



UNIVERSIDADE PARANAENSE – UNIPAR

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

Mantenedora: UNIPAR – SOCIEDADE EMPRESARIAL LTDA.

Coordenação de Pós-Graduação *Stricto Sensu* e Pesquisa

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura

Mariana Moraes Pinc

Rendimento, atividade biológica do óleo essencial e crescimento de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, *Azospirillum brasilense* e à adição de fósforo

**Umuarama
2026**

Mariana Moraes Pinc

Rendimento, atividade biológica do óleo essencial e crescimento de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, *Azospirillum brasilense* e à adição de fósforo

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

Orientador: Prof. Dr. Odair Alberton

Umuarama
2026

Ficha Catalográfica

P647r Pinc, Mariana Moraes.

Rendimento, atividade biológica do óleo essencial e crescimento de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, *Azospirillum brasilense* e à adição de fósforo / Mariana Moraes Pinc. – Umuarama: Universidade Paranaense - UNIPAR, 2026. 102 f.

Orientador: Dr. Odair Alberton.

Tese (Doutorado) – Universidade Paranaense - UNIPAR.

1. Bioprodutos. 2. Citronela. 3. Terpenos. 4. Micorrizas. I. Universidade Paranaense - UNIPAR. II. Título.

(21 ed.) CDD: 584.92

Bibliotecária Responsável Regiane Luiza Campaneli CRB 9/2194

Rendimento, atividade biológica do óleo essencial e crescimento de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, *Azospirillum brasilense* e à adição de fósforo

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

Dra. Silvia Graciele Hülse de Souza

Universidade Paranaense - UNIPAR

Dra. Suelen Pereira Ruiz Herrig

Universidade Paranaense - UNIPAR

Dra. Meire Pereira de Souza Ferrari

Instituto Federal do Paraná - IFPR

Dra. Cristiane Mengue Feniman Moritz

Universidade Estadual de Maringá - UEM

Dr. Odair Alberton

Universidade Paranaense – UNIPAR

Universidade Paranaense – UNIPAR

Umuarama, 2026

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela saúde, sabedoria e força que me sustentaram ao longo desta jornada, guiando meus passos e minha evolução pessoal e profissional.

Ao meu orientador e amigo, Dr. Odair Alberton, registro minha profunda gratidão pela atenção, confiança e dedicação na condução deste trabalho. Sua postura ética, comprometida e competente, serviu de inspiração durante toda a pesquisa. Muito obrigada!

À UNIPAR, minha instituição de ensino, pelo incentivo à busca por conhecimento, pelo suporte na realização desta pesquisa e pela qualidade do Programa de Pós-graduação.

Estendo meus agradecimentos a todos os professores que tive a oportunidade de conhecer ao longo da minha trajetória acadêmica. Cada um contribuiu, de forma singular, para que este momento se tornasse possível.

Agradeço imensamente à professora Dra. Jaqueline Hoscheid, pelo apoio técnico, pela disponibilidade e pela colaboração com materiais e análises que foram essenciais para a finalização deste trabalho.

À minha família, pelo apoio incondicional, pelas orações e pelo incentivo constante. Ao meu marido, Gustavo Henrique de Oliveira de Marchi, por estar ao meu lado em todos os momentos, especialmente nos mais desafiadores. Sua compreensão, força e carinho foram fundamentais para tornar esta caminhada mais leve e gratificante.

À minha companheira diária de laboratório, Mariana Dalmagro, pela parceria, paciência e ajuda. E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este objetivo fosse alcançado, deixo aqui o meu sincero muito obrigada.

SUMÁRIO

Capítulo I: Crescimento de <i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt ex Bor, rendimento e atividade biológica do óleo essencial em resposta à inoculação com fungos micorrízicos sob diferentes doses de fósforo.....	13
1. Introdução.....	14
2. Material e métodos.....	15
2.1 <i>Delineamento experimental.....</i>	<i>15</i>
2.2 <i>Inoculação dos FMAs.....</i>	<i>16</i>
2.3 <i>Densidade de esporos e colonização radicular por FMA.....</i>	<i>16</i>
2.4 <i>Determinação do carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico do substrato</i>	<i>17</i>
2.5 <i>Determinação do índice de clorofila.....</i>	<i>18</i>
2.6 <i>Análises da planta.....</i>	<i>18</i>
2.7 <i>Determinação do fósforo das folhas</i>	<i>18</i>
2.8 <i>Determinação do nitrogênio das folhas.....</i>	<i>19</i>
2.9 <i>Extração, rendimento e identificação química do óleo essencial por CG/EM.....</i>	<i>19</i>
2.10 <i>Ensaio de eliminação do radical DPPH do óleo essencial.....</i>	<i>20</i>
2.11 <i>Ensaio de eliminação de radicais livres ABTS^{•+} do óleo essencial.....</i>	<i>20</i>
2.12 <i>FRAP — Ensaio antioxidante do poder de redução do íon ferro do óleo essencial.....</i>	<i>20</i>
2.13 <i>Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial.....</i>	<i>21</i>
2.14 <i>Análise estatística.....</i>	<i>21</i>
3. Resultados e discussão.....	22
3.1 <i>Densidade de esporos, colonização radicular por FMAs, carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico do substrato.....</i>	<i>23</i>
3.2 <i>Biomassa aérea e radicular.....</i>	<i>24</i>
3.3 <i>Número de perfilhos, altura da planta, índice de clorofila e diâmetro do caule.....</i>	<i>26</i>
3.4 <i>Fósforo e nitrogênio da parte aérea.....</i>	<i>27</i>
3.5 <i>Heat map, combinado com o agrupamento hierárquico e Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando parâmetros do substrato e da planta.....</i>	<i>29</i>

3.6	<i>Identificação química do óleo essencial por CG/EM.....</i>	30
3.7	<i>Rendimento do óleo essencial e caracterização química dos compostos majoritários da citronela.....</i>	32
3.8	<i>Capacidade antioxidante do óleo essencial.....</i>	34
3.9	<i>Atividade antimicrobiana do óleo essencial.....</i>	35
3.10	<i>Heat map combinado com o agrupamento hierárquico e Análise de Componentes Principais (PCA) com base no rendimento do óleo essencial e nos compostos majoritários.....</i>	37
4	Conclusão.....	39
	Referências.....	40
	Capítulo II: Rendimento, atividade biológica do óleo essencial e crescimento de <i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt ex Bor inoculado com fungos micorrízicos e <i>Azospirillum brasilense</i>.....	50
1.	Introdução.....	51
2.	Material e métodos.....	52
	<i>2.1 Delineamento experimental.....</i>	<i>52</i>
	<i>2.2 Colonização radicular.....</i>	<i>53</i>
	<i>2.3 Carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico.....</i>	<i>54</i>
	<i>2.4 Análises da planta.....</i>	<i>54</i>
	<i>2.5 Teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea.....</i>	<i>54</i>
	<i>2.6 Extração e caracterização química do óleo essencial por CG/EM.....</i>	<i>54</i>
	<i>2.7 Análises antioxidantes.....</i>	<i>55</i>
	<i>2.8 Atividade antimicrobiana do óleo essencial.....</i>	<i>56</i>
	<i>2.9 Análise estatística.....</i>	<i>56</i>
3.	Resultados e discussão.....	57
	<i>3.1 Colonização radicular por FMAs, determinação do carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico do substrato.....</i>	<i>58</i>
	<i>3.2 Número de perfilhos, altura da planta, índice de clorofila e diâmetro do caule.....</i>	<i>60</i>
	<i>3.3 Biomassa aérea e radicular</i>	<i>61</i>
	<i>3.4 Fósforo e nitrogênio da parte aérea.....</i>	<i>62</i>
	<i>3.5 Heat map, combinado com o agrupamento hierárquico e Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando parâmetros do substrato e da planta.....</i>	<i>63</i>

3.6	<i>Identificação química do óleo essencial por CG/EM.....</i>	<i>65</i>
3.7	<i>Rendimento e caracterização química do óleo essencial.....</i>	<i>67</i>
3.8	<i>Capacidade antioxidante do óleo essencial.....</i>	<i>69</i>
3.9	<i>Atividade antimicrobiana.....</i>	<i>70</i>
3.10	<i>Heat map combinado com o agrupamento hierárquico e Análise de Componentes Principais (PCA) com base na atividade antioxidante, rendimento do óleo essencial e nos compostos majoritários.....</i>	<i>72</i>
4.	Conclusão.....	74
3.	Referências.....	75
	Agradecimentos.....	83
	Anexo.....	84

Mariana Moraes Pinc

Rendimento, atividade biológica do óleo essencial e crescimento de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares, *Azospirillum brasilense* e à adição de fósforo

RESUMO: *Cymbopogon winterianus* (Poaceae), popularmente conhecido como citronela, é uma planta nativa de regiões tropicais e subtropicais da Ásia, amplamente cultivada na América do Sul e Central. Embora amplamente utilizado em formulações agroecológicas, repelentes naturais e reconhecido por seu potencial antimicrobiano, antifúngico e anti-inflamatório, o óleo essencial (OE) de citronela ainda apresenta produção limitada frente ao seu elevado potencial de aplicação comercial. Considerando que o fósforo é um dos nutrientes mais limitantes na agricultura, devido à sua baixa difusão no solo e elevada fixação em formas indisponíveis, e que os fertilizantes fosfatados representam parcela significativa dos custos de produção, a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e *Azospirillum brasilense* configura uma alternativa biotecnológica capaz de ampliar a absorção de nutrientes, reduzir a dependência de adubação fosfatada e tornar a produção de OE de citronela mais sustentável e economicamente viável. Este estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o impacto da inoculação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*, combinados a diferentes doses de fósforo (P) e à rizobactéria promotora de crescimento *Azospirillum brasilense*, no crescimento, desenvolvimento e teor de OE de *C. winterianus*. O experimento foi realizado em duas etapas, apresentadas em dois capítulos, com delineamento inteiramente casualizado. No capítulo 1, o delineamento foi fatorial 3x2 (sem e com FMAs) sob adição de dois níveis de P (0 e 200 mg P kg⁻¹), totalizando 48 unidades experimentais. No capítulo 2, o delineamento foi fatorial 4x2 (sem e com os FMAs e *A. brasilense*), totalizando 64 unidades experimentais. Foram avaliadas a densidade de esporos e colonização radicular por FMAs, o carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal, quociente metabólico do substrato (qCO_2), crescimento da planta, atividade antioxidante e antimicrobiana, extração, rendimento e composição do OE. No capítulo 1 os resultados apontaram que a inoculação com *C. etunicatum* sem adição de P promoveu um aumento significativo na biomassa seca da parte aérea e radicular das plantas, maior densidade de esporos e colonização radicular, além de valores superiores de CBM e menor qCO_2 . O maior rendimento de OE foi observado no tratamento com P adicionado ao substrato sem inoculação (1,31%), seguido pelo tratamento com *C. etunicatum* sem adição de P. Os compostos majoritários identificados no OE foram citronelal (47,69–43,87%), geraniol (22,12–18,88%) e citronelol (11,53–10,61%). A atividade antioxidante variou conforme o método, com destaque para não inoculado e *R. clarus* sem P, enquanto a maior atividade antimicrobiana do OE foi observada frente a *Bacillus subtilis*, especialmente em *C. etunicatum* sem P e *R. clarus* com P (CIM 2,5 mg mL⁻¹). No capítulo 2, a coinoculação dos FMAs *R. clarus* + *C. etunicatum* apresentou o melhor desempenho geral entre todos os tratamentos. Esse tratamento promoveu maior biomassa fresca e seca da parte aérea, radicular e total, elevadas taxas de colonização radicular e melhorias nos atributos

microbianos do substrato e na absorção de P pela planta. O mesmo tratamento também apresentou os maiores valores de atividade antioxidante (ABTS⁺ e FRAP). Os compostos majoritários identificados no OE foram citronelal (50,66–38,91%), geraniol (19,71–3,12%) e citronelol (14,21–4,94%), onde o tratamento com a inoculação de *R. clarus* + *C. etunicatum* obteve maior teor de geraniol. Além disso, o OE exibiu atividade antimicrobiana relevante contra *Bacillus subtilis* no mesmo tratamento (*R. clarus* + *C. etunicatum*). De forma integrada, os resultados dos dois capítulos demonstram que os FMAs, isolados ou combinados, desempenham papel determinante no crescimento, no metabolismo secundário e na qualidade do OE de *C. winterianus*. Destaca-se que *C. etunicatum* sem P adicionado ao substrato (capítulo 1) e a combinação de *R. clarus* + *C. etunicatum* (capítulo 2) foram as estratégias mais eficientes, evidenciando o potencial do uso de microrganismos benéficos para reduzir a dependência de fertilizantes, otimizar a produção e obter OEs com maior valor agregado. Esses resultados reforçam os FMAs como ferramentas biotecnológicas promissoras para sistemas sustentáveis de cultivo de plantas aromáticas e medicinais.

Palavras-chave: Bioprodutos. Citronela. Terpenos. Micorrizas.

Mariana Moraes Pinc

Yield, biological activity of essential oil, and growth of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor in response to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi, *Azospirillum brasilense*, and phosphorus addition

ABSTRACT: *Cymbopogon winterianus* (Poaceae), popularly known as citronella, is a plant native to tropical and subtropical regions of Asia, widely cultivated in South and Central America. Although widely used in agroecological formulations and natural repellents and recognized for its antimicrobial, antifungal, and anti-inflammatory potential, citronella essential oil (EO) still presents limited production in relation to its high potential for commercial application. Considering that phosphorus is one of the most limiting nutrients in agriculture, due to its low diffusion in the soil and high fixation in unavailable forms, and that phosphate fertilizers represent a significant portion of production costs, the inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum brasilense* constitutes a biotechnological alternative capable of enhancing nutrient absorption, reducing dependence on phosphate fertilization, and making citronella EO production more sustainable and economically viable. This study was conducted with the objective of evaluating the impact of inoculation with the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) *Rhizophagus clarus* and *Claroideoglossum etunicatum*, combined with different phosphorus (P) doses and the plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense*, on the growth, development, and EO content of *C. winterianus*. The experiment was carried out in two stages, presented in two chapters, under a completely randomized design. In Chapter 1, the design was a 3×2 factorial (without and with AMF) under the addition of two P levels (0 and 200 mg P kg⁻¹), totaling 48 experimental units. In Chapter 2, the design was a 4×2 factorial (without and with AMF and *A. brasilense*), totaling 64 experimental units. Spore density and root colonization by AMF, microbial biomass carbon (MBC), basal respiration, metabolic quotient (*q*CO₂), plant growth, antioxidant and antimicrobial activity, and EO extraction, yield, and composition were evaluated. In Chapter 1, the results indicated that inoculation with *C. etunicatum* without P addition promoted a significant increase in shoot and root dry biomass, higher spore density and root colonization, as well as higher MBC values and lower *q*CO₂. The highest EO yield was observed in the treatment with P added to the substrate without inoculation (1.31%), followed by the treatment with *C. etunicatum* without P addition. The major compounds identified in the EO were citronellal (47.69–43.87%), geraniol (22.12–18.88%), and citronellol (11.53–10.61%). Antioxidant activity varied according to the method, highlighting the non-inoculated treatment and *R. clarus* without P, while the highest antimicrobial activity of the EO was observed against *Bacillus subtilis*, especially in *C. etunicatum* without P and *R. clarus* with P (MIC 2.5 mg mL⁻¹). In Chapter 2, co-inoculation with the AMF *R. clarus* + *C. etunicatum* showed the best overall performance among all treatments. This treatment promoted higher fresh and dry shoot, root, and total biomass, high root colonization rates, and improvements in substrate microbial attributes and plant P uptake. The same treatment also presented the highest antioxidant activity values (ABTS•⁺ and FRAP). The major compounds identified in the EO were citronellal (50.66–38.91%), geraniol (19.71–3.12%), and citronellol (14.21–4.94%), in which the treatment inoculated with *R. clarus* + *C. etunicatum* obtained the highest geraniol content. Furthermore, the EO exhibited relevant antimicrobial activity against *Bacillus subtilis*

under the same treatment (*R. clarus* + *C. etunicatum*). In an integrated manner, the results of both chapters demonstrate that AMF, isolated or combined, play a determining role in growth, secondary metabolism, and EO quality of *C. winterianus*. Notably, *C. etunicatum* without P added to the substrate (Chapter 1) and the combination of *R. clarus* + *C. etunicatum* (Chapter 2) were the most efficient strategies, highlighting the potential of beneficial microorganisms to reduce fertilizer dependence, optimize production, and obtain EOs with higher added value. These results reinforce AMF as promising biotechnological tools for sustainable cultivation systems of aromatic and medicinal plants.

Keywords: Bioproducts. Citronella. Terpenes. Mycorrhizae.

CAPÍTULO I

Crescimento de *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, rendimento e atividade biológica do óleo essencial em resposta à inoculação com fungos micorrízicos sob diferentes doses de fósforo

Normas referentes ao Capítulos I da tese que será submetida à revista Rhizosphere (anexo).

RESUMO:

O cultivo de *Cymbopogon winterianus* (citronela) possui grande importância econômica devido ao óleo essencial (OE), porém sua produtividade é limitada em solos de baixa fertilidade. Este estudo avaliou os efeitos de dois fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*, associados a dois níveis de fósforo (P) (0 e 200 mg P kg⁻¹), sobre o crescimento, atributos microbiológicos do solo e produção de OE. Avaliaram-se colonização radicular, densidade de esporos, carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal (RBS), quociente metabólico do substrato (qCO_2), parâmetros morfofisiológicos, rendimento e composição do OE, além da atividade antioxidante e antimicrobiana. *C. etunicatum* sem P apresentou maior colonização radicular, densidade de esporos, acúmulo de biomassa aérea e radicular, maior CBM e menor qCO_2 . O maior rendimento de OE ocorreu no tratamento com P e sem inoculação (1,31%), porém os FMAs favoreceram o aumento do rendimento em condições de baixo fósforo. Os compostos majoritários do OE foram citronelal (47,96-43,87%), geraniol (22,12-18,88%) e citronelol (11,53-10,61%). A atividade antioxidante variou conforme o método, com destaque para não inoculado e *R. clarus* sem P. O OE apresentou maior atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, especialmente em *C. etunicatum* sem P e *R. clarus* com P (CIM 2,5 mg mL⁻¹). Os resultados demonstram que a inoculação com *C. etunicatum* em condições de baixo fósforo constitui uma estratégia sustentável e promissora para a produção de citronela, permitindo reduzir a dependência de fertilizantes fosfatados e mantendo a qualidade do óleo essencial.

Palavras-chave: Sustentabilidade agrícola, baixo fósforo, citronela, citronelal.

1. Introdução

O uso de óleos essenciais (OEs) tem ganhado destaque devido às suas propriedades biológicas e à ampla aplicação em indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas. Dentre as plantas produtoras de OE, *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor (citronela), pertencente à família Poaceae, destaca-se por sua capacidade de síntese de compostos bioativos, como citronelal, geraniol e citronelol, os principais constituintes do OE dessa espécie (Tavares et al., 2021).

O OE de citronela é reconhecido por suas atividades antimicrobianas e antifúngicas (Rammal et al., 2024), antioxidantes (Rammal et al., 2025), anti-inflamatórias (Ahmed et al., 2020) e biopesticidas (Riaz et al., 2025). Devido a essas características, tem sido amplamente utilizado como matéria-prima na formulação de produtos agroecológicos, repelentes naturais (Sedikelo et al., 2022), cosméticos e farmacêuticos (Munda et al., 2020). Também possui potencial antioxidante para uso em alimentos, retardando processos oxidativos (Juncos et al., 2026). Além disso, teve seu status GRAS (Generally Recognized As Safe) confirmado pelo painel de especialistas da FEMA (Flavor and Extract Manufacturers Association) (Rosol et al., 2023).

No entanto, o rendimento do óleo essencial de citronela pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos, como o manejo nutricional e o uso de técnicas sustentáveis. A nutrição mineral adequada é um dos principais desafios para a obtenção de altos rendimentos agrícolas, destacando-se o fósforo (P) como um nutriente essencial ao crescimento e desenvolvimento das plantas. O P está diretamente envolvido em processos como transferência e armazenamento de energia, metabolismo de carboidratos, divisão celular e transmissão de informações genéticas (Sun et al., 2024). Contudo, sua disponibilidade no solo é frequentemente limitada, uma vez que grande parte do P aplicado é rapidamente fixada, formando compostos pouco solúveis e indisponíveis às plantas, além da dependência de fontes finitas como a rocha fosfática (Battini et al., 2017).

Nesse contexto, o uso de técnicas sustentáveis, como a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), tem se destacado. Esses micro-simbiontes mutualistas estabelecem associações simbióticas com as raízes das plantas, melhorando a absorção de nutrientes, especialmente o fósforo (P), e promovendo o crescimento vegetal (Keymer et al., 2017). Os FMAs também aumentam a resistência das plantas ao estresse ambiental e a patógenos, além de potencialmente aumentar a produção de metabólitos secundários (Zhu et al., 2022). Estudo realizado com *Cymbopogon citratus*, indicou que a inoculação de FMAs pode impactar positivamente o crescimento da planta e a composição de seu OE (da Cruz et al., 2020).

Diante da crescente demanda por práticas agrícolas sustentáveis e procura por produtos naturais, torna-se fundamental investigar como o uso de bioinoculantes e a adubação fosfatada podem contribuir para a produção de OE de citronela de alta qualidade, sem comprometer o meio ambiente. Este estudo é o primeiro a investigar a interação dos FMAs *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum* em diferentes doses de P na produção de OE de *Cymbopogon winterianus*, sendo o objetivo do presente trabalho. Essa abordagem pode ser uma solução promissora para o aumento da produtividade e da qualidade do OE, com impacto direto na sustentabilidade agrícola.

