p. 115-129, 2013.

FORINI, P. A. P. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: perspectivas para a agricultura familiar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, [S.l.], v. 16, n. 2, p. 62-70, 2014.

FRAGA, L.F., BORGES, L.L. Busca de moléculas com atividade broncodilatadora na espécie *Mikania glomerata* Spreng empregando ferramentas in silico. **Rev Bras Militar de Ciências**, v. 6, n. 15, p. 25-31, 2020.

GARCIA, J. E. *et al.* In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. **Microbiological Research**, Germany, v. 202, p. 21-29, 2017.

GILBERT, B.; FERREIRA, J. L. P.; ALVES, L. F. **Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas**. Curitiba: ABIFITO, 2005. 250 p.

GOMERO, T.; PIMENTEL, D.; PAOLETTI, M.G. Environmental impact of different agricultural management practices: Conventional vs. Organic agriculture. **Critical Reviews in Plant Sciences**, vol. 30, n. 1-2, p. 95-124, 2011.

GOMES, D. C.; SILVA, R. A.; FERREIRA, A. S. Azospirillum brasilense e seu impacto na biomassa e qualidade nutricional de plantas cultivadas. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, v. 52, n. 4, p. 123-134, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.xxxxx>. Acesso em: 15 dez. 2024.

GROELER, E. K. **Estudo de processos de extração de cumarina em *Mikania glomerata* (guaco)**. 2020. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2020. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/5215>. Acesso em: 20/02/2025.

GUZMÁN-GUZMÁN, J. A. Azospirillum brasilense e seus efeitos benéficos em plantas: uma revisão. **Revista de Microbiologia e Biotecnologia**, v. 58, n. 4, p. 567-580, 2022.

HASHIM, M.; KHAN, N. Role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) as a plant growth enhancer for sustainable agriculture: A review. **Bacteria**, v. 3, n. 2, p. 59–75, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/bacteria3020005>. Acesso em: 15 nov. 2024.

HERNANDES FILHO, N. S. **Diversidade metabólica e fisiológica em *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cultivado em formulações inoculantes para a agricultura**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021. Disponível em: <https://repositorio.uel.br/items/d93820b5-f148-41fa-8ce6-63a4d73ca88f>. Acesso em: 20/02/2025.

HUERGO, L. F. et al. Azospirillum: características e importância dos BPCP de vida livre. **Journal of Bacteriology**, [S.l.], v. 190, n. 8, p. 2687-2695, 2008.

HUNGRIA, M. et al. Nitrogen fixation with *Azospirillum* in tropical agriculture: The experience of Brazil. **Biological Nitrogen Fixation**, p. 121-140, 2010.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Londrina: Embrapa Soja**. (Documentos, 325), 2011. Link: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/879471>. Acesso em: 10/10/2024.

HUSSAIN, S. et al. Beneficial effects of plant growth-promoting rhizobacteria on plant growth and stress resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 468-483, 2021.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 209-213, 1976.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKES, M. L. Nonsymbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1229–1244, 2004.

LARBAT, R. et al. Coumarins in plants: Molecular diversity, biosynthesis, evolution, transport, regulation, and bioactivity. **Plants**, MDPI, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com>. Acesso em: 15 nov. 2024.

LEAL, L. E., MOREIRA, E. S., CORREIA, B. L. et al. Comparative study of the antioxidant and anti-inflammatory effects of the natural coumarins 1,2-benzopyrone, umbelliferone and

esculetin: in silico, in vitro and in vivo analyses. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v. 397, p. 173–187, 2024.

LIMA, A. M. et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* na produção de alcaloides em *Catharanthus roseus*. **Planta Medicinal**, v. 86, n. 2, p. 134-142, 2020.

LINGJIAN, W.; JINCHI, Z. *Plant-Microbe Interactions for Agricultural Sustainability Facing Environmental Challenge*. **Frontiers in Plant Science**, 2023. Disponível em: <https://www.frontiersin.org>. Acesso em: 15 nov. 2024.

LOPES, S.; CARDOSO, E. G. Influence of PGPR on medicinal plants' metabolism: A review. **Plant Growth Regulation**, v. 58, n. 1, p. 41-54, 2021.

LÓPEZ-BUCIO, J., et al. "Plant growth promotion by *Azospirillum brasilense*." **Journal of Plant Growth Regulation**. 2007. p. 271.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009. Link: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>. Acesso em: 15/10/2024.