2. Material e métodos

2.1. Delineamento experimental

Uma mistura de aproximadamente 100 kg de 50% de substrato comercial (Humusfertil) e 50% de areia lavada + vermiculita (1:1) foi colocada dentro de sacos plásticos e foram adicionados 10 mL de clorofórmio (CHCl_3) kg^{-1} de mistura. Após bem misturado, o saco com o substrato foi fechado hermeticamente, conforme a metodologia adaptada de Endlweber e Scheu (2006). Decorridos três dias, os sacos foram abertos dentro da câmara de exaustão e após três dias foram utilizados no experimento.

O experimento foi realizado no Horto medicinal da Universidade Paranaense, localizado no município de Umuarama, PR, Latitude 23°47'55" S e Longitude 53°18'48" W, com altitude de 430 m, entre dezembro de 2021 e março de 2022, em um ambiente protegido por sombrite com 50% de sombreamento. A região possui uma temperatura média de 25,3 °C durante o verão (EMBRAPA, 2012) e a precipitação média no período foi de 3,14 mm segundo dados do Sistema de Tecnologia e Monitoramento Ambiental do Paraná (SIMEPAR).

Cymbopogon winterianus está catalogada no herbário do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEM), pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), em Brasília/DF, sob o número de registro 122593 e a atividade foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o número ABD29CF.

Estacas de citronela coletadas no horto medicinal da UNIPAR foram cultivadas por 115 dias na mistura fumigada em vasos de polietileno com capacidade de 2 kg, os quais foram

inoculados e não inoculados com FMA, com ou sem adição de P. A dose de P adicionada foi de 200 mg de P kg⁻¹ de substrato nos tratamentos com adição de P, em comparação aos tratamentos sem adição desse nutriente (Urcoviche et al., 2015). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 8 repetições por tratamento, em um fatorial de 3x2, ou seja, com três tratamentos (não inoculado, *R. clarus*, *C. etunicatum*) e dois níveis de P adicionado (200 e 0 mg P kg⁻¹ substrato), num total de 48 unidades experimentais.

Os tratamentos aplicados foram os seguintes:

1. Substrato fumigado (controle, sem inoculação) - P
2. *Rhizophagus clarus* - P
3. *Claroideoglossum etunicatum* - P
4. Substrato fumigado (controle, sem inoculação) + P
5. *Rhizophagus clarus* + P
6. *Claroideoglossum etunicatum* + P

2.2. Inoculação dos FMAs

Para a inoculação foram utilizados aproximadamente 250 esporos dos FMAs *Claroideoglossum etunicatum* e *Rhizophagus clarus* no momento do transplante, nos respectivos tratamentos (Urcoviche et al., 2015). Ao substrato com adição de P foram adicionados 0,88 gramas de fosfato monopotássico KH₂PO₄ kg⁻¹ de substrato, o que corresponde a 200 mg de P kg⁻¹ de substrato. Nos vasos sem adição de P, foram adicionados 0,38 gramas de cloreto de potássio (KCl). Desse modo, todos os tratamentos tinham aproximadamente a mesma concentração de K no substrato, diferindo unicamente na concentração de P conforme técnica utilizada por Urcoviche et al. (2015).

2.3. Densidade de esporos e colonização radicular por FMA

Após a coleta das plantas, os esporos dos FMAs foram extraídos de subamostras de 10 g de substrato pela metodologia de peneiramento úmido em malha de 0,710 mm e 0,053 mm (Gerdemann e Nicolson, 1963), submetidos à centrifugação em água (3000 rpm por 3 minutos) e em sacarose 50% (2000 rpm por 2 minutos) e novamente peneirado em malha 0,053 mm. Para a

contagem e identificação dos esporos, estes foram transferidos para placas de Petri e contados sob microscópio estereoscópico (40X).

As raízes finas foram amostradas e enxaguadas em água corrente, cortadas no comprimento de 1,5 cm, clareadas com KOH 10%, em banho-maria (90 °C por 50 min.), lavadas e acidificadas com HCl 5% (90 °C por 30 min.), lavadas em água corrente e adicionadas a uma solução de azul de tripano 0,05% (90 °C por 30 min.). Após coradas, as raízes foram preservadas em lactoglicerol até o momento da montagem das lâminas (Phillips e Hayman, 1970). A verificação da percentagem de segmentos colonizados por FMA foi realizada em lâminas, sobrepostas por lamínulas, na qual 100 segmentos foram avaliados por repetição (Giovannetti e Mosse, 1980), sob microscópio óptico (40-100x).

2.4. Determinação do carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico do substrato

A determinação do carbono da biomassa microbiana do substrato (CBM) foi realizada segundo o método de fumigação-extração proposto por Vance et al. (1987) e Tate et al. (1988), usando 10 g da amostra de substrato. Para determinação da CBM utilizou-se a equação 1:

$$C \text{ (mg C kg}^{-1} \text{ substrato)} = \frac{(V_b - V_a) \cdot M \cdot 0,003 \cdot V_1 \cdot 10^6}{P_s \cdot V_2} \quad \text{Equação (1)}$$

Onde C é o carbono extraído do substrato; V_b (mL) é o volume do sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da solução controle (branco); V_a (mL) é o volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra; M é a molaridade do sulfato ferroso amoniacal. V₁ é o volume do extrator sulfato de potássio utilizado; V₂ é a alíquota pipetada do extrato para titulação; 0,0033 é o miliequivalente do carbono; P_s (g) é a massa do substrato seco. Adotou-se K_c = 0,4 como fator de correção, conforme Kaschuk et al. (2010).

A respiração basal do substrato (RBS) seguiu o procedimento proposto por Jenkinson e Powlson (1976). Para determinação da RBS utilizou-se a equação 2:

$$RBS \text{ (mg de C - CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ substrato h}^{-1}) = (((V_b - V_a) \cdot M \cdot 6 \cdot 1000) / P_s) / T \quad \text{Equação (2)}$$

Onde RBS é o carbono oriundo da respiração basal do substrato; V_b (mL) é o volume de ácido clorídrico gasto na solução controle (branco); V_a (mL) é o volume gasto na titulação da amostra; M é a molaridade do HCl; P_s (g) é a massa de substrato seco e T é o tempo de incubação da amostra em horas.

De acordo com Anderson e Domsch, (1993), o quociente metabólico do substrato (qCO_2) é a razão entre a respiração basal do solo por unidade de carbono da biomassa microbiana do solo, e foi calculado utilizando-se a equação 3:

$$qCO_2 \text{ (mg C - CO}_2\text{. g}^{-1}\text{CBM. h}^{-1}\text{)} = \frac{\text{RBS (mg C - CO}_2\text{ kg}^{-1}\text{ substrato.h}^{-1}\text{)}}{\text{CBM (mg C kg}^{-1}\text{ substrato).10}^{-3}} \quad \text{Equação (3)}$$

2.5. Determinação do índice de clorofila

Após o término do ciclo vegetativo da planta (115 dias), foram realizadas as análises de clorofila das folhas por meio de clorofilômetro. Para isto, foram avaliados os teores de clorofila total de 3 folhas completamente desenvolvidas por vaso medindo-se no meio das folhas utilizando-se um clorofilômetro marca ClorofiLOG® modelo CFL 1030, operado conforme as instruções do fabricante (Falker, 2008).

2.6. Análises da planta

Após completar o ciclo vegetativo da planta, estas foram coletadas no período da manhã, e separadas em parte aérea e sistema radicular. Os parâmetros avaliados foram: altura da planta que foi determinada com o uso de fita métrica, diâmetro do caule com uso de paquímetro e número de perfilhos. Uma subamostra de cada planta foi seca em estufa (65 °C, 72 h), pesada em balança digital para determinar a massa seca da parte aérea (MSPA) e a massa seca das raízes (MSR).

2.7. Determinação do fósforo das folhas

Foram pesados em cadinhos, 0,5 g das folhas secas em estufa e trituradas em liquidificador. Em seguida, as amostras foram colocadas em mufla para incineração a 500 °C por 3,5 h. Depois de esfriar, foram adicionados 10 mL de HCl 1 mol L⁻¹ em cada amostra. Os cadinhos foram posicionados em chapa aquecida sob exaustor, a 80 °C por 10 min, para a solubilização total dos elementos. Na sequência, conforme Silva (2009), o P foi estimado por colorimetria com molibdato

de amônio + ácido ascórbico em espectrofotômetro usando filtro vermelho e comprimento de onda de 660 nm.

2.8. Determinação do nitrogênio das folhas

A determinação do teor de nitrogênio na parte aérea (NPA) foi realizada utilizando 0,2 g de folhas secas e moídas, que foram submetidas à digestão sulfúrica em tubos de ensaio a 450 °C. Posteriormente, a análise foi concluída por meio do método de destilação de Kjeldahl (Silva, 2009).

2.9. Extração, rendimento e identificação química do óleo essencial por CG/EM

A técnica utilizada para a extração do OE foi a hidrodestilação, empregando um extrator do tipo Clevenger modificado. Inicialmente, 100 g de folhas e caules frescos foram cortados manualmente com tesoura e, em seguida, misturados com água purificada obtida por osmose reversa. O processo de destilação foi realizado em duplicata por 3 h. Após a extração, o OE puro foi separado e armazenado em frascos âmbar sob refrigeração a 4 °C.

O equipamento foi lavado com hexano para garantir a coleta de possíveis resíduos de óleo, sendo o hexano contendo traços de óleo armazenado separadamente em outro frasco, permitindo a evaporação do solvente em temperatura ambiente. O rendimento do OE em % (m/m) foi determinado somando-se a massa do óleo puro ao resíduo coletado após a evaporação do hexano. A densidade foi considerada para o cálculo final, com base no volume obtido no sistema de extração, conforme descrito por Santos et al. (2009).

A identificação química do OE foi realizada por cromatografia em fase gasosa em equipamento GC-MS QP 2010 SE (Shimadzu). Para cada análise, 10 µL de amostra foram diluídos em 1000 µL de diclorometano (Anidrol) antes de serem injetados em coluna SH-RTx-5MS (Shimadzu, 5% fenilmetilsiloxano, 30 mx 0,25 mm id, 0,25 µm) utilizando injetor automático (Shimadzu AOC-20i). Utilizou-se o hélio como gás de arraste na vazão de 1,0 mL min⁻¹, split de 2:1 e injeção de 1 µL. A temperatura da coluna foi inicialmente programada a 40 °C, aquecendo a 6 °C min⁻¹ para atingir a temperatura final de 300 °C. As temperaturas do injetor e da interface GC-MS foram mantidas a 250 °C. Os espectros de massa foram registrados a 70 eV com intervalo de massa de m/z 50 a 550 amu.

2.10. Ensaio de eliminação do radical DPPH do óleo essencial

A capacidade de eliminação do radical DPPH para cada amostra, na concentração de 1 mg mL⁻¹, foi estimada de acordo com o método de Silveira et al. (2018). Transferindo-se 150 µL de cada amostra de OE para tubos de ensaio e adicionando-se 5,85 mL de solução etanólica de DPPH a 0,06 mM. A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso à temperatura ambiente, no escuro, por 30 min. A leitura da absorbância foi realizada a 515 nm, em espectrofotômetro U.V./Vis (Kasuaki). Álcool etílico foi utilizado como branco. Uma curva de calibração (entre 1000 e 50 µM) foi plotada utilizando Trolox apresentando relação linear descrita pela equação $y = -0,5987x + 647,7$, com $R^2 = 0,9951$. Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e a capacidade de eliminação do radical DPPH foi expressa em µM equivalente de Trolox.

2.11. Ensaio de eliminação de radicais livres ABTS⁺ do óleo essencial

Cada amostra foi preparada na concentração de 1 mg mL⁻¹, de acordo com o método proposto por Re et al. (1999). A curva de calibração foi construída com Trolox (2000–100 µM), apresentando relação linear descrita pela equação $y = -0,2983x + 597,17$, com $R^2 = 0,9951$. Transferiram-se 10 µL de cada OE para tubos de ensaio e adicionou-se 1,0 mL do radical ABTS⁺. A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso à temperatura ambiente, no escuro, por 6 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 734 nm, em espectrofotômetro U.V./Vis (Kasuaki). Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e álcool etílico foi utilizado como branco. A capacidade de eliminação de radicais livres ABTS⁺ foi expresso em µmol de Trolox por grama de OE (µmol Trolox gOE⁻¹).

2.12. FRAP — Ensaio antioxidante do poder de redução do íon ferro do óleo essencial

O ensaio foi realizado utilizando a metodologia de Santos et al. (2016) com modificações. Uma alíquota de 90 µL da amostra na concentração de 1 mg mL⁻¹ foi adicionada com 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP (25 mL de tampão acetato de 0,3 M e pH 3,6; 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM em HCL 40 mM; e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). A mistura foi incubada a 37 °C por 30 min e sua absorbância foi determinada em 595 nm, em espectrofotômetro U.V./Vis (Kasuaki). O reagente FRAP foi utilizado como branco. Para

determinar a capacidade antioxidante, uma curva de calibração para sulfato ferroso (100-2000 μM) foi plotada apresentando relação linear descrita pela equação $y = 0,3243x + 81,517$, com $R^2 = 0,9945$. Os resultados foram apresentados como μmol de Fe^{2+} por g de OE ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{gOE}^{-1}$). As análises foram realizadas em triplicata.

2.13. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial

A concentração inibitória mínima (CIM) do OE de citronela foi determinada em triplicata pelo método de microdiluição (CLSI, 2009), com adaptações para óleos essenciais. Os ensaios foram realizados contra *Bacillus subtilis* (CCCD B005), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (CCCD S007). O OE foi solubilizado em água estéril contendo 1% de Tween 80 e distribuído (100 μL) em microplacas com caldo Brain Heart Infusion (BHI) (100 μL), obtendo-se concentrações finais entre 20 mg mL^{-1} e 0,039 mg mL^{-1} por diluições seriadas.

As suspensões bacterianas foram ajustadas ao padrão 0,5 de McFarland e adicionadas (5 μL poço⁻¹). Tween 80 a 1% foi utilizado como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 36 °C por 24 h, seguidas da adição de 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) e nova incubação por 2 h. A formação de coloração avermelhada foi considerada indicativa de crescimento microbiano.

2.14. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), o erro padrão da média foi calculado e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$), utilizando IBM SPSS Statistics® versão 22. O heat map e a Análise de Componentes Principais (PCA) foram realizados usando o SRplot (Tang et al., 2023).

3. Resultados e discussão

A inoculação por FMAs foi o fator que mais influenciou significativamente as variáveis avaliadas ($p \leq 0,05$), afetando 14 de 19 variáveis. A interação P x FMA influenciou oito variáveis enquanto as doses de P influenciaram cinco variáveis (Tabela 1).

Tabela 1. Valores de p para ANOVA *two-way* das variáveis do solo, planta e de óleo essencial de citronela crescendo sob diferentes doses de P (mg kg⁻¹ no substrato) e inoculados ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*

Variáveis	P	FMA	P x FMA
Esporos (nº de esporos por g ⁻¹ de substrato)	0,006	<0,001	0,011
Colonização radicular por FMA (%)	0,006	<0,001	0,011
Carbono da biomassa microbiana (µg CO ₂ g ⁻¹) – CBM	0,140	<0,001	0,020
Respiração basal do solo (µg C-CO ₂ g ⁻¹ h ⁻¹) – RBS	<0,001	<0,001	0,013
Quociente metabólico (µg CO ₂ µg ⁻¹ C-microbiana h ⁻¹) - qCO_2	0,093	0,022	0,176
Massa fresca da parte aérea (g) – MFPA	0,656	0,002	0,191
Massa fresca raiz (g) – MFR	0,406	0,802	0,094
Massa seca da parte aérea (g) – MSPA	0,920	0,003	0,019
Massa seca da raiz (g) – MSR	0,131	0,278	0,116
Razão da massa seca da parte aérea e raiz (g) – MSPA/R	0,137	0,069	0,800
Número de perfilhos	0,856	0,145	0,050
Altura da planta (cm)	0,212	<0,001	0,929
Diâmetro do caule (mm)	0,600	0,038	0,778
Índice de clorofila – IC	0,166	<0,001	0,769
Teor de P na parte aérea da planta – PPA	<0,001	0,036	0,318
Teor de N na parte aérea da planta – NPA	0,214	0,043	0,178
Eliminação de radicais livre ABTS ^{•+} (µmol Trol g OE ⁻¹)	0,014	0,024	0,002
Eliminação do radical DPPH (µM Trol mg OE ⁻¹)	0,439	0,013	<0,001
Poder de redução do íon ferro (µmol Fe ²⁺ g OE ⁻¹) – FRAP	0,103	0,125	0,087

3.1. Densidade de esporos, colonização radicular por FMAs, carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico do substrato

A densidade de esporos e a colonização radicular por FMA foram significativamente maiores (Tabela 1) nos tratamentos com a inoculação de *C. etunicatum* sem adição de P ao substrato em comparação com as plantas controle não inoculadas e a adição de P não melhorou os índices de forma significativa (Tabela 2).

Tabela 2. Densidade de esporos (número de esporos g⁻¹ de substrato seco), colonização radicular (%), carbono da biomassa microbiana (CBM, µg CO₂ g⁻¹), respiração basal do solo (RBS, µg C-CO₂ g⁻¹ h⁻¹) e quociente metabólico (*q*CO₂, µg CO₂ µg⁻¹ C-microbiana h⁻¹) do substrato com diferentes níveis de P (mg kg⁻¹ no substrato) cultivado com citronela e inoculada ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*.

P	FMA	Esporos	Colonização	CBM	RBS	<i>q</i> CO ₂
	Não inocul.	0,03±0,00c	3,08±0,99c	72,73±12,41c	0,57±0,06e	9,46±1,45a
Sem	<i>R. clarus</i>	0,26±0,02b	26,25±2,76b	119,05±10,92b	0,76±0,06cd	7,02±1,07ab
	<i>C. etunicatum</i>	0,33±0,01a	33,62±1,98a	190,26±16,86a	0,92±0,04bc	5,11±0,47b
	Não inocul.	0,02±0,00c	2,81±0,84c	84,21±6,02bc	0,64±0,07de	7,78±0,79ab
Com	<i>R. clarus</i>	0,24±0,02b	24,50±2,32b	176,50±13,85a	1,22±0,06a	7,10±0,47ab
	<i>C. etunicatum</i>	0,22±0,01b	22,37±1,60b	170,20±16,32a	1,09±0,06ab	6,89±0,79ab

Média ± erro padrão (n=8). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

A presença elevada de P disponível no substrato está associada a uma redução na quantidade de esporos de FMAs. Isso sugere que o conteúdo de P disponível no substrato afeta a produção, sobrevivência e germinação de esporos de FMA (Shrestha et al., 2024). Na simbiose, para que a troca de nutrientes ocorra, os fungos precisam formar estruturas ramificadas (arbúsculos) nas raízes, partindo de dentro das células vegetais (Keymer et al., 2017). Em relação à colonização radicular, podemos observar um aumento expressivo dessas estruturas nas plantas colonizadas sem a adição de P.

Além disso, condições de alto P não são comuns na natureza, e quando há uma quantidade suficiente de P disponível no solo, as plantas não dependem tanto da simbiose com os FMAs para obter esse nutriente, o que pode resultar em diminuição da colonização radicular (Smith et al., 2011).

Na ausência de P adicionado, a maior quantidade para CBM foi observada nas plantas inoculadas com *C. etunicatum*. Por outro lado, com a adição de P ao substrato, *R. clarus* e *C. etunicatum* não diferiram significativamente, enquanto os tratamentos não inoculados apresentaram os menores valores de CBM em ambas as condições (Tabela 2).

Para RBS, o tratamento com *R. clarus* na presença de P apresentou o maior valor, seguido por *C. etunicatum* também com a adição de P. Em relação ao qCO_2 , o tratamento com *C. etunicatum* sem P apresentou o menor valor, enquanto o tratamento não inoculado sem P apresentou o maior valor.

Esses resultados indicam que a interação entre P e a inoculação com FMAs promovem maior atividade microbiana, aumentando a RBS e reduzindo o quociente metabólico (qCO_2), o que sugere maior eficiência no uso de C pelo microbioma do substrato. Resultados semelhantes foram observados por Melato et al. (2024), que investigaram a inoculação de arruda (*Ruta graveolens* L.) com os fungos *R. clarus* e *C. etunicatum* sob diferentes doses de P. Os autores relataram que o CBM e a RBS aumentaram com a inoculação de FMA, enquanto o qCO_2 foi maior em solos não inoculados, indicando maior estresse microbiano.

Araújo et al. (2008) relataram que cultivos com menor biomassa microbiana apresentaram taxas de respiração específicas mais elevadas (qCO_2), indicando um maior consumo de C por unidade de biomassa. Os autores sugerem que essa maior taxa de respiração pode estar associada à menor disponibilidade de nutrientes para os microrganismos. No presente estudo, essa dinâmica parece ser influenciada pela menor quantidade de P disponível.

Um parâmetro associado à biomassa microbiana é a respiração do solo/substrato, que expressa sua atividade biológica. Esse processo é caracterizado pela liberação de CO_2 ou pela absorção de O_2 , resultante das atividades metabólicas realizadas pelos organismos vivos presentes no solo (de Araújo et al., 2012). Solos com alta atividade microbiana geralmente são indicadores de maior saúde e fertilidade do solo.

3.2. Biomassa aérea e radicular

A inoculação de *C. etunicatum* sem adição de P apresentou os maiores valores para MSPA e MSR. Entretanto, para a relação MSPA/R, o tratamento não inoculado sem P obteve o maior resultado (Tabela 3).

Tabela 3. Massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca da raiz (MSR, g), razão da massa seca da parte aérea e raiz (MSPA/R, g), massa fresca da parte aérea (MFPA, g), massa fresca da raiz (MSR, g) de plantas de citronela crescendo sob diferentes doses de P (mg kg⁻¹ de substrato) e inoculada ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*

P	FMA	MSPA	MSR	MSPA/R	MFPA	MFR
	Não inoculado	25,07±1,96c	10,17±0,24b	0,42±0,03a	72,41±4,98c	38,69±3,10a
Sem	<i>R. clarus</i>	28,03±0,67bc	10,40±0,44ab	0,37±0,01ab	88,47±2,54a	46,26±2,58a
	<i>C. etunicatum</i>	31,68±0,55a	11,64±0,79a	0,36±0,02ab	84,19±3,06ab	41,75±1,63a
	Não inoculado	27,41±0,74bc	10,55±0,49ab	0,38±0,01ab	77,69±2,04bc	45,71±2,58a
Com	<i>R. clarus</i>	28,90±0,90ab	9,86±0,17b	0,34±0,01b	85,38±2,12ab	41,64±0,79a
	<i>C. etunicatum</i>	28,23±0,43b	10,08±0,28b	0,35±0,01ab	78,65±2,58bc	44,79±2,06a

Média ± erro padrão (n=8). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

A maior colonização radicular no tratamento inoculado com *C. etunicatum* sem P pode ter contribuído para o desenvolvimento de um sistema radicular mais extenso, aumentando a área de contato com o solo e, conseqüentemente, a eficiência na absorção de nutrientes e água, favorecendo a biomassa radicular. Do mesmo modo, Carneiro et al. (2004) explicam que quanto maior o nível de P, menor é o desenvolvimento da colonização radicular por FMAs, causando diminuição do crescimento da planta.

Em contraste, para as plantas não inoculadas, a MFPA foi significativamente menor em comparação com as plantas inoculadas com os FMAs sendo que o tratamento com *R. clarus* sem adição de fósforo apresentou os maiores valores. Esse resultado pode estar relacionado às diferenças funcionais entre espécies de FMAs, uma vez que *R. clarus* é frequentemente associado à formação de redes de hifas extrarradiculares mais extensas, capazes de ampliar a zona de exploração do solo e aumentar a disponibilidade de fósforo e outros nutrientes para a planta, inclusive por meio da liberação de fosfatases ácidas (Sato et al., 2015). Esse mecanismo tende a favorecer o crescimento da parte aérea, mesmo quando não há incremento proporcional da biomassa radicular, o que pode explicar a ausência de diferenças significativas na MFR entre os tratamentos.

De modo geral, os resultados indicam que a inoculação com FMAs influenciou o crescimento das plantas de citronela de forma dependente da espécie fúngica e da disponibilidade

de fósforo, refletindo diferenças na alocação de recursos entre raiz e parte aérea. A introdução de FMAs no solo pode melhorar a absorção de nutrientes essenciais, como N e P, promovendo maior eficiência fotossintética e acúmulo de biomassa (Chen et al., 2017; Begum et al., 2019). Resultados semelhantes foram observados por Burni et al. (2023), que relataram aumento no crescimento de *Mentha arvensis* inoculada com FMAs associada ao fosfato de rocha e ao esterco orgânico.

Por outro lado, Huang et al. (2023) demonstraram que o efeito positivo da micorrização em *Medicago truncatula* L. foi especialmente favorecido sob condições de baixo teor de P no solo, reforçando que as respostas à inoculação micorrízica variam conforme a combinação entre espécie vegetal, espécie de FMA e nível nutricional do substrato.

3.3. Número de perfilhos, altura da planta, índice de clorofila e diâmetro do caule

O número de perfilhos foi significativamente maior ($p < 0,05$) para as plantas não inoculadas com adição de P (Tabela 1) entretanto, obteve menor altura no mesmo tratamento. Esses resultados sugerem a ocorrência de um efeito compensatório frente à maior disponibilidade nutricional de P, onde a planta direciona recursos para a emissão de um maior número de unidades vegetativas, promovendo a redistribuição de carbono e nutrientes entre os perfilhos, o que limita o crescimento (Tsogtsaikhan et al., 2025). A altura das plantas foi maior nos tratamentos inoculados com *R. clarus* tanto na ausência quanto na presença de P, quando comparadas às plantas não inoculadas e inoculadas com *C. etunicatum* que não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 4).

O índice de clorofila (IC) apresentou variações significativas, com as plantas inoculadas com *R. clarus* cultivadas com P apresentando o maior IC, seguido por *R. clarus* sem P adicionado. As plantas não inoculadas tiveram o menor IC. Em relação ao diâmetro do caule, os tratamentos não inoculados apresentaram os maiores valores, porém não diferiram significativamente de *R. clarus* com e sem P adicionado ao substrato.

Esses resultados indicam que a inoculação com FMAs, especialmente com *R. clarus*, pode promover um crescimento mais robusto nas plantas de citronela, refletindo em parâmetros como altura da planta e IC, sugerindo um estado nutricional mais favorável, embora o efeito no número de perfilhos não tenha sido tão pronunciado. A disponibilidade adequada de P, aliada à simbiose micorrízica, favorece o desenvolvimento das raízes e o crescimento geral das plantas, conforme observado por Pu et al. (2023).

Tabela 4. Número de perfilhos (n), altura da planta (cm), índice de clorofila (IC) e diâmetro do caule (mm) de plantas de citronela cultivadas sob diferentes níveis de P (mg kg^{-1} de substrato) e inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*.

P	FMA	Número de perfilhos	Altura da planta	IC	Diâmetro do caule
	N. inoculado	3,25±0,41ab	133,25±3,84b	26,57±0,86d	10,56±0,52a
Sem	<i>R. clarus</i>	3,38±0,18ab	159,75±3,54a	33,38±1,39ab	9,77±0,55ab
	<i>C. etunicatum</i>	3,50±0,42ab	138,25±3,89b	29,74±1,24bcd	9,06±0,24b
	N. inoculado	4,00±0,18a	129,12±3,93b	28,77±1,24cd	10,00±0,39ab
Com	<i>R. clarus</i>	2,75±0,16b	154,75±1,86a	33,80±1,31a	9,71±0,56ab
	<i>C. etunicatum</i>	3,25±0,16ab	136,00±4,35b	31,58±1,57abc	9,10±0,31b

Média ± erro padrão (n=8). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Ainda, vale destacar que o P é um macronutriente essencial responsável por diversos processos fisiológicos na planta, como a formação de membranas celulares e a produção de complexos orgânicos energéticos (da Costa et al., 2020).

O IC é um dos principais indicadores fitotécnicos que refletem as alterações no comportamento fisiológico das plantas em resposta a fatores externos, como condições climáticas e fertilidade do solo (da Costa et al., 2020). Adicionalmente, Gusmaini e Syakir (2020) relataram que a aplicação de P no solo também aumentou a altura da planta e o número de perfilhos de *Cymbopogon nardus* cultivada em andosol, o que corrobora com os nossos resultados.

3.4. Fósforo e nitrogênio da parte aérea

As médias e erros padrão dos teores de fósforo (PPA) e nitrogênio (NPA) na parte aérea das plantas de citronela estão apresentados na Tabela 5. As médias de P para os tratamentos com *R. clarus* e *C. etunicatum*, quando houve adição de P, diferiram significativamente ($p < 0,05$) (Tabela 1) em relação às plantas não inoculadas com P e aos tratamentos sem a adição de P, onde, nestes últimos, não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 1).

Em relação ao N, nas condições sem P, as plantas inoculadas com *R. clarus* e com *C. etunicatum* apresentaram uma concentração superior às não inoculadas, demonstrando diferença

significativa. Com a adição de P, as plantas não inoculadas e inoculadas apresentaram teores similares de NPA, não diferindo significativamente entre si (Tabela 5).

Tabela 5. Teores de fósforo (PPA) e nitrogênio (NPA) (mg kg^{-1}) na parte aérea de citronela crescendo sob diferentes níveis de P (mg kg^{-1} de substrato) e inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglobus etunicatum*.

P	FMA	PPA	NPA
	N. inoculado	2,79±0,20b	18,45±1,18b
Sem	<i>R. clarus</i>	3,06±0,24b	21,78±0,92a
	<i>C. etunicatum</i>	2,99±0,17b	21,57±1,43a
	N. inoculado	3,37±0,22b	19,26±0,39ab
Com	<i>R. clarus</i>	3,97±0,18a	20,82±0,63ab
	<i>C. etunicatum</i>	4,22±0,21a	18,81±0,68ab

Média ± erro padrão (n=8). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Os resultados indicam que a inoculação com *R. clarus* e *C. etunicatum* pode favorecer a absorção de P nas plantas de citronela, especialmente em condições de alto P, e pode aumentar a absorção de N em condições tanto com alto quanto com baixo P disponível. Na simbiose, as hifas de FMA estendem-se pela rizosfera, abrangendo uma área maior do solo (Mishra et al., 2016). Enquanto a planta fornece carboidratos e lipídios ao fungo, esse, por sua vez, fornece à planta nutrientes minerais (P, N e outros), absorvidos do solo (Keymer et al., 2017), além de uma maior absorção de água (Mishra et al., 2016).

Os resultados para PPA podem ser explicados devido ao aumento da área de superfície fornecida pelo crescimento de hifas de fungos nos tratamentos inoculados com P, o que pode ter possibilitado maior absorção de P quando comparado ao tratamento controle com P adicionado.

Segundo Khalediyani et al. (2021), houveram aumentos expressivos da absorção de P, K, N e outros micronutrientes essenciais em espécies como *Ocimum basilicum* e *Satureja hortensis*, quando inoculadas com *Glomus mosseae* e *Glomus intraradices*, indicando o papel vital dos FMAs na promoção do desenvolvimento vegetal e no acúmulo de metabólitos secundários.

3.5. Heat map, combinado com o agrupamento hierárquico e Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando parâmetros do substrato e da planta

O heat map combinado com agrupamento hierárquico (Figura 1A), revelou perfis distintos entre os tratamentos utilizando parâmetros da qualidade do substrato, densidade e colonização radicular por FMAs, a produção de biomassa da planta, N e P na planta, sendo que não inoculado sem P (na cor rosa), não inoculado com P (na cor verde), formaram um cluster distinto dos demais tratamentos, que formaram outro cluster distinto.

A análise de Componentes Principais (PCA) explicou 82,9% da variância total, com os dois primeiros componentes principais (PC1 = 62,6% e PC2 = 20,3%) distinguindo claramente os não inoculados com adição ou não de P dos outros tratamentos (Figura 1B).

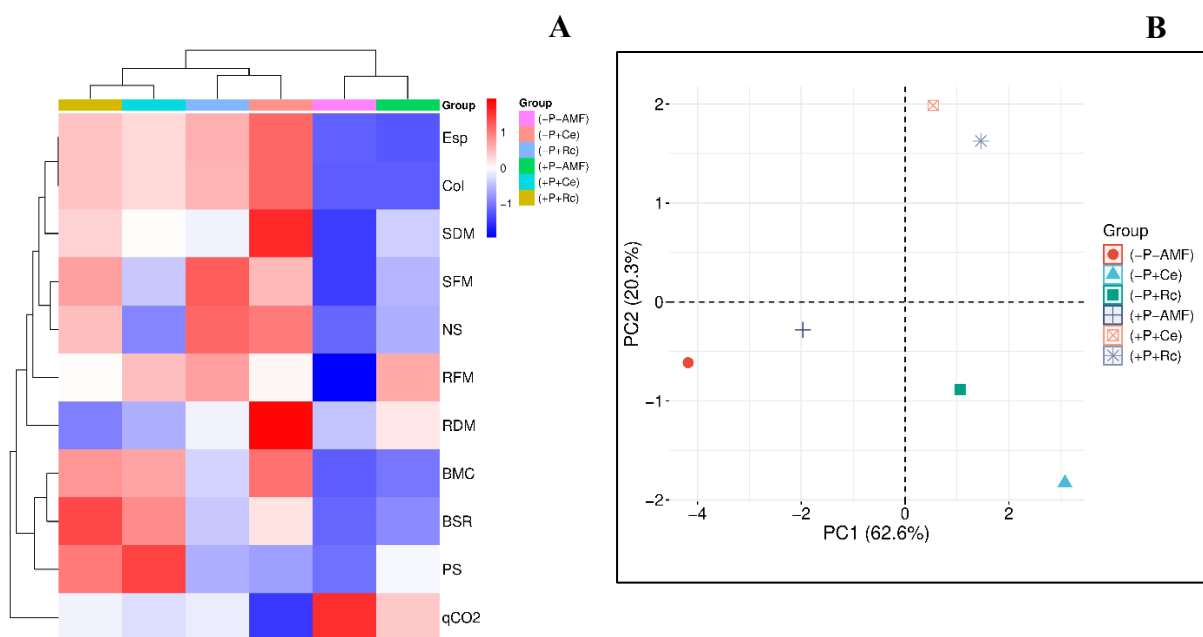


Figura 1. Heat map, combinado com o agrupamento hierárquico (A) e a Análise de Componentes Principais (PCA) (B), evidenciando perfis distintos entre os tratamentos utilizando parâmetros do substrato e plantas de citronela analisada sob diferentes níveis de P (mg kg^{-1} de substrato) e inoculada ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum*.

A formação de dois agrupamentos distintos no heat map indica que a inoculação micorrízica foi o principal fator responsável pela diferenciação dos tratamentos. Os tratamentos não inoculados, independentemente do nível de P, apresentaram padrões semelhantes nos

parâmetros avaliados, pois a planta depende exclusivamente da absorção direta de P pelas raízes, sem o aporte das hifas dos FMAs (Keymer et al., 2017).

Em contraste, os demais tratamentos inoculados apresentaram perfis fisiológicos distintos, refletidos na separação observada na PCA. Esse comportamento é amplamente descrito na literatura, pois a inoculação com FMAs tende a modular a absorção de nutrientes, biomassa e síntese de metabólitos secundários (Van Der Heijden et al., 2015), mesmo sob diferentes níveis de P disponível (Lermen et al., 2024).

3.6. Identificação química do óleo essencial por CG/EM

Na composição química do OE, foram identificados 21 compostos, sendo citronelal (47,96-43,87%), geraniol (22,12-18,88%) e citronelol (11,53-10,61%) os componentes majoritários (Tabela 6). Segundo Verma et al. (2020), os principais componentes do OE extraído pelo processo de hidrodestilação de citronela semi-seca foram citronelal (36,1%), geraniol (20,1%), citronelol (10,3%) e elemol (8,2%).

O citronelal é responsável pela característica de odor cítrico intenso no óleo de citronela. Já o geraniol e citronelol são responsáveis pelo odor doce agradável, conhecidos como álcoois de rosa por conta de sua ocorrência também em óleos de rosa (Eden et al., 2018). Esses monoterpenos, em particular, possuem potencial tóxico nos processos bioquímicos básicos com consequências fisiológicas e comportamentais nos insetos, como a hiperatividade, imobilização e morte (Brito et al., 2019).

As fragrâncias preparadas a partir do OE de citronela são amplamente utilizadas em produtos de limpeza e lavagem doméstica, devido às suas propriedades repelentes de mosquitos (Zhao et al., 2024). O citronelal, citronelol e geraniol também são extensivamente utilizados na produção de perfumes e cosméticos nas indústrias de aromas em todo o mundo (Kakaraparthi et al., 2014).

O citronelal está presente em grande quantidade em plantas do gênero *Cymbopogon*. Estudos indicam ação anticancerígena desse composto isolado, afetando a sinalização celular do hepatocarcinoma via receptor olfativo (Maßberg et al., 2015); possui propriedades acaricidas (Giménez-Martínez et al., 2022); além disso, atenua a resposta mecânica de nocicepção em camundongos (Santana et al., 2013). Ele também é utilizado na síntese de fragrâncias mais versáteis, como geraniol e *L*-mentol (Zhao et al., 2024).

Tabela 6. Composição química e porcentagem relativa (%) do óleo essencial da citronela sob diferentes níveis de P (mg kg⁻¹ de substrato) e inoculada ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum*.

Picos	TR	Composto	RI ^C	Sem P			Com P		
				N. I	<i>R. c</i>	<i>C. e</i>	N. I	<i>R. c</i>	<i>C. e</i>
1	8.486	D-Limonene	1035	2,129	0,980	1,823	1,927	1,590	1,393
2	10.339	Linalool	1109	0,730	0,575	0,605	0,659	0,603	0,550
3	11.465	Isopulegol	1157	0,575	-	0,412	0,453	0,504	0,465
4	11.613	Citronelal	1164	47,967	46,179	43,871	46,928	45,151	44,563
5	13.464	Citronelol	1341	10,903	11,531	11,427	10,616	11,525	11,479
6	13.712	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)-	1352	0,587	1,011	1,122	1,227	1,126	1,231
7	14.102	Geraniol	1369	20,442	18,883	22,124	19,881	21,425	20,382
8	16.134	2,6-Octadiene, 2,6-dimethyl-	1359	3,876	4,430	2,985	4,096	3,450	3,401
9	16.816	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate, (Z)-	1489	5,028	6,197	3,902	5,498	4,542	3,727
10	18.996	Germacrene D	1493	2,496	2,892	2,690	2,651	2,879	2,825
11	19.661	γ-Muurolene	1526	-	-	-	0,225	-	-
12	19.816	1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,5,6,8a hexahydronaphthalene	1535	2,126	1,989	2,420	2,379	2,619	2,351
13	20.993	Germacrene D-4-ol	1593	2,371	4,253	3,334	2,383	3,334	4,106
14	21.608	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (Z,E)-	1626	0,341	0,354	0,396	0,392	0,395	0,423
15	22.272	tau-Muurolol	1662	-	-	2,046	-	-	2,052
16	23.608	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	1931	0,430	0,473	0,583	0,509	0,560	0,599
17	23.961	2,6,10-Dodecatrienal, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)-	1952	-	-	-	-	-	0,178
18	28.345	Nerolidol	2416	-	-	-	-	-	0,275
19	28.347	Ledol	2417	-	-	0,261	-	-	-
20	28.351	Cyclopropanemethanol, 2-methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-	2417	-	0,252	-	-	0,298	-
21	28.358	2,6,11-Tridecatrien-10-ol, 2,6,10-trimethyl-	2418	-	-	-	0,175	-	-

TR: tempo de retenção (min); RI^C: índice de retenção calculado a partir de uma série homóloga de n-alcanos (C8–C40) em uma coluna DB-5. N. I: não inoculado; *R. c*: *Rhizophagus clarus*; *C. e*: *Claroideoglomus etunicatum*.

A citronela pode ser considerada segura para uso humano em concentrações baixas, como as encontradas em produtos cosméticos e de higiene. Porém, foi identificado um nível tóxico para o citronelal, demonstrando que a exposição a concentrações mais altas pode resultar em citotoxicidade e genotoxicidade (Rokonuzzman et al., 2024).

Estudo com o composto bioativo geraniol isolado demonstrou efeitos citotóxicos, antidiabéticos, anti-inflamatórios e oxidativos, sendo usado também no tratamento de colite ulcerosa, além de possuir atividade antifúngica e efeitos anticâncer, exercendo diversas propriedades no tratamento de enfermidades (Sá et al., 2021). Além disso, o geraniol e citronelol demonstraram propriedades miorrelaxantes ao induzir imobilização corporal total em peixes, sendo considerados alternativas seguras e eficazes para anestesia e manejo, com recuperação total após a exposição e sem mortalidade observada (de Araújo et al., 2021).

Nesse sentido, as interações sinérgicas e antagônicas entre os constituintes menores e os constituintes principais do OE desempenham um papel importante nas suas propriedades gerais, fazendo com que essas substâncias possuam grande valor terapêutico (Blowman et al., 2018) e sejam uma alternativa eficiente aos produtos fitofarmacêuticos convencionais (Werrie et al., 2020). Esses achados fornecem uma base sólida para estudos futuros que busquem explorar sinergias entre compostos ou avaliar a eficácia de aplicações práticas, consolidando a relevância de *C. winterianus* no campo dos produtos naturais.

3.7. *Rendimento do óleo essencial e caracterização química dos compostos majoritários da citronela*

Os valores observados para os compostos majoritários citronelal, citronelol e geraniol estão de acordo com os intervalos médios descritos na literatura para *Cymbopogon winterianus* (citronelal: 4,18–67,10%; citronelol: 4,50–27,00%; geraniol: 6,10–50,10%) compilados a partir de 95 estudos (Tabela 7).

O rendimento do OE (1,31–1,08 %) também se manteve dentro da faixa da literatura (0,41–4,24%), porém, um pouco abaixo da média relatada (1,35%) (Tabela 7). Embora o maior rendimento do OE tenha sido observado no tratamento com adição de P e sem inoculação micorrízica (1,31%), a inoculação com *R. clarus* e *C. etunicatum* sem P adicionado promoveu aumentos no rendimento de OE em comparação com os tratamentos inoculados com adição de

P e ao controle sem P. Esses resultados indicam que, em solos com baixos níveis de P, a inoculação com os FMAs pode favorecer o aumento do rendimento do OE de citronela.

Tabela 7. Rendimento do óleo essencial e caracterização química (%) dos compostos majoritários da citronela sob diferentes níveis de P (mg kg⁻¹ de substrato) e inoculada ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*.

P	FMA	Citronelal	Citronelol	Geraniol	Rendimento
	Não inoculado	47,69	10,84	20,33	1,11d
Sem	<i>R. clarus</i>	46,18	11,53	18,88	1,25bc
	<i>C. etunicatum</i>	43,87	11,43	22,12	1,26b
	Não inoculado	46,93	10,17	19,88	1,31a
Com	<i>R. clarus</i>	45,15	11,53	21,43	1,08e
	<i>C. etunicatum</i>	44,56	11,48	20,38	1,24c
Os dados foram compilados a partir de 95 artigos.					
	Média da literatura	33,37	11,95	22,13	1,35
	Erro padrão	0,61	0,20	0,42	0,05
	Faixa da literatura	4,18-67,10	4,50-27,00	6,10-50,10	0,41-4,24
	n	309	303	292	179

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

O P faz parte de diversas rotas metabólicas nas plantas, e sua disponibilidade adequada tem estimulado a atividade bioquímica levando ao aumento da produção de OE (da Costa et al., 2020). Por outro lado, a colonização micorrízica pode induzir respostas bioquímicas nas plantas, favorecendo a produção de compostos voláteis, especialmente em condições de estresse nutricional ou ambiental (Lermen et al., 2015; Merlin et al., 2020).