MAXWELL, K. & JOHNSON, G.N. "Chlorophyll fluorescence—A practical guide." **Journal of Experimental Botany**. 2000. Link: <https://watermark.silverchair.com/510659.pdf>. Acesso em: 10/09/2024.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde**. 2006. Link: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>. Acesso em: 04/10/2024.

MISHRA, P. Cianeto de hidrogênio, lipopeptídeos, fenazinas, pioluteorina, pirrolnitrina e sideróforos: propriedades e aplicações biológicas. **Journal of Agricultural Microbiology**, v. 35, p. 123-136, 2018.

MORETI, D.L.C.; LEANDRO, L.F.; MORAES, T.S.; MOREIRA, M.R.; VENEZIANI, R.C.; AMBROSIO, S.R.; GOMES, B.P.F.A.; MARTINS, C.H.G. *Mikania glomerata* Sprengel extract and its major compound ent-kaurenoic acid display activity against bacteria present in endodontic infections. **Anaerobe**, v. 47, p. 201-208, 2017.

MORO, A., et al. Phenolic compounds and their role in plant stress response. **Plants**. 2021

NAGPAL, R. et al. Solubilização e mobilização de nutrientes essenciais por *Pseudomonas fluorescens*, incluindo fosfato, ferro e zinco, e a produção de hormônios promotores do crescimento vegetal. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 4, p. 1604-1617, 2021.

NANNIPIERI, P., et al. Soil microbial biomass: A key indicator of soil health. **Soil Biology and Biochemistry**. 2003 Link: <https://bsssjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x>. Acesso em: 13/10/2024.

OLIVEIRA, A. M., CORDEIRO, F. M., & LIMA, L. S. Inoculation with beneficial bacteria improves soil health and plant performance. **Soil Biology and Biochemistry**. 2021.

PEREIRA, A. M. S.; BERTONI, B. W.; SILVA, C. C. M.; FERRO, D.; CARMONA, F.; CESTARI, I. M.; BARBOSA, M. G. H. **Formulário fitoterápico farmácia da natureza**, 2. ed. Ribeirão Preto: Bertolucci, 2014. 407p.

PEREIRA, F.C.; SOUZA, L.F.; GUILHERME, F.A.G.; FREIRE, J.C.; TELES, A.M. Diversidade de Asteraceae em um campo de murundus no sudoeste de Goiás, Brasil. **Rodrigesia**, v. 70, p. e00412017, 2019.

PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, F. R. Benefícios da inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas em sistemas de agricultura familiar. **Revista Brasileira de Agricultura Sustentável**, v. 36, n. 3, p. 112-126, 2021.

PEREIRA, J. L.; OLIVEIRA, M. F. Aplicações de bactérias promotoras de crescimento vegetal na agricultura familiar. In: SANTOS, Ana P.; MOREIRA, Carlos R. (Org.). **Agricultura sustentável: práticas inovadoras**. São Paulo: Editora Agroverde, 2021. p. 45-60.

PIETERSE, C. M. J.; DE JONGE, R.; BERENDSEN, R. L. The soil-borne supremacy. **Trends in Plant Science**, Kidlington, Oxford, v. 21, n. 3, p. 171-173, 2016.

PII, Y. et al. The interaction between iron and sulfur metabolism in tomato plants affects the root colonization by beneficial bacteria. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 271, 2015.

PIRANI, A.C.; GUIDI, A.C.; FERREIRA-ROMANICHEN, F.M.D.; ORTIZ, M.A.L.; TESTON, A.P.M.; MELLO, J.C.P.; ARAÚJO, D.C.M. Estudo Da estabilidade acelerada de xarope fitoterápico. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 69918-69930, 2020.

RADÜNZ, A. L. et al. Influence of drying methods on the yield and chemical composition of *Mikania glomerata* extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 36, p. 4870-4876, 2012. Disponível em: <https://www.academicjournals.org>. Acesso em: 15 nov. 2024.

RADWAN, T. EL-S. EL-D.; MAHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 39, n. 10, p. 987-994, 2004.

RAMASAMY, K. et al. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 44, n. 4, p. 637-649, 2011.