A colonização por FMAs pode promover alterações nos níveis de fitormônios, como ácido jasmônico (JA), ácido giberélico (GA₃) e 6-benzilaminopurina (BAP), além de aumentar a densidade e o tamanho de tricomas glandulares nas plantas, estruturas diretamente relacionadas à síntese e armazenamento de metabólitos voláteis. Esses efeitos estão associados à ativação da expressão de genes envolvidos na biossíntese de sesquiterpenoides (Zhao et al., 2022).

Nesse contexto, destaca-se que os terpenoides, principais constituintes de OEs, são sintetizados a partir das vias metabólicas do metileritritol fosfato (MEP) e do ácido mevalônico

(MVA), responsáveis pela formação dos precursores isoprenoides (IPP e DMAPP) (Bergman et al., 2024). A associação com FMAs pode modular essas rotas metabólicas, favorecendo o fluxo de carbono para a produção de metabólitos secundários e, conseqüentemente, contribuindo para o aumento do rendimento e da qualidade do óleo essencial.

3.8. Capacidade antioxidante do óleo essencial

Os resultados das análises antioxidantes de eliminação de radicais livres ABTS^{•+} ($\mu\text{M}_{\text{Trol}} \text{mg}_{\text{OE}}^{-1}$), eliminação do radical DPPH ($\mu\text{M}_{\text{Trol}} \text{mg}_{\text{OE}}^{-1}$) e poder de redução do íon ferro FRAP ($\mu\text{M}_{\text{Fe}^{2+}} \text{mg}_{\text{OE}}^{-1}$) do OE de citronela estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Análises antioxidantes de eliminação de radicais livres ABTS^{•+} ($\mu\text{M}_{\text{Trol}} \text{mg}_{\text{OE}}^{-1}$), eliminação do radical DPPH ($\mu\text{M}_{\text{Trol}} \text{mg}_{\text{OE}}^{-1}$) e poder de redução do íon ferro FRAP ($\mu\text{M}_{\text{Fe}^{2+}} \text{mg}_{\text{OE}}^{-1}$) do OE de citronela crescendo sob diferentes níveis de P (mg kg^{-1} de substrato) e inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum*.

P	FMA	ABTS ^{•+}	DPPH	FRAP
	N. inoculado	1735,99±40,99c	44,41±1,73ab	1675,55±66,55c
Sem	<i>R. clarus</i>	2101,10±31,88ab	54,10±2,17a	1920,65±61,65ab
	<i>C. etunicatum</i>	1715,71±46,51c	28,23±3,78b	1706,25±34,55bc
	N. inoculado	2184,94±117,32a	55,87±4,75a	1950,81±24,77a
Com	<i>R. clarus</i>	1921,25±48,05bc	8,60±1,15c	1866,24±130,33abc
	<i>C. etunicatum</i>	1903,67±67,73bc	51,92±11,01a	1778,44±23,12abc

Média ± erro padrão (n=3). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Para ABTS^{•+}, as plantas não inoculadas com P e aquelas inoculadas com *R. clarus* sem adição de P não diferiram significativamente entre si e mostraram um aumento significativo quando comparadas aos demais tratamentos. No teste DPPH, o tratamento não inoculado com P, *C. etunicatum* com P e *R. clarus* sem adição de P demonstrou uma atividade antioxidante superior, embora não tenham diferido significativamente do tratamento não inoculado sem P. No estudo do potencial redutor FRAP, os resultados mostraram que as plantas não inoculadas e com P adicionado apresentaram os maiores valores, enquanto as plantas inoculadas com *R. clarus* sem adição de P tiveram um aumento significativo.

Apesar do tratamento controle (não inoculado) destacar-se positivamente em condições de adição de P, obtendo maior atividade antioxidante, foi possível observar que a inoculação com *R. clarus* sem adição de P ao substrato pôde melhorar a capacidade antioxidante das plantas de citronela em comparação com o tratamento não inoculado sem P, e que a disponibilidade de P e a interação com os FMAs influenciam esses parâmetros antioxidantes.

Em estudo anterior, a inibição dos radicais DPPH pelo OE de *Cymbopogon nardus* demonstrou um comportamento dependente da concentração. Por meio do método ABTS⁺, o OE apresentou uma atividade antioxidante inferior à do ácido gálico. No entanto, os autores destacaram que, apesar de sua atividade antioxidante ser menor, ela ainda é significativa, sugerindo um potencial relevante (Bayala et al., 2020).

Esse potencial antioxidante em geral pode ser atribuído ao alto teor de álcoois monoterpênicos no OE especialmente ao geraniol (Bayala et al., 2020) e ao aldeído monoterpênico citronelal (Leite et al., 2010). Porém, as diferenças significativas encontradas no presente estudo, entre os tratamentos, podem ser explicadas pelo sinergismo dos compostos minoritários sobre os majoritários, potencializando o efeito antioxidante.

Nesse sentido, Baj et al. (2023) demonstraram que combinações específicas de óleos essenciais, incluindo citronela, manjeriço, cedro e tomilho, mostraram sinergismo, em que os compostos menores contribuíram para aumentar a eficácia antioxidante geral, acima do que seria esperado pela soma das atividades individuais dos compostos.

Adicionalmente, Saha et al. (2021) demonstraram que os resíduos sólidos provenientes da extração do OE de *C. winterianus* possuem potencial como fonte natural de antioxidantes, conforme evidenciado por diferentes ensaios, incluindo DPPH, ABTS⁺ e FRAP. No presente estudo, utilizamos o OE, mas é crucial destacar a relevância de explorar o potencial antioxidante desses resíduos, ampliando as possibilidades de aproveitamento sustentável dos subprodutos gerados durante a extração do OE.

3.9. Atividade antimicrobiana do óleo essencial

A atividade antimicrobiana do OE foi avaliada contra as cepas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e os resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM) são apresentados na Tabela 9.

O OE de citronela apresentou maior atividade frente à bactéria Gram-positiva *B. subtilis*, com CIM variando entre 2,5 e 6,66 mg mL⁻¹. Os tratamentos *C. etunicatum* sem adição de P e *R. clarus* com P exibiram as menores CIMs, ambas iguais a 2,5 mg mL⁻¹.

Para *E. coli*, bactéria Gram-negativa, a atividade foi mais limitada, sendo observada em todos os tratamentos para a maior concentração testada. Em relação ao *S. aureus*, outra bactéria Gram-positiva, apenas o tratamento controle não inoculado apresentou CIM de 20 mg mL⁻¹, enquanto os demais tratamentos não apresentaram atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações avaliadas, indicando uma CIM superior a 20 mg mL⁻¹.

Tabela 9: Concentrações inibitórias mínimas (CIM) (mg mL⁻¹) do óleo essencial de citronela crescendo sob diferentes doses de P (mg kg⁻¹ de substrato) inoculado ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*.

P	FMA	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
	Não inoculado	4,17±0,83	20,00±0,00	20,00±0,00
Sem	<i>R. clarus</i>	6,66±1,66	20,00±0,00	>20
	<i>C. etunicatum</i>	2,50±0,00	20,00±0,00	>20
	Não inoculado	3,33±0,83	20,00±0,00	>20
Com	<i>R. clarus</i>	2,50±0,00	20,00±0,00	>20
	<i>C. etunicatum</i>	4,17±0,83	20,00±0,00	>20

Média ± erro padrão (n=3).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais, incluindo o de citronela, tem sido amplamente associado à desestabilização da membrana celular bacteriana, levando à perda de integridade estrutural, extravasamento de conteúdos intracelulares e, conseqüentemente, à morte celular (Guimarães et al., 2019). Estudo com citronelol e citronelal isolados mostram baixa eficácia contra *S. aureus*. Esse comportamento é atribuído à estrutura das bactérias Gram-positivas, como *S. aureus* e *B. subtilis*, que não possuem membrana externa, mas apresentam uma parede celular espessa e altamente rica em peptidoglicano. Essa barreira adicional confere maior rigidez e reduz a permeabilidade, dificultando a ação de compostos antimicrobianos (Lopez-Romero et al., 2015).

Sharma et al. (2020), relataram que o OE de citronela possui CIM de 1500 µg mL⁻¹ (1,5 mg mL⁻¹) contra *B. subtilis*, o que corrobora com o presente estudo. Porém, sob uma perspectiva

aplicada, por exemplo a utilização do OE em sistemas agrícolas como agente de controle de fitopatógenos, é importante ponderar possíveis efeitos não alvo sobre microrganismos benéficos, como *B. subtilis*, frequentemente utilizado como bioinoculante. Essa espécie desempenha funções essenciais, incluindo promoção do crescimento vegetal, fixação biológica de nitrogênio indireta, aumento da resistência ao estresse e atuação no biocontrole, além de contribuir para a melhoria das propriedades físicas do solo, como retenção de água (Bi et al., 2024). Dessa forma, embora o OE de citronela apresente potencial promissor, sua aplicação em sistemas agrícolas deve considerar estratégias que minimizem impactos sobre a microbiota benéfica, como ajuste de dose, forma de aplicação ou uso direcionado.

De forma geral, a atividade antimicrobiana da citronela está associada à variação na composição química do OE, influenciada por fatores edafoclimáticos, genéticos e de manejo, como a inoculação com FMAs e a disponibilidade de P. Além disso, essa atividade pode resultar de interações sinérgicas ou antagônicas entre os constituintes do óleo, variando conforme a origem e o método de extração (Dangol et al., 2023).

3.10. Heat map combinado com o agrupamento hierárquico e Análise de Componentes Principais (PCA) com base no rendimento do óleo essencial e nos compostos majoritários

O heat map combinado com o agrupamento hierárquico (Figura 2A), revelou perfis distintos entre os tratamentos que utilizaram a atividade antioxidante, o rendimento de EO e os três compostos majoritários (citronelal, citronelol e genaniol), sendo que não inoculado com P (na cor verde) e inoculado com *R. clarus* sem P no substrato (na cor azul), formaram um cluster distinto dos demais tratamentos, que formaram outro cluster distinto. A produção de citronelol e genaniol estão agrupados, enquanto a produção de citronelal (principal composto) está agrupado com as atividades antioxidantes (DPPH, FRAP e ABTS^{•+}) e com o rendimento do OE (Figura 2A).

Análise de Componentes Principais (PCA) explicou 73,1% da variância total, com os dois primeiros componentes principais (PC1 = 52,8% e PC2 = 20,3%) distinguindo claramente o não inoculados sem adição de P dos outros tratamentos (Figura 2B).

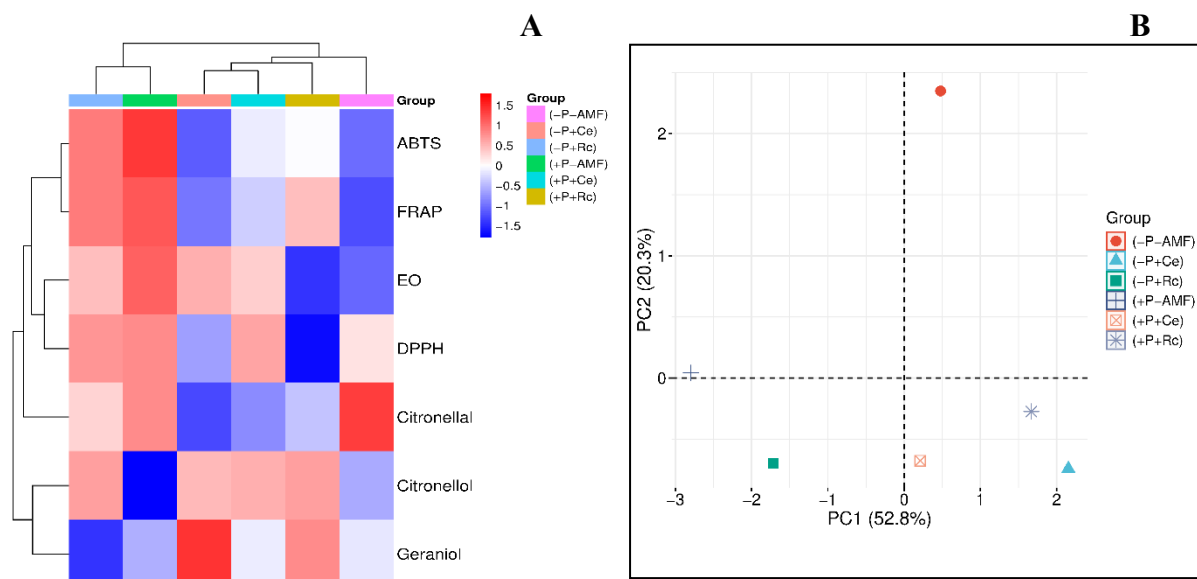


Figura 2. Heat map combinado com o agrupamento hierárquico (A), e a Análise de Componentes Principais (PCA) (B), revelaram perfis distintos entre os tratamentos com base na atividade antioxidante, rendimento do óleo essencial (OE) e nos três principais compostos majoritários da citronela sob diferentes níveis de P (mg kg^{-1} de solo) e inoculada ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*.

A similaridade de perfil metabólico entre plantas não inoculadas sob alto P e plantas inoculadas com *R. clarus* sob baixo P indica que diferentes estratégias fisiológicas podem resultar em respostas químicas equivalentes. Enquanto a elevada atividade antioxidante no tratamento não inoculado com P está associada à melhor nutrição fosfatada, no tratamento micorrizado sob baixo P essa resposta pode estar relacionada à ativação de mecanismos adaptativos induzidos pela simbiose micorrízica, incluindo a intensificação do metabolismo secundário. Esses resultados reforçam que a micorrização não atua apenas como facilitadora da absorção de nutrientes, mas também como moduladora do metabolismo antioxidante e da biossíntese de monoterpenos (Kapoor et al., 2017; Zhao et al., 2022).

O agrupamento entre citronelal, atividades antioxidantes e rendimento de óleo essencial reflete a dominância desse monoterpeno na fração volátil, contribuindo simultaneamente para o maior rendimento do óleo e para sua capacidade antioxidante. Citronelol e geraniol variam de maneira conjunta, possivelmente por serem derivados da mesma rota biossintética inicial, com o geraniol servindo como precursor direto do citronelol (Li et al., 2024).

4. Conclusão

Os resultados deste estudo indicam que a inoculação com *C. etunicatum* é a mais eficiente em solos com baixos níveis de P, proporcionando melhores desempenhos em parâmetros como colonização radicular, densidade de esporos, CBM e eficiência do uso de carbono (qCO_2), além de promover maior rendimento de óleo essencial (OE) quando comparado aos outros tratamentos inoculados.

Por outro lado, o tratamento controle (não inoculado) destacou-se positivamente em condições de substrato com adição de P, obtendo os melhores resultados para número de perfilhos, maior rendimento de OE e maior atividade antioxidante nas metodologias de FRAP, DPPH e ABTS^{•+}. O OE apresentou maior atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis*, especialmente em *C. etunicatum* sem P e *R. clarus* com P (CIM 2,5 mg mL⁻¹).

Portanto, de modo geral, a inoculação com *C. etunicatum* sem P adicionado ao substrato apresenta-se como uma estratégia mais viável economicamente e sustentável para o cultivo de citronela. Essa abordagem reduz a dependência de fertilizantes químicos, diminuindo os custos de produção e os impactos ambientais associados ao uso excessivo de P. Além disso, promove benefícios adicionais, como o aumento da eficiência do uso de C no solo e a melhora na qualidade do OE produzido, consolidando-se como uma prática alinhada ao manejo agrícola sustentável.

5. Referências

- Ahmed, K.B.M., Khan, M.M.A., Jahan, A., Siddiqui, H., Uddin, M. 2020. Gamma rays induced acquisition of structural modification in chitosan boosts photosynthetic machinery, enzymatic activities and essential oil production in citronella grass (*Cymbopogon winterianus* Jowitt). *Int. J. Biol. Macromol.* 145, 372–389. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.130>.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H. 1993. The metabolic quotient for CO₂ ($q\text{CO}_2$) as a specific parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 25, 393–395. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90140-7).
- Araújo, A.D., Santos, V.B., Monteiro, R.T.R. 2008. Responses of soil microbial biomass and activity for practices of organic and conventional farming systems in Piauí state, Brazil. *Eur. J. Soil Biol.*, 44, 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.06.001>.
- Baj, T.; Kowalska, G.; Kowalski, R.; Szymańska, J.; Kai, G.; Coutinho, H.D.M.; Sieniawska, E. 2023. Synergistic Antioxidant Activity of Four—Component Mixture of Essential Oils: Basil, Cedarwood, Citronella and Thyme for the Use as Medicinal and Food Ingredient. *Antioxidants*, 12, 577. <https://doi.org/10.3390/antiox12030577>.
- Battini, F., Grønlund, M., Agnolucci, M. Giovannette, M., Jakobsen, I. 2017. Facilitation of phosphorus uptake in maize plants by mycorrhizosphere bacteria. *Sci. Rep.* 7, 4686. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04959-0>.
- Bayala, B., Coulibaly, A.Y., Djigma, F.W., Nagalo, B.M., Baron, S., Figueredo, G., Lobaccaro, J.A., Simpore, J. 2020. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of the essential oil of *Cymbopogon nardus*, a plant used in traditional medicine. *Biomol. Concepts*, 11, 86–96. <https://doi.org/10.1515/bmc-2020-0007>.
- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M.A., Raza, S., Khan, M.I., Ashraf, M., Ahmed, N., Zhang, L. 2019. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Plant Growth Regulation: Implications in Abiotic Stress Tolerance. *Front. Plant Sci.*, 10, 1068. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>.

- Bergman, M. E., Kortbeek, R. W., Gutensohn, M., Dudareva, N. 2024. Plant terpenoid biosynthetic network and its multiple layers of regulation. *Prog. Lipid. Res.*, 95, 101287. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2024.101287>.
- Bi, Y., Zhou, B., Ren, P., Chen, X., Zhou, D., Yao, S., Fan, D., Chen, X. 2024. Effects of *Bacillus subtilis* on cotton physiology and growth under water and salt stress. *Agric. Water Manag.*, 303, 109038. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2024.109038>.
- Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M.F.L., Cabral, C., Pires, I.M. 2018. Anticancer properties of essential oils and other natural products. *Evid. Based Complement. Alternat. Med. eCAM*, 2018, 3149362. <https://doi.org/10.1155/2018/3149362>.
- Brito, S.S.S., Oliveira, C.H.C.M., Oliveira, C.R.F. 2019. Atividade inseticida e repelente de óleos essenciais sobre *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833). *Agrarian*, 12, 443–448. <https://doi.org/10.30612/agrarian.v12i46.7863>.
- Burni, T., Hussain, F., Bibi, S., Ullah, R., Lalay, G. 2023. The salutary impacts of AMF species, rock phosphates (RP), and organic matter (FYM) fertilizers on the development and chemical behavior of *Mentha arvensis* L. *Acta Ecol. Sin.* 43, 835–841. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2022.12.003>.
- Carneiro, M.A.C., Siqueira, J.O., Davide, A.C. 2004. Fósforo e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares no estabelecimento de mudas de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec). *Pesqui. Agropecu. Trop.* 34, 119–125.
- Chen, S., Zhao, H., Zou, C., Li, Y., Chen, Y., Wang, Z., Jiang, Y., Liu, A., Zhao, P., Wang, M., Ahammed, G.J. 2017. Combined inoculation with multiple arbuscular mycorrhizal fungi improves growth, nutrient uptake and photosynthesis in cucumber seedlings. *Front. Microbiol.* 8, 2516. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02516>.
- CLSI. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 8th ed. CLSI document M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- da Costa, A.S.V., Hott, M.C., Horn, A.H. 2020. Management of citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) for the production of essential oils. *SN Appl. Sci.* 2, 2132. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-03949-8>.

- da Cruz, R.M.S., Alberton, O., da Silva Lorencete, M., da Cruz, G.L.S., Gasparotto-Junior, A., Cardozo-Filho, L., de Souza, S.G.H. 2020. Phytochemistry of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting bacteria. *Ind. Crops Prod.* 149, 112340. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112340>.
- Dangol, S., Poudel, D.K., Ojha, P.K., Maharjan, S., Poudel, A., Satyal, R., Rokaya, A., Timsina, S., Dosoky, N.S., Satyal, P., Setzer, W.N. 2023. Essential Oil Composition Analysis of *Cymbopogon* Species from Eastern Nepal by GC-MS and Chiral GC-MS, and Antimicrobial Activity of Some Major Compounds. *Molecules*, 28, 543. <https://doi.org/10.3390/molecules28020543>.
- de Araújo, E.A. de Ker, J.C., Neves, J.C.L., Lani, J.L. 2012. Qualidade do solo: conceitos, indicadores e avaliação. *Pesq. Aplicada Agrotecnol.* 5, 187–206. <https://doi.org/10.5777/paet.v5i1.1658>.
- de Araújo, E.R.L., Silva, J.D.S., Lopes, L.M., Torres, M.F., Costa, B.M.A., Amarante, C.B., Hamoy, M., Barbas, L.A.L., Sampaio, L.A. 2021. Geraniol and citronellol as alternative and safe phytoconstituents to induce immobilization and facilitate handling of fish. *Aquaculture* 537, 736517. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736517>.
- Eden, W.T., Alighiri, D., Cahyono, E., Supardi, K.I., Wijayati, N. 2018. Fractionation of Java citronella oil and citronellal purification by batch vacuum fractional distillation. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 349, 012067. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/349/1/012067>.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária—EMBRAPA. Atlas Climático da Região Sul do Brasil, 2nd ed.; Embrapa: Brasília, Brazil, 2012; 334p.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.04.001>.
- Falker Automação Agrícola Ltda. 2008. Manual do medidor eletrônico de teor clorofila (ClorofiLOG / CFL 1030). Porto Alegre, Falker Automação Agrícola.
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235–246.
- Giménez-Martínez, P., Ramirez, C., Mitton, G., Arcerito, F.M., Ramos, F., Cooley, H., Fuselli, S., Maggi, M. 2022. Lethal concentrations of *Cymbopogon nardus* essential oils and their

- main component citronellal on *Varroa destructor* and *Apis mellifera*. *Exp. Parasitol.* 238, 108279. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108279>.
- Giovannetti, M., Mosse, B.A., 1980. Evaluation of techniques for measuring VA mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500. <http://www.jstor.org/stable/2432123>.
- Guimarães, A.C., Meireles, L.M., Lemos, M.F., Guimarães, M.C.C., Endringer, D.C., Fronza, M., Scherer, R. 2019. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*, 24, 2471. <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>.
- Gusmaini, Syakir, M. 2020. Response of Citronella Grass on Several Phosphate Levels Application at Andosol. *Indian J. Agric. Res.* 54, 355–360. <https://doi.org/10.18805/IJARE.A-443>.
- Huang, H., Liu, S., Du, Y., Tang, J., Hu, L., Chen, X. 2023. Carbon allocation mediated by arbuscular mycorrhizal fungi alters the soil microbial community under various phosphorus levels. *Fungal Ecol.* 62, 101227. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2023.101227>.
- Jenkinson, D.S., Powlson, D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V: A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8, 209–213. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90005-5).
- Juncos, N.S., Corradi, M.P., Ponso, C.F.C., Olmedo, R.H. 2026. Evaluation of genus *Cymbopogon* as potential antioxidant in foods using vacuum-packed and non-vacuum-packed in roasted peanuts as a model to assess their oxidative stability and shelf life. *Food Hum.* 6, 100994. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2026.100994>.
- Kakaraparthi, P.S., Srinivas, K.V.N.S., Kumar, J.K., Kumar, A.N., Rajput, D.K., Sarma, V.U.M. 2014. Variation in the essential oil content and composition of *Cymbopogon winterianus* in relation to time of harvest and weather conditions. *Ind. Crops Prod.* 61, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.044>.
- Kapoor, R., Anand, G., Gupta, P., Mandal, S. 2017. Insight into the mechanisms of enhanced production of valuable terpenoids by arbuscular mycorrhiza. *Phytochem. Rev.* 16, 677–692. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9486-9>.

- Kaschuk, G., Alberton, O., Hungria, M. 2010. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.08.020>.
- Keymer, A., Pimprikar, P., Wewer, V., Huber, C., Brands, M., Bucerius, S.L., Delaux, P.M., Klingl, V., von Röpenack-Lahaye, E., Wang, T.L., Eisenreich, W., Dörmann, P., Parniske, M., Gutjahr, C. 2017. Lipid transfer from plants to arbuscular mycorrhiza fungi. *eLife* 6, e29107. <https://doi.org/10.7554/eLife.29107>.
- Khalediyan, N., Weisany, W., Schenk, P.M. 2021. Arbuscular mycorrhizae and rhizobacteria improve growth, nutritional status and essential oil production in *Ocimum basilicum* and *Satureja hortensis*. *Ind. Crops Prod.* 160, 113163. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113163>.
- Leite, B.L., Bonfim, R.R., Antonioli, A.R., Thomazzi, S.M., Araújo, A.A., Blank, A.F., Estevam, C.S., Cambui, E.V., Bonjardim, L.R., Albuquerque-Júnior, R.L., Quintans-Júnior, L.J. 2010. Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. *Pharm. Biol.* 48, 1164–1169. <https://doi.org/10.3109/13880200903280000>.
- Lermen, C., da Cruz, R.M.S., de Souza Gonçalves, C.H., Pinc, M.M., Otênio, J.K., da Silva, C., Alberton, O. 2024. Essential oil phytochemistry and antifungal activity of lemongrass inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different phosphorous levels. *Rhizosphere*, 32, 100968. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100968>.
- Lermen, C., Morelli, F., Gazim, Z.C., Silva, A.P., Gonçalves, J.E., Dragunski, D.C., Alberton, O. 2015. Essential oil content and chemical composition of *Cymbopogon citratus* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of lead. *Ind. Crops Prod.* 76, 734–738. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.009>.
- Li, H., Li, Y., Yan, H., Bao, T., Shan, X., Caissard, J.C., Zhang, L., Fang, H., Bai, X., Zhang, J., Wang, Z., Wang, M., Guan, Q., Cai, M., Ning, G., Jia, X., Boachon, B., Baudino, S., Gao, X. 2024. The complexity of volatile terpene biosynthesis in roses: Particular insights into β -citronellol production. *Plant Physiol.*, 196, 1908–1922. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac444>.

- Lopez-Romero, J.C., González-Ríos, H., Borges, A., Simões, M. 2015. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2015, 795435. <https://doi.org/10.1155/2015/795435>.
- Maßberg, D., Simon, A., Häussinger, D., Keitel, V., Gisselmann, G., Conrad, H., Hatt, H. 2015. Monoterpene (-)-citronellal affects hepatocarcinoma cell signaling via an olfactory receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 566, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.004>.
- Melato, E., da Cruz, R.M.S., Pinc, M.M., Otênio, J.K., Schwengber, R.P., Dias-Arieira, C.R., Alberton, O. 2024. Inoculation of rue with arbuscular mycorrhizal fungi alters plant growth, essential oil production and composition. *Rhizosphere* 29, 100856. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100856>.
- Merlin, E., Melato, E., Lourenço, E.L.B., Jacomassi, E., Gasparotto-Junior, A., da Cruz, R.M.S., Otênio, J.K., Silva, C., Alberton, O. 2020. Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus addition increase coarse mint (*Plectranthus amboinicus* Lour.) plant growth and essential oil content. *Rhizosphere* 15, 100217. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100217>.
- Mishra, V., Gupta, A., Kaur, P., Singh, S., Singh, N., Gehlot, P., Singh, J. 2016. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria in bioremediation of iron contaminated soils. *Int. J. Phytoremediation* 18, 697–703. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1131231>.
- Munda, S., Lal, M. 2020. *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor, a Hub for Various Industrial and Pharmaceutical Applications. In: Singh, B. (eds) *Botanical Leads for Drug Discovery*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5917-4_19.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 157–160.
- Pu, Z., Zhang, R., Wang, H., Li, Q., Zhang, J., Wang, X.X. 2023. Root morphological and physiological traits and arbuscular mycorrhizal fungi shape phosphorus-acquisition

- strategies of 12 vegetable species. *Front. Plant Sci.* 14, 1150832. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1150832>.
- Rammal, M., Kara, M., Badran, A., Haidar, C., Zahreddine, H., Bassal, H., Bechelany, M., El-Dakdouki, M.H., Hijazi, A. 2025. Phytochemical profiling, antioxidant activity, food preservation, and insecticidal properties of *Origanum syriacum* and *Cymbopogon winterianus* extracts. *Foods*, 14, 1347. <https://doi.org/10.3390/foods14081347>.
- Rammal, M., Khreiss, S., Badran, A., Mezher, M., Bechelany, M., Haidar, C., Khalil, M.I., Baydoun, E., El-Dakdouki, M.H. 2024. Antibacterial and antifungal activities of *Cymbopogon winterianus* and *Origanum syriacum* extracts and essential oils against uropathogenic bacteria and foodborne fungal isolates. *Foods*, 13, 1684. <https://doi.org/10.3390/foods13111684>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
- Riaz, T., Abid, S., Afzal, M., Shakoori, F.R. 2025. Comparative efficacy of *Cymbopogon winterianus* essential oil and nanoemulsion as a sustainable biopesticide to control *Tribolium castaneum*: effect on biomolecules of insect and seed germination. *J. Stored Prod. Res.* 111, 102579. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2025.102579>.
- Rokonuzzman, M., Bhuia, M.S., Al-Qaaneh, A.M., El-Nashar, H.A.S., Islam, T., Chowdhury, R., Shanto, H.H., Al Hasan, M.S., El-Shazly, M., Islam, M.T. 2024. Biomedical perspectives of citronellal: Biological activities, toxicological profile and molecular mechanisms. *Chem. Biodivers.* 22, e202401973. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202401973>.
- Rosol, T.J., Cohen, S.M., Eisenbrand, G., Fukushima, S., Gooderham, N.J., Guengerich, F.P., Hecht, S.S., Rietjens, I.M.C.M., Davidsen, J.M., Harman, C.L., Kelly, S., Ramanan, D., Taylor, S.V. 2023. FEMA GRAS assessment of natural flavor complexes: Lemongrass oil, chamomile oils, citronella oil and related flavoring ingredients. *Food Chem. Toxicol.* 175, 113697. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2023.113697>.
- Sá, R.E., Monteiro, L.D., Silva, P.C., Santos, E.S., Vasconcelos, V.R.M., Vieira, R.B., Sousa, J.D.L., Nascimento, A.L.L., Carvalho, B.L.L., Silva, L.F. 2021. Geraniol, um componente dos óleos essenciais de plantas – um mapeamento científico de suas propriedades

- farmacológicas. Res. Soc. Dev. 10, e508101220805. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20805>.
- Saha, A., Basak, B.B., Manivel, P., Kumar, J. 2021. Valorization of Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) distillation waste as a potential source of phenolics/antioxidant: Influence of extraction solvents. J. Food Sci. Technol. 58, 255–266. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04538-8>.
- Santana, M.T., Oliveira, M.G., Santana, M.F., Sousa, D.P., Santana, D.G., Camargo, E.A., Oliveira, A.P., Almeida, J.R., Quintans-Júnior, L.J. 2013. Citronellal, a monoterpene present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice. Pharm. Biol. 51, 1144–1149. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.781656>.
- Santos, A., Paduan, R.H., Gazin, Z.C., Jacomassi, E., D'Oliveira, P.S., Cortez, D.A.G., Cortez, L.E.R. 2009. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. Rev. Bras. Farmacogn. 19, 436–441. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300017>.
- Santos, K.A., Klein, E.J., Gazim, Z.C., Gonçalves, J.E., Cardozo-Filho, L., Corazza, M.L., da Silva, E.A. 2016. Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythopappus*): Supercritical CO₂ oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling. J. Supercrit. Fluids 114, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.02.015>.
- Sato, T., Ezawa, T., Cheng, W., Tawarayama, K. 2015. Release of acid phosphatase from extraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus clarus*. Soil Sci. Plant Nutr. 61, 269–274. <https://doi.org/10.1080/00380768.2014.993298>.
- Sharma, K., Guleria, S., Razdan, V. K., Babu, V. 2020. Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. Ind. Crop. Prod. 154, 112569. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112569>.
- Shrestha S., Gautam T.P., Raut J.K., Goto B.T., Chaudhary S., Mandal T.N. 2024. Edaphic factors and elevation gradient influence arbuscular mycorrhizal colonization and spore density in the rhizosphere of *Shorea robusta* Gaertn. Ecol Front. 44, 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2023.05.011>.

- Silva, F.C., 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 627 p., Distrito Federal.
- Silveira, A.C., Kassuia, Y.S., Domahovski, R.C., Lazzarotto, M., Silveira, M.D.U., Kassuia, Y.S., Domahovski, R.C. 2018. Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos de erva-mate de forma rápida e reprodutível. Embrapa, Colombo.
- Smith, S.E., Jakobsen, I., Grønlund, M., Smith, F.A. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol.* 156, 1050-1057. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174581>.
- Sun, D., Shang, X., Cao, H., Lee, S.-J., Wang, L., Gan, Y., Feng, S. 2024. Physio-Biochemical Mechanisms of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Enhancing Plant Resistance to Abiotic Stress. *Agriculture*, 14, 2361. <https://doi.org/10.3390/agriculture14122361>.
- Tang, D., Chen, M., Huang, X., Zhang, G., Zeng, L., Zhang, G., Wu, S., Wang, Y. 2023. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS One*, 18, e0294236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294236>.
- Tate, K.R., Ross, D.J., Feltham, C.W. 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial-C: effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biol. Biochem.* 20, 329-335. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90013-2).
- Tavares, L.A., Rezende, A.A., Santos, J.L., Estevam, C.S., Silva, A.M.O., Schneider, J.K., Cunha, J.L.S., Droppa-Almeida, D., Correia-Neto, I.J., Cardoso, J.C., Severino, P., Souto, E.B., Albuquerque-Júnior, R.L.C. 2021. *Cymbopogon winterianus* essential oil attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a murine model. *Pharmaceutics* 13, 679. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050679>.
- Tumenjargal, T., Tsogtsaikhan, X., Yang, R., Gao, R., Liu, J., Tang, W., Liu, G., Ye, X., Huang, Z. 2025. Biomass allocation between reproductive and vegetative organs of *Artemisia* along a large environmental gradient. *BMC Plant Biol.* 25, 27. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-06030-3>.

- Urcoviche, R.C., Gazim, Z.C., Dragunski, D.C., Barcellos, F.G., Alberton, O. 2015. Plant growth and essential oil content of *Mentha crispata* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of phosphorus. *Ind. Crops Prod.* 67, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.016>.
- Van Der Heijden, M.G., Martin, F.M., Selosse, M.A., Sanders, I.R. 2015. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytol.* 205, 1406-1423. <https://doi.org/10.1111/nph.13288>.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703-707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6).
- Verma, R.S., Verma, S.K., Tandon, S., Padalia, R.C., Darokar, M.P. 2020. Chemical composition and antimicrobial activity of Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor) essential oil extracted by different methods. *J. Essent. Oil Res.* 32, 449-455. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1787885>.
- Werrie, P.Y., Durenne, B., Delaplace, P., Fauconnier, M.L. 2020. Phytotoxicity of essential oils: opportunities and constraints for the development of biopesticides. *Foods* 9, 1291. <https://doi.org/10.3390/foods9091291>.
- Zhao, J., Fan, Y., Cheng, Z., Kennelly, E.J., Long, C. 2024. Ethnobotanical uses, phytochemistry and bioactivities of *Cymbopogon* plants: A review. *J. Ethnopharmacol.* 330, 118181. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118181>.
- Zhao, Y., Cartabia, A., Lalaymia, I., Declerck, S. 2022. Arbuscular mycorrhizal fungi and production of secondary metabolites in medicinal plants. *Mycorrhiza*, 32, 221-256. <https://doi.org/10.1007/s00572-022-01079-0>.
- Zhu, B., Gao, T., Zhang, D., Ding, K., Li, C., Ma, F. 2022. Functions of arbuscular mycorrhizal fungi in horticultural crops. *Scientia Hort.* 303, 111219. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111219>.

CAPÍTULO II

Rendimento, atividade biológica do óleo essencial e crescimento de *Cymbopogon*

winterianus Jowitt ex Bor inoculado com fungos micorrízicos e *Azospirillum*

brasilense

Normas referentes ao Capítulos II da tese que será submetida à revista Rhizosphere (anexo).

RESUMO: *Cymbopogon winterianus* apresenta elevado valor econômico devido ao seu óleo essencial (OE), cujos principais constituintes são citronelal, geraniol e citronelol. Apesar da ampla aplicação industrial e farmacológica, há escassez de estudos sobre manejo biológico e uso de inoculantes microbianos na cultura. Nesse contexto, a associação entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e bactérias promotoras de crescimento representa uma estratégia promissora para sistemas de produção mais eficientes e sustentáveis. Este estudo objetivou avaliar, de forma inédita, o efeito combinado de FMAs e *Azospirillum brasilense* no cultivo de citronela. O delineamento experimental foi fatorial 4×2, totalizando 64 unidades experimentais. Foram analisadas a colonização micorrízica, carbono da biomassa microbiana, respiração basal, quociente metabólico do substrato, crescimento vegetal, atividade antioxidante e antimicrobiana, além do rendimento e composição do OE. A coinoculação dos FMAs *Rhizophagus clarus* + *Claroideoglossum etunicatum* (T5) apresentou o melhor desempenho geral. Esse tratamento promoveu maiores biomassas fresca, seca e total, elevadas taxas de colonização radicular e melhorias nos atributos microbianos do substrato e na absorção de fósforo pela planta. T5 também exibiu as maiores atividades antioxidantes (ABTS^{•+} e FRAP). Os compostos majoritários do OE foram citronelal (50,66–38,91%), geraniol (19,71–3,12%) e citronelol (14,21–4,94%), com T5 apresentando o maior teor de geraniol. Além disso, o OE desse tratamento demonstrou atividade antimicrobiana significativa contra *Bacillus subtilis*. Portanto, T5 (*Rhizophagus clarus* + *Claroideoglossum etunicatum*) se destacou como a condição fisiológica e metabólica mais favorável, representando uma estratégia eficaz para potencializar o desempenho agrônomo, bioquímico e microbiológico da citronela.

Palavras-chave: Micorrização arbuscular, bactérias promotoras de crescimento, consórcio microbiano, citronela.

1. Introdução

Cymbopogon winterianus Jowitt, também conhecida como capim-citronela e citronela de Java, é pertencente à família Poaceae (Rammal et al., 2025). Seu óleo essencial (OE) destaca-se pelas suas propriedades biológicas, incluindo efeitos bactericidas, baixa toxicidade (Piasecki et al., 2021) e notável importância comercial na preparação de repelentes de mosquitos (Higuchi et al., 2023).

Quimicamente, o OE de *C. winterianus* é caracterizado pela predominância do citronelal, um aldeído monoterpênico e geraniol e citronelol, dois álcoois monoterpênicos que estão diretamente associados à sua atividade biológica e ao aroma característico da espécie (Piasecki et al., 2021). Nos últimos anos, a pesquisa sobre citronela se concentrou principalmente na extração, análise e ação farmacológica do OE, sendo poucos estudos sobre melhoramento e cultivo da citronela (Zhao et al., 2024).

A dependência de fertilizantes e pesticidas sintéticos na agricultura moderna tem resultado em impactos ambientais e na deterioração da saúde do solo, tornando urgente a adoção de abordagens alternativas e sustentáveis (Sun et al., 2024). Nesse sentido, é importante destacar a utilização de inoculantes biológicos para o crescimento e desenvolvimento de plantas de alto valor econômico e bioativo.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são bioinoculantes que melhoram a capacidade de absorção de água e nutrientes, e desencadeiam respostas morfológicas, fisiológicas e moleculares nas plantas medicinais, o que aumenta sua capacidade de resistir a estresse abiótico (Israel et al., 2022). Da mesma forma, o efeito sinérgico entre FMAs e bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) pode potencializar a eficiência da associação simbiótica.

Entre as BPCP, destaca-se *Azospirillum brasilense*, reconhecida por sua capacidade de promover o crescimento vegetal por meio de múltiplos mecanismos, incluindo a síntese de fitormônios, a indução de genes relacionados à defesa e a melhoria na absorção de nutrientes (Fukami et al., 2017; Khalid et al., 2021). Com elevado potencial agrônomo, essa bactéria contribui para o desenvolvimento radicular (Zeffa et al., 2019), aumento da produtividade e a maior tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos, representando uma alternativa sustentável ao uso intensivo de fertilizantes químicos (Fukami et al., 2017).

Em estudo de Souza et al. (2022), o capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), inoculado apenas com *A. brasilense* ou em combinação com FMA, aumentou o crescimento e

o desenvolvimento das plantas e modificou o conteúdo e a composição do OE. Porém, assim como os FMAs, a sua interação com as plantas medicinais varia dependendo da cultura e das condições ambientais, levando a variações em sua eficácia (Saharan e Nehra, 2011).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi investigar, pela primeira vez, a interação dos fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum* e da bactéria *Azospirillum brasilense* no crescimento e desenvolvimento da planta de *Cymbopogon winterianus*, juntamente com o rendimento, composição química e atividades antioxidantes e antimicrobianas do óleo essencial.

2. Material e Métodos

2.1. Delineamento experimental

Foi preparada uma mistura composta por 50% de substrato comercial (Humusfertil) e 50% de areia lavada + vermiculita na proporção 1:1 (v/v), totalizando aproximadamente 100 kg. Para a fumigação, foram adicionados 10 mL de clorofórmio (CHCl_3) por kg de mistura. Após homogeneização, o material foi acondicionado em sacos plásticos vedados hermeticamente, conforme metodologia adaptada de Endlweber e Scheu (2006). Os sacos permaneceram fechados por três dias e, posteriormente, foram abertos em câmara de exaustão. Após mais três dias de aeração, o substrato foi utilizado no experimento.

O experimento foi conduzido no Horto Medicinal da Universidade Paranaense (UNIPAR), localizado no município de Umuarama, Paraná, Brasil (latitude 23°47'55" S, longitude 53°18'48" W, altitude de 430 m). O cultivo foi realizado entre dezembro de 2022 e março de 2023, totalizando 86 dias, em ambiente protegido sob sombrite com 50% de sombreamento. A região possui uma temperatura média de 25,3 °C durante o verão (EMBRAPA, 2012) e a precipitação média no período foi de 6,46 mm segundo dados do Sistema de Tecnologia e Monitoramento Ambiental do Paraná (SIMEPAR).

O *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor possui registro no herbário do Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEM), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), sob o número 122593 e foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sob o número ABD29CF.

As estacas de citronela coletadas no Horto Medicinal da UNIPAR foram plantadas em vasos de polietileno com capacidade para 2 kg, contendo a mistura fumigada. Os tratamentos consistiram na ausência ou presença dos fungos micorrízicos arbusculares (*Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum*) e de *Azospirillum brasilense*, em esquema fatorial 4×2, com delineamento inteiramente casualizado e oito repetições por tratamento, totalizando 64 unidades experimentais.

Os tratamentos aplicados foram os seguintes:

1. Substrato fumigado (controle, sem inoculação)
2. *Azospirillum brasilense*
3. *Rhizophagus clarus*
4. *Claroideoglomus etunicatum*
5. *R. clarus* + *C. etunicatum*
6. *A. brasilense* + *R. clarus*
7. *A. brasilense* + *C. etunicatum*
8. *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*

Para a inoculação, foram aplicados no momento do transplante, aproximadamente 250 esporos dos FMA's *Claroideoglomus etunicatum* e *Rhizophagus clarus*, conforme descrito por Urcoviche et al. (2015), além de 1 mL planta⁻¹ da rizobactéria *Azospirillum brasilense* (2,0 × 10⁸ UFC mL⁻¹), utilizando as cepas Ab-V5 e Ab-V6 presentes no inoculante comercial Azofix, seguindo as recomendações de uso indicadas no rótulo do produto.