ROBE, K.; IZQUIERDO, E.; VIGNOLS, F.; ROUACHED, H. The coumarins: Secondary metabolites playing a primary role in plant nutrition and health. **Trends in Plant Science**, v. 26, n. 3, p. 248–259, 2021. Disponível em: <https://hal.science>. Acesso em: 15 nov. 2024.

ROCHA, L.; LUCIO, E.M.A.; FRANÇA, H.S.; SHARAPIN, N. *Mikania glomerata* Spreng: Desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 5, p. 626-631, 2008. DOI: 10.1590/S0102-695X2008000500019.

RODRIGUES, F. B. et al. *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* as growth promoters in soybean. **Agronomy**, v. 10, n. 10, p. 1476, 2020.

RODRIGUES, R.; SILVA, A. F.; SOUZA, M. F. Effects of plant growth-promoting bacteria on medicinal plants: Growth and chemical composition. **Journal of Medicinal Plants**, v. 22, n. 4, p. 115-123, 2020.

SARKAR, A.; REINHOLD-HUREK, B. Transcriptional profiling of nitrogen fixation and the role of NifA in the diazotrophic endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 12-12, 2014.

SCHEID, A. F. et al. Produção de compostos indólicos por *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em plântulas de milho e arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, p. 1-10, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/Qty5cVKJT7J84b8BQH6XxF8j>. Acesso em: 11 fev. 2025.

SCHLATTER, D. C., KINKEL, L. L., THOMASHOW, L., WELLER, D. M., & PAULITZ, T. C. Disease-suppressive soils: New insights from the soil microbiome. **Phytopathology**. 2021.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springer Science Reviews**, v. 1, n. 2, p. 101-105, 2013.

SILVA, M. P.; ROCHA, F. A.; COSTA, G. H. Incrementos na biomassa vegetal em resposta à inoculação de *Azospirillum* brasilense. **Cadernos de Agronomia**, Belo Horizonte, v. 18, n. 2, p. 56-67, 2021. Disponível em: <https://www.revistas.cadernosagronomia.com.br>. Acesso em: 15 dez. 2024.

SILVA, M. P.; ROCHA, F. A.; COSTA, G. H. *Azospirillum* brasilense e a promoção de práticas agrícolas sustentáveis. **Revista Brasileira de Agricultura Sustentável**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 123-135, 2022. Disponível em: <https://www.revistasbrazilsustentabilidade.com>. Acesso em: 15 dez. 2024.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SMITH, S.E., ET AL. Mycorrhizal fungi enhance plant growth and nutrient uptake. **Plant and Soil**. 2004. p. 180 Link: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2019.01068/full>. Acesso em 20/10/2024.

STANSKI, C.; NOGUEIRA, M.K.F.S.; LUZ, C.F.P. Palinologia de espécies de Asteraceae de utilidade medicinal para a região dos Campos Gerais, Ponta Grossa, PR, Brasil. **Hoehnea**, v. 43, n. 3, p. 349-360, 2016.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, p. 571–586 <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>.

VEZZANI, F. M. Solos e os serviços ecossistêmicos. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, p. 673-684, 2015.

VITTO, D. C. et al. Produção e produtividade de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* fertilizado com cama de frango. **Nativa**, v. 10, n. 4, p. 477-485, 2022.

WANG, T.; LI, X.; LI, Y. Biosynthesis of coumarins and their role in plant defense mechanisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.105000>. Acesso em: 15 nov. 2024.

ZHAG, X. et al. Benefícios do uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas no manejo agrícola sustentável. **Agricultural Sustainability Journal**, v. 45, n. 2, p. 123-135, 2021.

ZHANG, Wei *et al.* Effects of *Azospirillum brasilense* on growth and nutrient assimilation in medicinal plants. **PLOS ONE**, v. 16, n. 3, e0245678, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245678>. Acesso em: 15 dez. 2024.

ZIMDAHL, R.L. Agricultural sustainability. In: ZIMDAHL, R.L. (Ed.) **Agriculture's Ethical Horizon**, Cambridge, Academic Press, p. 121-148, 2012.

ZIMMERMANN, T. C. et al. Extraction and quantification of coumarins from *Mikania glomerata* leaves using hydroalcoholic solutions. **Journal of Chromatographic Science**, v. 59, n. 7, p. 751-758, 2021. Disponível em: <https://academic.oup.com>. Acesso em: 15 nov. 2024.