2.2. Colonização radicular

Para a colonização micorrízica, raízes finas foram clarificadas com KOH, coradas com azul de tripano e analisadas sob microscópio óptico (40–100×) (Phillips e Hayman, 1970). Foram contabilizados cerca de 100 segmentos radiculares por amostra (Giovannetti e Mosse, 1980).

2.3. Carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi determinado pelo método de fumigação–extração, conforme Vance et al. (1987) e Tate et al. (1988), usando 10 g da amostra de substrato. A respiração basal do substrato (RBS) foi estimada a partir de 30 g de substrato, segundo Jenkinson e Powlson (1976). O quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) foi calculado como a razão entre RBS e CBM, conforme Anderson e Domsch (1993).

2.4. Análises da planta

Após 86 dias de cultivo, o índice de clorofila foi mensurado em três folhas por planta, com auxílio de um clorofilômetro portátil CFL 1030 (ClorofiLOG®). Parâmetros como altura da planta, diâmetro do caule e número de perfilhos foram avaliados. Em seguida, as plantas foram colhidas, separadas em parte aérea e raízes, e uma subamostra foi seca em estufa de circulação forçada a 65 °C por 72 h e pesadas em balança digital para obtenção da massa seca da parte aérea (MSPA) e da massa seca das raízes (MSR).

2.5. Teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea

As amostras secas da parte aérea foram moídas e pesadas para a determinação dos teores de nitrogênio (N) e fósforo (P) na parte aérea. O P foi determinado por colorimetria com molibdato de amônio + ácido ascórbico em espectrofotômetro, com filtro vermelho e comprimento de onda de 660 nm (Silva, 2009). O teor de N foi obtido após digestão com ácido sulfúrico a 450 °C, seguido pelo método Kjeldahl de destilação e titulação com HCl 0,05 mol·L⁻¹ (Silva, 2009).

2.6. Extração e caracterização química do óleo essencial por CG/EM

A extração do OE das folhas e caules frescos foi realizada por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, com tempo padrão de 3 h. O rendimento do OE foi expresso em % (g 100 g⁻¹ de massa fresca da parte aérea). A caracterização química foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), em equipamento GC-MS QP 2010 SE

(Shimadzu), com injetor automático AOC-20i. As amostras (10 μL) foram diluídas em 1000 μL de diclorometano (Anidrol), e 1 μL da solução foi injetado em coluna SH-RTx-5MS (30 $\text{m} \times 0,25 \text{ mm id}$; 0,25 μm ; 5% fenilmetilsiloxano), com fluxo de hélio a 1,0 mL min^{-1} (split 2:1). A temperatura da coluna foi programada de 40 $^{\circ}\text{C}$ a 300 $^{\circ}\text{C}$, com incremento de 6 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. As temperaturas do injetor e da interface foram mantidas a 250 $^{\circ}\text{C}$. Os espectros de massa foram obtidos em 70 eV, com varredura de m/z 50 a 550 amu.

2.7. Análises antioxidantes

As amostras de óleo essencial (OE) foram preparadas na concentração de 1 mg mL^{-1} e avaliadas quanto à capacidade de eliminação dos radicais DPPH, ABTS⁺ e FRAP, todas realizadas em triplicata independente.

A eliminação do radical DPPH foi determinada segundo Silveira et al. (2018), utilizando 150 μL da amostra e 5,85 mL de solução etanólica de DPPH (0,06 mM). A mistura foi incubada por 30 minutos em repouso, no escuro e à temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis (Kasuki) a 515 nm. Uma curva de calibração foi construída com Trolox (1000–50 μM) apresentando relação linear descrita pela equação $y = -0,5987x + 647,7$, com $R^2 = 0,9951$, e os resultados foram expressos em μM equivalentes de Trolox (μM Trolox).

A capacidade de eliminação do radical ABTS⁺ foi avaliada conforme Re et al. (1999), utilizando 10 μL da amostra e 1,0 mL do radical ABTS⁺. A reação foi mantida no escuro por 6 minutos à temperatura ambiente e a leitura da absorbância foi feita a 734 nm. A curva de calibração foi obtida com Trolox (2000–100 μM) apresentando relação linear descrita pela equação $y = -0,2983x + 597,17$, com $R^2 = 0,9951$, e os resultados foram expressos em μmol de Trolox por grama de OE ($\mu\text{mol Trolox gOE}^{-1}$).

O ensaio FRAP foi realizado conforme Santos et al. (2016), com modificações. Foram utilizados 90 μL da amostra, 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP (preparado com tampão acetato 0,3 M pH 3,6, TPTZ 10 mM em HCl 40 mM e FeCl_3 20 mM, na proporção 10:1:1). A mistura foi incubada a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 30 min, e a leitura foi feita a 595 nm. A capacidade antioxidante foi determinada por curva de calibração com sulfato ferroso (100–2000 μM) apresentando relação linear descrita pela equação $y = 0,3243x + 81,517$, com $R^2 = 0,9945$, sendo os resultados expressos em μmol de Fe^{2+} por grama de OE ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ gOE}^{-1}$).

2.8. Atividade antimicrobiana do óleo essencial

O ensaio antimicrobiano foi realizado em triplicatas independentes pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2009), com adaptações para óleos essenciais, utilizando *Bacillus subtilis* (CCCD B005), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (CCCD S007). O óleo essencial foi solubilizado em água estéril com 1% de Tween 80 e distribuído em microplacas contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Kasvi), obtendo-se concentrações finais entre 20 mg mL⁻¹ e 0,039 mg mL⁻¹ por diluições seriadas. As suspensões bacterianas foram ajustadas ao padrão 0,5 McFarland, e 5 µL foram adicionados a cada poço. Tween 80 a 1% foi utilizado como controle negativo. As microplacas foram incubadas a 36 °C por 24 h, seguidas da adição de 20 µL de 2,3,5-trifeniltetrazólio cloreto (TCC) a 2% e nova incubação por 2 h. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial que inibiu visivelmente o crescimento microbiano.

2.9. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à ANOVA, com comparação de médias pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no IBM SPSS Statistics® 22. O heat map e a Análise de Componentes Principais (PCA) foram obtidos por meio do SRplot (Tang et al., 2023).

3. Resultados e discussão

Este estudo representa, até onde se tem conhecimento, a primeira abordagem integrando parâmetros de crescimento vegetal, atributos biológicos do substrato e características químicas do óleo essencial (OE) para avaliar os efeitos da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e *Azospirillum brasilense* em *Cymbopogon winterianus*.

Tabela 1. Valores de *p* para ANOVA *two-way* das variáveis do substrato e plantas de citronela inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*, e *Azospirillum brasilense* (Az).

Variáveis	Az	FMAs	Az x FMAs
Colonização radicular por FMA (%)	<0,001	<0,001	0,059
Carbono da biomassa microbiana ($\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$) – CBM	0,109	0,059	0,060
Respiração basal do substrato ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) – RBS	0,083	0,101	<0,001
Quociente metabólico do substrato ($\mu\text{g CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ C-microbiana h}^{-1}$) – $q\text{CO}_2$	0,001	0,001	0,012
Massa fresca da parte aérea (g) – MSPA	0,113	0,064	0,853
Massa fresca raiz (g) – MFR	0,247	0,071	0,039
Massa fresca total (g) – MFT	0,104	0,032	0,304
Massa seca da parte aérea (g) – MSPA	0,060	0,107	0,673
Massa seca da raiz (g) – MSR	0,773	0,156	0,046
Massa seca total (g) – MST	0,146	0,082	0,261
Número de perfilhos	0,109	0,004	0,231
Altura da planta (cm)	0,563	0,002	0,026
Diâmetro do caule (mm)	0,020	0,025	0,049
Índice de clorofila – IC	0,697	0,309	0,140
Teor de P na parte aérea da planta – PPA	0,054	0,200	0,300
Teor de N na parte aérea da planta – NPA	0,009	0,137	0,102
Eliminação de radicais livre ABTS ^{••} ($\mu\text{mol Troil g OE}^{-1}$)	0,002	<0,001	<0,001
Eliminação do radical DPPH ($\mu\text{M Troil mg OE}^{-1}$)	0,118	0,010	0,479
Poder de redução do íon ferro ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g OE}^{-1}$) – FRAP	<0,001	<0,001	<0,001

De modo geral, a inoculação com FMAs apresentou maior influência sobre as variáveis analisadas, afetando significativamente ($p \leq 0,05$) 9 das 19 variáveis avaliadas, enquanto *A.*

brasiliense influenciou 6 variáveis. A coinoculação (*A. brasiliense* + FMAs) resultou em efeitos significativos em 8 variáveis, evidenciando interações entre os microrganismos.

A análise de variância revelou que a resposta da citronela à inoculação microbiana é multifatorial e dependente da interação entre microrganismos e processos fisiológicos e bioquímicos da planta.

3.1. Colonização radicular por FMAs, determinação do carbono da biomassa microbiana, respiração basal e quociente metabólico do substrato

A colonização radicular por fungos micorrízicos arbusculares foi significativamente maior nos tratamentos com inoculação combinada, com destaque para T7, que apresentou o maior valor (45,87%). De modo geral, a coinoculação favoreceu o estabelecimento micorrízico em comparação ao controle e às inoculações isoladas (Tabela 2). Esse resultado pode estar relacionado à atuação de *A. brasiliense* na promoção do crescimento radicular, por meio da produção de fitormônios, aumentando o número de sítios de infecção disponíveis para os FMAs (Kejela, 2024). Assim, a interação entre bactéria e fungo pode ter favorecido a colonização micorrízica, especialmente nas fases iniciais do desenvolvimento vegetal (Meyer et al., 2024).

Tabela 2. Colonização radicular (%) (CR) por fungos micorrízicos (FMA) e carbono da biomassa microbiana (CBM, $\mu\text{g CO}_2 \text{g}^{-1}$), respiração basal do substrato (RBS, $\mu\text{g C-CO}_2 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) e quociente metabólico ($q\text{CO}_2$, $\mu\text{g CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{C-microbiana h}^{-1}$) de substrato de plantas de citronela inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum*, e *Azospirillum brasilense*.

Trat.	CR	CBM	RBS	$q\text{CO}_2$
T1	13,75±1,82b	162,48±4,94b	1,40±0,08bcd	8,65±0,52a
T2	20,71±3,08b	229,99±13,84a	1,59±0,07ab	7,09±0,56ab
T3	21,75±4,14b	201,76±4,94ab	1,73±0,05a	8,60±0,23a
T4	20,28±1,53b	240,75±33,64a	1,45±0,06bc	6,55±0,70b
T5	37,14±5,05a	233,63±18,55a	1,23±0,09cd	5,43±0,49b
T6	37,00±4,35a	222,62±10,73a	1,16±0,12d	5,37±0,73b
T7	45,87±2,62a	227,97±5,55a	1,27±0,08cd	5,63±0,44b
T8	44,83±5,11a	230,75±10,97a	1,35±0,08bcd	5,93±0,47b

Média ± erro padrão (n=8). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). T1: controle, T2: *Azospirillum brasilense*, T3: *Rhizophagus clarus*, T4: *Claroideoglomus etunicatum*, T5: *R. clarus* + *C. etunicatum*, T6: *A. brasiliense* + *R. clarus*, T7: *A. brasiliense* + *C. etunicatum*, T8: *A. brasiliense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*.

Apesar do aumento na colonização, não foram observados incrementos correspondentes na biomassa radicular ao final do cultivo, sugerindo que a intensidade da colonização nem sempre se traduz diretamente em maior crescimento radicular, podendo depender da disponibilidade de nutrientes e da dinâmica temporal da simbiose. Resultados semelhantes foram observados por Meyer et al. (2024), que relataram maior colonização micorrízica em fases iniciais, sem diferenças ao final do cultivo, embora com benefícios no acúmulo de nutrientes e na atividade biológica do solo.

A inoculação também influenciou significativamente a atividade microbiana do substrato. O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi superior nos tratamentos inoculados, com destaque para T4, indicando maior acúmulo de biomassa microbiana em relação ao controle. A respiração basal do substrato (RBS) foi mais elevada em T3 e T2, refletindo maior atividade metabólica microbiana nesses tratamentos. No entanto, o quociente metabólico (qCO_2) apresentou valores mais altos em T1 e T3, indicando menor eficiência no uso do carbono e possível condição de estresse microbiano (Lermen et al., 2015).

Por outro lado, os menores valores de qCO_2 observados nos tratamentos com coinoculação (FMAs e FMAs + *A. brasilense*) sugerem uma comunidade microbiana mais estável e eficiente, com melhor aproveitamento do carbono disponível. Esse padrão, associado ao aumento do CBM, indica que a inoculação favoreceu não apenas a atividade microbiana, mas também o equilíbrio metabólico da microbiota do substrato. Resultados semelhantes foram reportados por Lermen et al. (2019), que observaram aumento do CBM e redução do qCO_2 em capim-limão (*Cymbopogon citratus*) inoculado com *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*.

Adicionalmente, embora a RBS elevada em T3 indique intensa atividade biológica, o aumento concomitante do qCO_2 sugere que essa atividade ocorreu com menor eficiência energética, característica de comunidades microbianas em condições de maior demanda metabólica ou menor estabilidade (Feng et al., 2021). Em conjunto, esses resultados indicam que a coinoculação promoveu não apenas maior colonização radicular, mas também melhorias na eficiência funcional da microbiota do substrato, o que pode ter implicações diretas na disponibilidade de nutrientes e no desempenho das plantas.

3.2. Número de perfilhos, altura da planta, índice de clorofila e diâmetro do caule

O aumento significativo no número de perfilhos observado nos tratamentos T3, T5 e T8 sugere efeito positivo da inoculação, especialmente envolvendo a presença de FMAs, isolados ou em consórcio. Por outro lado, a altura das plantas não apresentou diferenças significativas entre a maioria dos tratamentos, enquanto as menores médias foram observados em T5 e T6, indicando que esse parâmetro pode ser menos responsivo à inoculação nas condições avaliadas. O diâmetro do caule foi superior em T6, evidenciando possível efeito sinérgico entre a bactéria promotora de crescimento e os FMAs nesse atributo, enquanto o IC não diferiu significativamente (Tabela 3).

Tabela 3. Número de perfilhos (n), altura da planta (cm), índice de clorofila (IC) e diâmetro do caule (mm) de plantas de citronela inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglosum etunicatum*, e *Azospirillum brasilense*.

Trat.	Número de perfilhos	Altura da planta	IC	Diâmetro do caule
T1	2,25±0,31ab	169,18±3,01a	33,84±1,15a	14,86±0,95b
T2	1,42±0,20c	162,05±5,64a	33,91±1,36a	14,09±0,75b
T3	2,37±0,26a	161,72±2,87a	33,62±0,55a	13,87±0,99b
T4	1,43±0,20c	171,13±4,06a	37,40±1,55a	11,75±1,12b
T5	2,43±0,78a	144,57±7,77b	33,86±1,18a	13,00±0,65b
T6	1,86±0,26abc	145,54±3,35b	34,74±1,08a	18,53±1,82a
T7	1,50±0,22bc	169,68±3,41a	34,46±1,72a	14,92±1,08b
T8	2,50±0,22a	160,72±9,51a	36,99±1,33a	13,32±0,63b

Média ± erro padrão (n=8). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). T1: controle, T2: *Azospirillum brasilense*, T3: *Rhizophagus clarus*, T4: *Claroideoglosum etunicatum*, T5: *R. clarus* + *C. etunicatum*, T6: *A. brasilense* + *R. clarus*, T7: *A. brasilense* + *C. etunicatum*, T8: *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*.

Souza et al. (2022), observaram aumento na altura e no diâmetro do caule de *Cymbopogon citratus* com a inoculação de *A. brasilense*, isoladamente ou em coinoculação com FMAs, enquanto tratamentos com FMAs isolados não diferiram do controle. Nesse sentido, os efeitos observados podem estar relacionados à atuação de *A. brasilense* como bactéria promotora de crescimento de plantas, capaz de estimular o desenvolvimento vegetal por meio da produção de fitormônios e da modulação de genes associados à tolerância a estresses bióticos e abióticos (Fukami et al., 2017).

Adicionalmente, os FMAs desempenham papel fundamental na nutrição vegetal, especialmente na absorção de fósforo, o que contribui para o melhor estado nutricional e desenvolvimento das plantas (Mishra et al., 2016). A inoculação com FMAs também pode promover alterações funcionais na rizosfera, aumentando a retenção e a transformação de nutrientes por meio do enriquecimento de genes relacionados aos ciclos de carbono, nitrogênio, fósforo e potássio, proporcionando suporte nutricional em múltiplos níveis ao crescimento vegetal (Wen et al., 2025). Nesse contexto, a interação entre *A. brasilense* e FMAs pode resultar em efeitos complementares e sinérgicos, contribuindo para as respostas observadas nos parâmetros de crescimento.

3.3. Biomassa aérea e radicular

Os resultados da Tabela 4 mostram a massa fresca da parte aérea (MFPA) e a massa fresca da raiz (MFR), a massa fresca total (MFT), a massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e a massa seca total (MST) de plantas de citronela inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e *A. brasilense*.

Tabela 4. Massa fresca da parte aérea (MFPA, g), massa fresca da raiz (MSR, g) e massa fresca (MFT, g), massa seca da parte aérea (MSPA, g), massa seca da raiz (MSR, g) e massa seca total (MST, g) de plantas de citronela inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum*, e *Azospirillum brasilense*.

Trat.	MFPA	MFR	MFT	MSPA	MSR	MST
T1	62,27±7,02ab	41,63±2,19b	103,90±7,97b	16,74±2,03ab	9,27±0,41b	26,01±2,19b
T2	54,03±6,30ab	40,15±8,57b	94,19±11,08b	13,48±1,50b	10,99±2,01b	24,48±2,58b
T3	56,68±7,39ab	42,75±4,15b	99,43±10,66b	15,23±2,04ab	11,35±1,04b	26,58±2,84b
T4	50,53±5,01b	34,05±2,51b	84,58±7,21b	13,48±1,25b	8,05±0,47b	21,53±1,70b
T5	75,00±8,11a	60,94±6,93a	135,95±14,18a	20,68±2,48a	14,17±1,84a	34,86±4,12a
T6	46,86±9,73b	42,91±3,61b	89,77±13,24b	12,72±2,76b	10,56±1,15b	23,28±3,86b
T7	49,67±4,50b	40,80±3,00b	90,47±5,10b	13,47±1,02b	10,38±1,17b	23,85±1,60b
T8	61,58±5,10ab	39,80±1,34b	101,39±5,94b	15,66±1,55ab	9,90±0,49b	25,56±1,92b

Média ± erro padrão (n=8). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). T1: controle, T2: *Azospirillum brasilense*, T3: *Rhizophagus clarus*, T4: *Claroideoglossum etunicatum*, T5: *R. clarus* + *C. etunicatum*, T6: *A. brasilense* + *R. clarus*, T7: *A. brasilense* + *C. etunicatum*, T8: *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*.

A produção de massa fresca e seca da parte aérea, radicular e total foi influenciada positivamente pelo T5 que diferiu significativamente dos demais tratamentos (Tabela 4). Esse resultado pode estar associado ao aumento do carbono da biomassa microbiana (CBM) e à redução do quociente metabólico observados em T5, indicando maior atividade microbiana e eficiência no uso do carbono. Além disso, pode estar relacionado à complementaridade funcional entre essas espécies, com potencial incremento na disponibilidade de nutrientes para as plantas.

Segundo Begum et al. (2019), a inoculação com FMAs pode aprimorar a fotossíntese e outras funções foliares, resultando em um crescimento mais vigoroso e em maior acúmulo de biomassa. Esse efeito está relacionado à melhora na absorção de elementos essenciais, como nitrogênio e fósforo, e ao aumento do transporte de carbono das partes aéreas para as raízes, o que estimula o desenvolvimento e a formação de tecidos de reserva.

Sob a perspectiva agrônômica e industrial, o desempenho superior observado em T5 demonstra que a coinoculação de espécies de FMAs pode ser explorada como tecnologia biológica para otimizar a produção vegetal, especialmente em sistemas com menor dependência de fertilizantes sintéticos. Esse incremento de biomassa representa vantagem direta para o setor produtivo, uma vez que está associado à maior disponibilidade de matéria-prima para extração de óleo, podendo impactar positivamente a eficiência do processo e o retorno econômico.

3.4. Fósforo e nitrogênio da parte aérea

Os teores mais elevados de P na parte aérea (PPA) foram observados nos tratamentos T2, T3 e T6 com inoculação simples e conjunta (*A. brasilense* e *R. clarus* isolados ou em conjunto) (Tabela 5). Esses resultados podem estar relacionados à otimização das rotas de absorção de P, seja pela via micorrízica, no caso dos FMAs (Chen et al., 2017), ou pela maior exploração radicular e liberação de compostos solubilizantes induzidos por *A. brasilense* (Sun et al., 2022). A ausência de incremento de P nos demais tratamentos com coinoculação pode indicar um possível equilíbrio competitivo entre os microrganismos simbiotes, como relatado na meta-análise, onde a aplicação combinada de FMAs não aumentou a concentração de P nas plantas em experimentos de laboratório (Wu et al., 2024).

Tabela 5. Teores de fósforo (PPA) e nitrogênio (NPA) (mg kg^{-1}) na parte aérea de citronela inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Azospirillum brasilense*.

Trat.	PPA	NPA
T1	3,86±0,25b	12,25±0,68c
T2	5,48±0,46a	16,35±1,22ab
T3	5,53±0,73a	16,25±0,62ab
T4	4,56±0,22ab	16,21±0,78ab
T5	4,25±0,19ab	14,00±1,15bc
T6	5,42±0,32a	16,90±1,32ab
T7	5,08±0,74ab	15,91±1,59ab
T8	4,85±0,48ab	17,50±0,53a

Média ± erro padrão (n=8). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). T1: controle, T2: *Azospirillum brasilense*, T3: *Rhizophagus clarus*, T4: *Claroideoglossum etunicatum*, T5: *R. clarus* + *C. etunicatum*, T6: *A. brasilense* + *R. clarus*, T7: *A. brasilense* + *C. etunicatum*, T8: *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*.

Em relação ao teor de N na parte aérea (NPA), observou-se que os tratamentos com *A. brasilense* apresentaram valores superiores ao controle, com destaque para T8, que obteve os resultados mais expressivos (Tabela 5). Esses resultados corroboram com estudos anteriores que relataram o potencial do *A. brasilense* em promover a fixação biológica de N e a produção de fitormônios que estimulam o desenvolvimento radicular e a absorção de nutrientes (Souza et al., 2022; Fernandes et al., 2023). O incremento no teor de N nas folhas de plantas inoculadas tem sido amplamente associado à contribuição do N fixado biologicamente e à maior eficiência de assimilação nutricional decorrente da interação planta-bactéria (Saikia et al., 2014).

3.5. Heat map, combinado com o agrupamento hierárquico e Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando parâmetros do substrato e da planta

O heat map combinado com o agrupamento hierárquico (Figura 1A), revelou perfis distintos entre os tratamentos, utilizando parâmetros da qualidade do solo, colonização radicular por FMAs, a produção de biomassa da planta e N e P na parte aérea, sendo que a inoculação com os FMAs *R. clarus* + *C. etunicatum* (T5), formou um grupo distinto, seguido do controle não inoculado (T1) e este, distinto dos demais tratamentos.

A Análise de Componentes Principais (PCA) explicou 78,7% da variância total, com os dois primeiros componentes principais (PC1 = 50,1% e PC2 = 28,6%), e, claramente, pode-se observar, novamente, que a inoculação com os FMAs *R. clarus* + *C. etunicatum* (T5) foi distinta, seguida do controle não inoculado (T1) (Figura 1B). A formação desse agrupamento distinto em T5 pode estar associada à complementaridade funcional entre as espécies de FMAs, que podem apresentar diferenças na eficiência de colonização, no transporte de nutrientes e na indução de respostas fisiológicas da planta hospedeira.

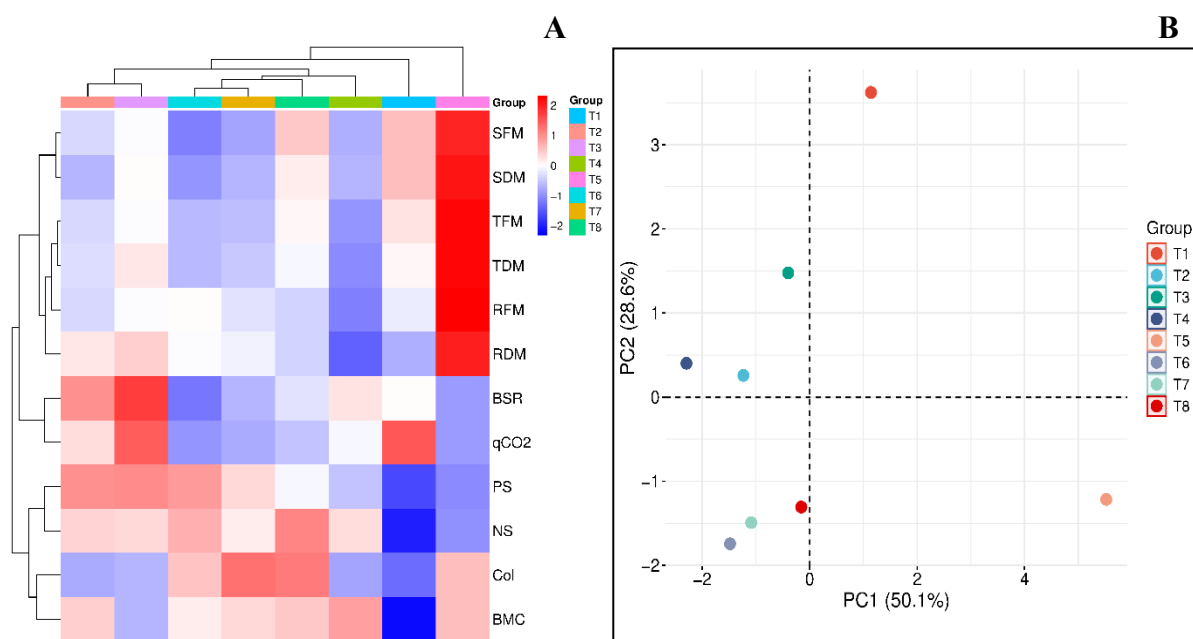


Figura 1. Heat map combinado com o agrupamento hierárquico (A) e a Análise de Componentes Principais (PCA) (B) revelaram perfis distintos entre os tratamentos, utilizando parâmetros de solo e de planta analisados em citrônella. T1: controle, T2: *Azospirillum brasilense*, T3: *Rhizophagus clarus*, T4: *Claroideoglomus etunicatum*, T5: *R. clarus* + *C. etunicatum*, T6: *A. brasilense* + *R. clarus*, T7: *A. brasilense* + *C. etunicatum*, T8: *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*.

Os FMAs *C. etunicatum* e *R. clarus* estão entre as espécies mais empregadas na formulação de inoculantes micorrízicos comerciais, utilizados isoladamente ou em consórcio, conforme levantamentos realizados em nove países (Basiru et al., 2021). Os efeitos benéficos associados à inoculação com FMAs estão amplamente relacionados ao aumento da absorção de macro e micronutrientes, uma vez que suas hifas extrarradiculares se expandem além da zona de rizosfera, explorando volumes de solo inacessíveis às raízes e ampliando a área de absorção. Os inoculantes também proporcionam melhoria da resistência a estresses abióticos, otimização

do metabolismo secundário, produtividade e qualidade das plantas hospedeiras (Basiru et al., 2021).

3.6. Identificação química do óleo essencial por CG/EM

Foram identificados 24 compostos no OE de *C. winterianus*, e os compostos majoritários foram citronelal (50,66-38,90%), geraniol (19,70-3,12%) e citronelol (14,21-4,94%) (Tabela 6). O citronelal apresentou as maiores concentrações em todos os tratamentos, com destaque para o grupo controle (T1), que registrou 50,664%.

Os tratamentos com inoculação apresentaram redução na concentração de citronelal, com o menor valor (38,902%) observado em T8. Por outro lado, compostos como geraniol e citronelol apresentaram variações significativas. O geraniol teve seu maior percentual (19,709%) no tratamento com inoculação dupla de *R. clarus* + *C. etunicatum* (T5), enquanto o menor valor (3,121%) foi observado na combinação tripla (T8). O citronelol obteve maior concentração em T2 (14,212%) e menor concentração em T8 (4,942%).

O citronelal é um composto de aroma cítrico característico que apresenta ampla atividade biológica. Destaca-se por seu forte potencial antioxidante, ação antimicrobiana e por efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores demonstrados em estudos *in vitro* e *in vivo* e pode inibir o crescimento de células cancerígenas, além de apresentar efeitos cardioprotetores. Considerado seguro em pesquisas pré-clínicas, o citronelal não mostrou toxicidade significativa, embora doses muito elevadas possam gerar efeitos moderadamente tóxicos (Rokonuzzman et al., 2025).

Geraniol apresenta atividade antimicrobiana e propriedades antioxidantes relevantes com diversas aplicações em cosméticos (Fajdek-Bieda et al., 2024) e o citronelol também apresenta uma ampla gama de atividades biológicas já reconhecidas, incluindo efeitos antibacterianos, antifúngicos, antiespasmódicos, anti-inflamatórios, antinociceptivos, anticonvulsivantes e ansiolíticos, além de ser considerado um terpeno com baixa toxicidade (Santos et al., 2019).

Tabela 6. Composição química do óleo essencial (%) de citronela inoculada ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum* e *Azospirillum brasilense*.

TR	Composto	RI ^C	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
8.476	D-Limonene	1034	2,358	1,242	1,986	1,573	2,370	0,757	0,897	1,548
10.319	Linalool	1108	0,646	0,679	0,534	0,574	0,496	0,600	0,600	-
11.446	Isopulegol	1157	0,593	0,250	0,358	0,233	0,369	0,297	0,248	-
11.596	Citronelal	1163	50,664	47,924	45,027	48,026	42,113	45,680	46,713	38,902
13.438	Citronelol	1322	12,276	14,212	13,022	12,008	11,649	12,181	10,851	4,942
14.067	Geraniol	1337	16,549	18,503	17,791	16,944	19,709	17,820	17,091	3,121
14.383	2,6-Octadienal, 3,7-dimethyl-, (Z)-	1344	0,530	0,714	0,523	0,666	0,569	0,625	0,538	-
16.118	2,6-Octadiene, 2,6-dimethyl-	1381	3,904	3,397	4,574	4,900	4,417	4,658	4,878	8,068
16.798	2,6-Octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, acetate, (Z)-	1394	3,408	3,084	3,972	5,271	4,542	4,865	4,420	8,696
18.392	Humulene	-	-	-	-	-	-	-	-	0,307
18.979	Germacrene D	1492	3,059	2,011	3,341	2,891	3,490	3,037	3,388	10,449
19.661	γ -Muuroolene 1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,5,6,8a-	1527	-	-	-	-	-	-	-	0,577
19.798	hexahydronaphthalene	1534	2,262	1,440	2,151	1,779	2,471	1,814	1,729	4,565
20.967	Germacrene D-4-ol	1592	3,033	5,060	5,936	4,653	4,667	5,539	6,748	10,420
21.581	6,11-Dimethyl-2,6,10-dodecatrien-1-ol	1613	-	-	-	-	-	-	-	0,591
21.592	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-, (Z,E)-	1613	0,223	-	-	-	-	-	-	-
22.272	tau-Muurolol	1633	-	1,269	-	-	2,295	1,555	1,189	3,859
23.589	2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimethyl-	1669	0,242	0,215	0,405	0,265	0,495	0,314	0,335	1,216
23.961	2,6,10-Dodecatrienal, 3,7,11-trimethyl-, (E,E)-	1679	-	-	-	-	-	-	-	0,334
27.329	Geranyl caprylate	2027	-	-	-	-	-	-	-	0,779
28.344	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	2038	0,253	-	-	-	-	-	-	-
28.351	Cyclopropanemethanol, 2-methyl-2-(4-methyl-3-pentenyl)-	2038	-	-	0,380	0,218	0,346	-	0,376	1,319
28.358	2,6,11-Tridecatrien-10-ol, 2,6,10-trimethyl-	2038	-	-	-	-	-	0,257	-	-
44.534	9,19-Cyclolanost-24-en-3-ol, acetate, (3.beta.)-	2649	-	-	-	-	-	-	-	0,305

TR: tempo de retenção (min); RI^C: índice de retenção calculado a partir de uma série homóloga de n-alcanos (C8–C40) em uma coluna DB-5. T1: controle, T2: *Azospirillum brasilense*, T3: *Rhizophagus clarus*, T4: *Claroideoglossum etunicatum*, T5: *R. clarus* + *C. etunicatum*, T6: *A. brasilense* + *R. clarus*, T7: *A. brasilense* + *C. etunicatum*, T8: *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*.

Compostos como Germacrene D-4-ol e Germacrene D também apresentaram variações relevantes. O primeiro atingiu 10,420% em T8, enquanto o segundo foi mais abundante (10,449%) no mesmo tratamento. Já a presença de compostos ausentes nos tratamentos controle e isolados, mas detectados em combinações (como Humulene, tau-Muurolol e Geranyl caprylate), indica possível indução de vias metabólicas específicas em resposta à inoculação múltipla.

De forma semelhante ao presente estudo, Guirão-Neto et al., 2025 identificaram no total 12 compostos no OE de *C. winterianus*. O aldeído monoterpênico citronelal (40,32%) seguido pelos álcoois monoterpênicos geraniol (26,77%) e citronelol (8,64%) foram identificados como compostos majoritários, sendo que esses álcoois representaram cerca de 35% da composição final do óleo essencial.

Uma metanálise demonstrou que a inoculação com FMA aumenta os princípios ativos medicinais em aproximadamente 27%, com incrementos expressivos em flavonoides (68%) e terpenoides (53%), sobretudo em raízes, reforçando que o estímulo micorrízico direciona recursos fisiológicos para a produção de metabólitos de maior valor farmacológico (Yuan et al., 2023). De forma complementar, combinações entre FMA e bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) podem criar um microambiente bioativo capaz de induzir vias metabólicas específicas relacionadas à síntese de metabólitos secundários (Yang et al., 2025).

3.7. *Rendimento e caracterização química do óleo essencial*

Um levantamento bibliográfico de 95 artigos científicos que avaliaram a composição do OE de citronela foi realizado no presente estudo (Tabela 7). O rendimento do OE de citronela foi maior em T1 (1,21%) seguido de T7 e T6 e variou de 0,15% a 1,21% ficando um pouco abaixo da média relatada na literatura (1,35%) para a citronela (179 observações e erro padrão $\pm 0,05$) (Tabela 7). Essa variação pode estar associada a fatores como condições de cultivo, manejo nutricional e interação com microrganismos do solo, que influenciam diretamente o metabolismo secundário das plantas (Aqeel et al., 2023).

Além disso, foram encontrados 309 casos da presença de citronelal com um teor médio de 33,37% (erro padrão $\pm 0,61$), variando de 4,18% a 67,10%. No presente estudo o teor médio de citronelal foi de 45,63%, indicando um perfil químico compatível com óleos de maior valor comercial, uma vez que esse composto está diretamente associado às propriedades bioativas e ao valor de mercado do produto.

Tabela 7. Rendimento do óleo essencial e caracterização química (%) dos compostos majoritários da citronela inoculada ou não com fungos micorrízicos *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum* e *Azospirillum brasilense*.

Trat.	Citronelal	Citronelol	Geraniol	Rendimento
T1	50,66	12,28	16,55	1,21a
T2	47,92	14,21	18,51	0,73e
T3	45,03	13,02	17,79	0,82d
T4	48,03	12,01	16,94	0,97c
T5	42,11	11,65	19,71	0,85d
T6	45,68	12,18	17,82	1,03b
T7	46,71	10,85	17,09	1,04b
T8	38,91	4,94	3,12	0,15f
Os dados foram compilados a partir de 95 artigos.				
Média	33,37	11,95	22,13	1,35
Erro padrão	0,61	0,20	0,42	0,05
Faixa	4,18-67,10	4,50-27,00	6,10-50,10	0,41-4,24
n	309	303	292	179

T1: controle, T2: *Azospirillum brasilense*, T3: *Rhizophagus clarus*, T4: *Claroideoglomus etunicatum*, T5: *R. clarus* + *C. etunicatum*, T6: *A. brasilense* + *R. clarus*, T7: *A. brasilense* + *C. etunicatum*, T8: *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*. Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Devido ao baixo rendimento dos óleos essenciais em geral, práticas de adulteração comercial, como a adição de óleos vegetais ou a mistura com óleos de menor valor, são frequentemente relatadas (Ojha et al., 2022). Nesse contexto, estratégias que promovam o aumento do rendimento e a padronização da composição química do OE tornam-se altamente relevantes. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a inoculação com microrganismos pode contribuir para esses objetivos, especialmente quando associada a melhorias na atividade microbiana do substrato e no estado nutricional das plantas.

Resultados semelhantes foram observados por Lermen et al. (2024), que relataram influência dos teores de fósforo e da inoculação com FMAs (*Rhizophagus clarus* e *Claroideoglomus etunicatum*) sobre a composição química e concentração de metabólitos secundários em *C. citratus* (capim-limão), reforçando o papel da interação entre nutrição mineral e microbiota na regulação da produção de óleo essencial.

3.8. Capacidade antioxidante do óleo essencial

A capacidade antioxidante medida pelos métodos ABTS⁺, DPPH e FRAP variou amplamente conforme o tipo de inoculação empregada (Tabela 8). Os maiores valores de atividade antioxidante pelo método ABTS⁺ e FRAP foram observados no tratamento T5, diferindo significativamente dos demais, enquanto no ensaio DPPH, destacaram-se T6 e T7.

Tabela 8. Atividade antioxidante de eliminação de radicais livres ABTS⁺ ($\mu\text{M Trol mg OE}^{-1}$), eliminação do radical DPPH ($\mu\text{M Trol mg OE}^{-1}$) e poder de redução do íon ferro FRAP ($\mu\text{M Fe}^{2+} \text{ mg OE}^{-1}$) do óleo essencial de plantas de citronela inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Azospirillum brasilense*.

Trat.	ABTS ⁺	DPPH	FRAP
T1	89,96±2,23d	320,19±0,96c	4,51±0,02e
T2	107,84±8,43d	321,31±0,55bc	8,68±1,02e
T3	160,36±8,72b	325,76±0,55abc	188,55±7,19b
T4	134,33±1,96c	324,09±0,55abc	105,80±3,60d
T5	179,92±10,64a	327,99±2,00ab	326,29±23,64a
T6	132,99±2,90c	329,10±3,10a	139,22±5,14c
T7	148,07±5,80bc	329,66±3,09a	190,61±5,43b
T8	109,52±4,83d	327,43±0,91ab	12,26±2,38e

Média ± erro padrão (n=3). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$). T1: controle, T2: *Azospirillum brasilense*, T3: *Rhizophagus clarus*, T4: *Claroideoglossum etunicatum*, T5: *R. clarus* + *C. etunicatum*, T6: *A. brasilense* + *R. clarus*, T7: *A. brasilense* + *C. etunicatum*, T8: *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*.

Estudos com *C. winterianus* relatam que o OE e os extratos etanólicos desta espécie exibem forte capacidade antioxidante, e essa atividade tem sido atribuída à composição química (Wahyuni et al., 2024; Leite et al., 2010). Nesse sentido, o aumento relativo de geraniol e a presença de outros monoterpenos oxigenados em sinergia em T5 podem ter contribuído para sua maior capacidade antioxidante nos ensaios de ABTS⁺ e FRAP.

Grupos funcionais como carbonila, hidroxila e alceno, presentes no OE de citronela, apresentam elevada capacidade de doação de elétrons, o que contribui para o seu potencial antioxidante, especialmente em sistemas redox, como o ensaio FRAP (Phewphong et al. 2025). Já o método ABTS⁺ avalia a capacidade de neutralização de radicais em sistemas hidrofílicos e

lipofílicos (Cano et al., 2023), enquanto o ensaio DPPH baseia-se na capacidade de compostos antioxidantes em doar hidrogênios lábeis (H^+), promovendo a redução do radical DPPH (Nasir Shah et al., 2023). Assim, diferentes perfis químicos podem favorecer respostas específicas dependendo do método empregado, o que pode explicar os maiores valores observados em tratamentos distintos.

Sob a perspectiva aplicada, os resultados indicam que a inoculação com FMAs, especialmente em consórcio, pode ser uma estratégia promissora para a obtenção de OEs com maior valor agregado, ao aumentar o rendimento e melhorar as propriedades bioativas, como a atividade antioxidante.

3.9. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do OE foi avaliada contra as cepas de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, e os resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM) são apresentados na Tabela 9.

O OE apresentou maior atividade frente à bactéria Gram-positiva *B. subtilis*, com CIM de $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ nos tratamentos com inoculações isoladas (T2, T3 e T4) e duplas (T5, T6 e T7) e $4,17 \text{ mg mL}^{-1}$ no tratamento controle não inoculado (T1). Na inoculação tripla (T8), não foi observada atividade antimicrobiana do OE, com crescimento bacteriano na concentração máxima testada ($>20 \text{ mg mL}^{-1}$).

Para *S. aureus*, outra bactéria Gram-positiva, a atividade foi mais limitada, sendo observada apenas em T2, com uma CIM de 10 mg mL^{-1} . Nas demais concentrações, o crescimento bacteriano foi mantido mesmo em concentrações elevadas, o que sugere uma menor suscetibilidade dessa cepa ao OE.

Em relação à *E. coli*, bactéria Gram-negativa, não foi observada atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações avaliadas, indicando uma CIM superior a 20 mg mL^{-1} .

Resultados semelhantes foram relatados por Rathore et al. (2023), que também observaram ausência de sensibilidade das bactérias Gram-negativas *E. coli* e Gram-positivas *S. aureus*, além de uma atividade limitada frente às Gram-positivas *B. subtilis* e *Micrococcus luteus* no OE de *C. winterianus*. Esses achados reforçam que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de citronela está fortemente associada à composição química, predominantemente formada por

monoterpenos oxigenados, especialmente citronelal, geraniol e citronelol (Rokonuzzman et al., 2025).

Tabela 9. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) (mg mL^{-1}) do óleo essencial de citronela inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum* e *Azospirillum brasilense*.

Trat.	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
T1	4,17±0,83	>20	>20
T2	2,50±0,00	>20	10,00±0,00
T3	2,50±0,00	>20	>20
T4	2,50±0,00	>20	>20
T5	2,50±0,00	>20	>20
T6	2,50±0,72	>20	>20
T7	2,50±0,72	>20	>20
T8	>20,00±0,00	>20	>20

Média ± erro padrão (n=3). T1: controle, T2: *Azospirillum brasilense*, T3: *Rhizophagus clarus*, T4: *Claroideoglossum etunicatum*, T5: *R. clarus* + *C. etunicatum*, T6: *A. brasilense* + *R. clarus*, T7: *A. brasilense* + *C. etunicatum*, T8: *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*.

Estudos de Guimarães et al. (2019) identificaram que compostos como geraniol e citronelol apresentaram ação rápida contra *E. coli* e *S. Typhimurium*, atribuindo esse desempenho ao baixo peso molecular e à presença de grupos funcionais polares, que favorecem a penetração na membrana celular externa. Contudo, a resistência das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas também exerce papel relevante. Em Gram-positivas, a espessa camada de peptidoglicano pode reduzir a penetração de agentes antimicrobianos (Wahyuni et al., 2024). Já em Gram-negativas, a presença de membrana externa rica em lipopolissacarídeos funciona como barreira adicional, limitando o acesso de compostos lipofílicos do óleo essencial (Nazzaro et al., 2013).

Portanto, a maior sensibilidade de *B. subtilis* frente ao OE de citronela pode refletir uma combinação de alta concentração de monoterpenos ativos e menor barreira estrutural, enquanto a ausência de efeito contra *E. coli* pode ser explicada devido à complexidade da membrana externa associada à baixa solubilidade dos compostos dominantes no óleo.

3.10. Heat map combinado com o agrupamento hierárquico e Análise de Componentes Principais (PCA) com base na atividade antioxidante, rendimento do óleo essencial e nos compostos majoritários

O heat map combinado com o agrupamento hierárquico (Figura 2A) revelou perfis distintos entre os tratamentos usando a atividade antioxidante, o rendimento de OE e os três compostos majoritários (citronelal, citronelol e geraniol), sendo que a inoculação de *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum* (T8), formou um grupo distinto dos demais tratamentos. Observou-se um agrupamento entre citronelol e geraniol, enquanto o rendimento do óleo essencial e a produção de citronelal (composto majoritário) agruparam-se conjuntamente e apresentaram associação com as atividades antioxidantes (Figura 2A).

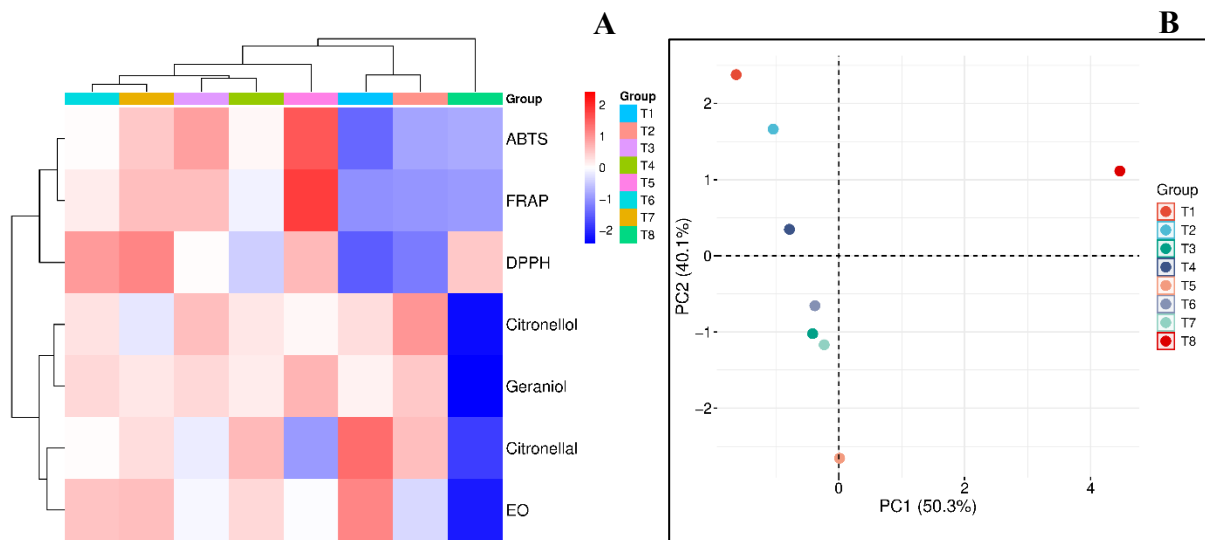


Figura 2. O heat map, combinado com o agrupamento hierárquico (A) e a Análise de Componentes Principais (PCA) (B), revelou perfis distintos entre os tratamentos que utilizam a atividade antioxidante, o rendimento do óleo essencial (OE) e os três principais compostos da citronela. T1: controle, T2: *Azospirillum brasilense*, T3: *Rhizophagus clarus*, T4: *Claroideoglomus etunicatum*, T5: *R. clarus* + *C. etunicatum*, T6: *A. brasilense* + *R. clarus*, T7: *A. brasilense* + *C. etunicatum*, T8: *A. brasilense* + *R. clarus* + *C. etunicatum*.

A Análise de Componentes Principais (PCA) explicou 90,4% da variância total, sendo os dois primeiros componentes principais (PC1 = 50,3% e PC2 = 40,1%), e pode-se observar que o tratamento com inoculação simultânea de *A. brasilense*, *R. clarus* e *C. etunicatum* (T8) apresentou um perfil claramente distinto dos demais (Figura 2B). Essa separação não refletiu um efeito

sinérgico positivo, mas sim um desempenho menos significativo, já que T8 apresentou o menor rendimento de OE e as menores concentrações dos compostos majoritários.

O aumento dos metabólitos secundários depende da combinação específica de microrganismos e da planta hospedeira. Por exemplo, *C. etunicatum* mostrou a melhor resposta em capim-limão, quando comparado a *R. clarus* e *A. brasilense* (da Cruz et al., 2020). Em alguns casos, a coinoculação não resulta em efeitos sinérgicos, podendo até reduzir a produção de determinados compostos e a eficácia geral, devido à competição por recursos ou incompatibilidade funcional (Bilgili, 2025).

4. Conclusão

Entre os tratamentos avaliados, a coinoculação com os FMAs *Rhizophagus clarus* + *Claroideoglossum etunicatum* (T5) apresentou o melhor desempenho nas variáveis avaliadas. Esse tratamento resultou nos maiores acúmulos de biomassa fresca e seca da parte aérea, das raízes e total, além de promover elevada colonização radicular e melhora consistente nos indicadores microbianos do substrato.

O T5 também se destacou pela eficiência na absorção de P e pelos valores mais elevados de atividade antioxidante (ABTS⁺ e FRAP). Além disso, promoveu incremento expressivo no teor de geraniol e apresentou atividade antimicrobiana relevante contra *Bacillus subtilis*. Por outro lado, os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense*, isoladamente ou em coinoculação, foram menos consistentes nas condições avaliadas, sugerindo que sua eficiência pode depender de fatores específicos do sistema de cultivo e das interações com outros microrganismos.

Em conjunto, os resultados indicam que a coinoculação com *Rhizophagus clarus* e *Claroideoglossum etunicatum* constitui uma estratégia biotecnológica promissora para o manejo sustentável da citronela, contribuindo para o aumento da produtividade e da qualidade do óleo essencial, em alinhamento às demandas do mercado por produtos naturais de maior valor agregado.

5. Referências

- Anderson, T.H., Domsch, K.H. 1993. The metabolic quotient for CO₂ ($q\text{CO}_2$) as a specific parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 25, 393–395. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90140-7).
- Aqeel, U., Aftab, T., Khan, M.M.A., Naeem, M. 2023. Regulation of essential oil in aromatic plants under changing environment. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants*, 32, 100441. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100441>.
- Basiru, S., Mwanza, H.P., Hijri, M. 2021. Analysis of arbuscular mycorrhizal fungal inoculant benchmarks. *Microorganisms*, 9, 81. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010081>.
- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M.A., Raza, S., Khan, M.I., Ashraf, M., Ahmed, N., Zhang, L. 2019. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 10, 1068. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01068>.
- Bilgili, A. 2025. The effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal species (*Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus intraradices*, and *Claroideoglossum etunicatum*) in the biocontrol of root and crown rot pathogens, *Fusarium solani* and *Fusarium* mixture in pepper. *PeerJ*, 13, e18438. <https://doi.org/10.7717/peerj.18438>.
- Cano, A., Maestre, A.B., Hernández-Ruiz, J., Arnao, M.B. 2023. ABTS/TAC Methodology: Main Milestones and Recent Applications. *Processes*, 11, 185. <https://doi.org/10.3390/pr11010185>.
- Chen, S., Zhao, H., Zou, C., Li, Y., Chen, Y., Wang, Z., Jiang, Y., Liu, A., Zhao, P., Wang, M., Ahammed, G.J. 2017. Combined inoculation with multiple arbuscular mycorrhizal fungi improves growth, nutrient uptake and photosynthesis in cucumber seedlings. *Front. Microbiol.* 8, 2516. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02516>.
- CLSI. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, 8th ed. CLSI document M07-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

- da Cruz, R.M.S., Alberton, O., da Silva Lorencete, M., da Cruz, G.L.S., Gasparotto-Junior, A., Cardozo-Filho, L., de Souza, S.G.H. 2020. Phytochemistry of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting bacteria. *Ind. Crops Prod.* 149, 112340. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112340>.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária—EMBRAPA. Atlas Climático da Região Sul do Brasil, 2nd ed.; Embrapa: Brasília, Brazil, 2012; 334p.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.04.001>.
- Fajdek-Bieda, A., Pawlińska, J., Wróblewska, A., Łuś, A. 2024. Evaluation of the antimicrobial activity of geraniol and selected geraniol transformation products against Gram-positive bacteria. *Molecules*, 29, 950. <https://doi.org/10.3390/molecules29050950>.
- Feng, J., Zeng, X.M., Zhang, Q., Zhou, X.Q., Liu, Y.R., Huang, Q. 2021. Soil microbial trait-based strategies drive metabolic efficiency along an altitude gradient. *ISME Commun.* 1, 71. <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00076-2>.
- Fernandes, A.M., da Silva, J.A., Eburneo, J.A.M., Leonel, M., Garreto, F.G.S., Nunes, J.G.S. 2023. Growth and nitrogen uptake by potato and cassava crops can be improved by *Azospirillum brasilense* inoculation and nitrogen fertilization. *Horticulturae*, 9, 301. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030301>.
- Fukami, J., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M. 2017. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. *AMB Expr.* 7, 153. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>.
- Giovannetti, M., Mosse, B.A., 1980. Evaluation of techniques for measuring VA mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489–500. <http://www.jstor.org/stable/2432123>.

- Guimarães, A.C., Meireles, L.M., Lemos, M.F., Guimarães, M.C.C., Endringer, D.C., Fronza, M., Scherer, R. 2019. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24, 2471. <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>.
- Guirão-Neto, C.A.C., Richter, C., Prasilde, I.C.M., Canuto, K.M., da Cunha, M.E.T., Moerschbacher, B.M., Rocha, M.V.P. 2025. *Cymbopogon winterianus* essential oil as an alternative source for producing terpenic esters with potential plant-protective antifungal activity using lipase immobilized on a lignin composite. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 69, 103746. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103746>.
- Higuchi, C.T., Sales, C.C., Andréo-Filho, N., Martins, T.S., Ferraz, H.O., Santos, Y.R., Lopes, P.S., Grice, J.E., Benson, H.A.E., Leite-Silva, V.R. 2023. Development of a nanotechnology matrix-based citronella oil insect repellent to obtain a prolonged effect and evaluation of the safety and efficacy. *Life*, 13, 141. <https://doi.org/10.3390/life13010141>.
- Israel, A., Langrand, J., Fontaine, J., Lounès-Hadj Sahraoui, A. 2022. Significance of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating abiotic environmental stress in medicinal and aromatic plants: A review. *Foods*, 11, 2591. <https://doi.org/10.3390/foods11172591>.
- Jenkinson, D.S., Powlson, D.S. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil–V: A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8, 209–213. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90005-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90005-5).
- Kejela, T. 2024. Phytohormone-producing rhizobacteria and their role in plant growth. New insights into phytohormones. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.1002823>.
- Khalid, M., Saeed, UR., Hassani, D., Hayat, K., Pei, Z., Nan, H. 2021. Advances in fungal-assisted phytoremediation of heavy metals: A review. *Pedosphere*, 31, 475–495. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(20\)60091-1](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(20)60091-1).
- Leite, B.L.S., Bonfim, R.R., Antonioli, A.R., Thomazzi, S.M., Araújo, A.A.S., Blank, A.F., Estevam, C.S., Cambui, E.V.F., Bonjardim, L.R., Albuquerque-Júnior, R.L.C., Quintans-Júnior, L.J. 2010. Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. *Pharm. Biol.* 48, 1164–1169. <https://doi.org/10.3109/13880200903280000>.

- Lermen, C., da Cruz, R.M.S., de Souza Gonçalves, C.H., da Cruz, G.L.S., da Silva, G.P.A., Alberton, O. 2019. Growth of lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi (*Rhizophagus clarus* and *Claroideoglossum etunicatum*) under contrasting phosphorus levels. *Aust. J. Crop Sci.* 13, 266–271.
- Lermen, C., da Cruz, R.M.S., de Souza Gonçalves, C.H., Pinc, M.M., Otênio, J.K., da Silva, C., Alberton, O. 2024. Essential oil phytochemistry and antifungal activity of lemongrass inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different phosphorus levels. *Rhizosphere*, 32, 100968. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100968>.
- Lermen, C., Mohr, F.B.M., Alberton, O. 2015. Growth of *Cymbopogon citratus* inoculated with mycorrhizal fungi under different levels of lead. *Sci. Hortic.* 186, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.02.029>.
- Meyer, E., Stoffel, S.C.G., de Almeida, A.F.N., do Amaral Scarsanella, J., Vieira, A.S., Ventura, B.S., Canei, A.D., Bortolini, J.G., de Faria, S.M., Soares, C.R.F.S., Lovato, P.E. 2024. *Rhizophagus intraradices* and *Azospirillum brasilense* improve growth of herbaceous plants and soil biological activity in revegetation of a recovering coal-mining area. *Braz. J. Microbiol.* 55, 2827–2837. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01390-2>.
- Mishra, V., Gupta, A., Kaur, P., Singh, S., Singh, N., Gehlot, P., Singh, J. 2016. Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria in bioremediation of iron-contaminated soils. *Int. J. Phytoremediation*, 18, 697–703. <https://doi.org/10.1080/15226514.2015.1131231>.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>.
- Nasir Shah, S., Khan, I., Tul Muntaha, S., Hayat, A., Ur Rehman, M., Ali Shah, T., Siddique, F., Salamatullah, A.M., Mekonnen, A.B., Bourhia, M. 2023. Bioactive, antioxidant and antimicrobial properties of chemically fingerprinted essential oils extracted from *Eucalyptus globulus*: *in-vitro* and *in-silico* investigations. *Front. Chem.* 11, 1287317. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1287317>.

- Ojha, P.K., Poudel, D.K., Rokaya, A., Satyal, R., Setzer, W.N., Satyal, P. 2022. Comparison of volatile constituents present in commercial and lab-distilled frankincense (*Boswellia carteri*) essential oils for authentication. *Plants*, 11, 2134. <https://doi.org/10.3390/plants11162134>.
- Phewphong, S., Roschat, W., Jandaruang, J., Leelatam, T., Arthan, S., Poomsuk, N., Thammayod, A., Maneerat, B., Namthaisong, A., Siriwong, K., Promarak, V. 2025. Analysis of volatile organic compounds, antioxidant, tyrosinase inhibitory, and antimicrobial activities of essential oils from citronella grass and kaffir lime. *Trends Sci.*, 22, 9434. <https://doi.org/10.48048/tis.2025.9434>.
- Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55, 157–160.
- Piasecki, B., Biernasiuk, A., Skiba, A., Skalicka-Woźniak, K., Ludwiczuk, A. 2021. Composition, anti-MRSA activity and toxicity of essential oils from *Cymbopogon* species. *Molecules*, 26, 7542. <https://doi.org/10.3390/molecules26247542>.
- Rammal, M., Kara, M., Badran, A., Haidar, C., Zahreddine, H., Bassal, H., Bechelany, M., El-Dakdouki, M.H., Hijazi, A. 2025. Phytochemical profiling, antioxidant activity, food preservation, and insecticidal properties of *Origanum syriacum* and *Cymbopogon winterianus* extracts. *Foods*, 14, 1347. <https://doi.org/10.3390/foods14081347>.
- Rathore, S., Mukhia, S., Kumar, R., Kumar, R. 2023. Essential oil composition and antimicrobial potential of aromatic plants grown in the mid-hill conditions of the Western Himalayas. *Sci. Rep.* 13, 4878. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31875-3>.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
- Rokonuzzman, M., Bhuia, M.S., Al-Qaaneh, A.M., El-Nashar, H.A.S., Islam, T., Chowdhury, R., Shanto, H.H., Hasan, S.A., El-Shazly, M., Torequl-Islam, M. 2025. Biomedical perspectives of citronella: Biological activities, toxicological profile and molecular mechanisms. *Chem. Biodivers.* 22, e202401973. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202401973>.

- Saharan, B.S., Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci. Med. Res.*, 21, 30.
- Saikia, S.P., Goswami, A., Mudoi, K.D., Gogoi, A., Kotoky, R., Lekhak, H., Handique, N. 2014. Effect of 2,4-D treatment and *Azospirillum* inoculation on growth of *Cymbopogon winterianus*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 8, 955–960. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6130>.
- Santos, K.A., Klein, E.J., Gazim, Z.C., Gonçalves, J.E., Cardozo-Filho, L., Corazza, M.L., da Silva, E.A. 2016. Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythopappus*): Supercritical CO₂ oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *J. Supercrit. Fluids*, 114, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.02.015>.
- Santos, P.L., Matos, J.P.S., Picot, L., Almeida, J.R., Quintans, J.S., Quintans-Junior, L.J. 2019. Citronellol, a monoterpene alcohol with promising pharmacological activities: A systematic review. *Food Chem. Toxicol.* 123, 459–469. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.030>.
- Sedikelo, G.K., Lenetha, G.G., Malebo, N.J. 2022. Chromatography-mass spectrometry and chemical characteristics of *Thymus zygis* and *Cymbopogon winterianus* essential oils: Possible insect repellents. *Sci. Afr.* 15, e01095. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2022.e01095>.
- Silva, F.C., 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp. 627, Distrito Federal.
- Silveira, A.C., Kassuia, Y.S., Domahovski, R.C., Lazzarotto, M., Silveira, M.D.U., Kassuia, Y.S., Domahovski, R.C. 2018. Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos de erva-mate de forma rápida e reprodutível. Embrapa, Colombo.
- Souza, B.C., da Cruz, R.M.S., Lourenço, E.L.B., Pinc, M.M., Dalmagro, M., da Silva, C., Nunes, M.G.I.F., Souza, S.G.H., Alberton, O. 2022. Inoculation of lemongrass with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria alters plant growth and essential oil production. *Rhizosphere*, 22, 100514. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100514>.

- Sun, D., Shang, X., Cao, H., Lee, S.-J., Wang, L., Gan, Y., Feng, S. 2024. Physio-Biochemical Mechanisms of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Enhancing Plant Resistance to Abiotic Stress. *Agriculture*, 14, 2361. <https://doi.org/10.3390/agriculture14122361>.
- Sun, N., Huang, L., Zhao, H., Zhang, N., Lin, X., Sun, C. 2022. Beneficial bacterium *Azospirillum brasilense* induces morphological, physiological and molecular adaptation to phosphorus deficiency in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 63, 1273–1284. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcac101>.
- Tang, D., Chen, M., Huang, X., Zhang, G., Zeng, L., Zhang, G., Wu, S., Wang, Y. 2023. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS One*, 18, e0294236. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294236>.
- Tate, K.R., Ross, D.J., Feltham, C.W. 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial-C: effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biol. Biochem.* 20, 329-335. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90013-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90013-2).
- Urcoviche, R.C., Gazim, Z.C., Dragunski, D.C., Barcellos, F.G., Alberton, O. 2015. Plant growth and essential oil content of *Mentha crispa* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of phosphorus. *Ind. Crops Prod.* 67, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.016>.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass-C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 703-707. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6).
- Wahyuni, D.K., Kharisma, V.D., Murtadlo, A.A.A., Rahmawati, C.T., Syukriya, A.J., Prasongsuk, S., Subramaniam, S., Wibowo, A.T., Purnobasuki, H. 2024. The antioxidant and antimicrobial activity of ethanolic extract in roots, stems, and leaves of three commercial *Cymbopogon* species. *BMC Complement. Med. Ther.* 24, 272. <https://doi.org/10.1186/s12906-024-04573-4>.
- Wen, S., Sun, J., Zeng, W., Xiang, H., Zhao, M., Xiang, D. 2025. Effects of different arbuscular mycorrhizal fungi on tobacco seedling growth and their rhizosphere microecological mechanisms. *BMC Plant. Biol.* 25, 1578. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-07600-9>.

- Wu, Y., Chen, C., Wang, G. 2024. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi improves plant biomass and nitrogen and phosphorus nutrients: A meta-analysis. *BMC Plant Biol.* 24, 960. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05638-9>.
- Yang, S., Yuan, T., Duan, T., Zhu, H., Zhang, X., Zhang, H., Jiang, J., Yang, J., Hu, L., Yu, Y., Zhang, L., Yuan, Z. 2025. Integrated omics analysis of PGPR and AMF effects on soil microbiota and root metabolites in *Isatis indigotica*. *Front. Microbiomes*, 4, 1709335. <https://doi.org/10.3389/frmbi.2025.1709335>.
- Yuan, M.L., Zhang, M.H., Shi, Z.Y., Yang, S., Zhang, M.G., Wang, Z., Wu, S.W., Gao, J.K. 2023. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance active ingredients of medicinal plants: A quantitative analysis. *Front. Plant Sci.* 14, 1276918. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1276918>.
- Zeffa, D.M., Perini, L.J., Silva, M.B., Sousa, N.V., Scapim, C.A., Oliveira, A.L.M., Amaral Júnior, A.T., Gonçalves, L.S.A. 2019. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *PLoS One*, 14, e0215332. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>.
- Zhao, J., Fan, Y., Cheng, Z., Kennelly, E.J., Long, C. 2024. Ethnobotanical uses, phytochemistry and bioactivities of *Cymbopogon* plants: A review. *J. Ethnopharmacol.* 330, 118181. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118181>.

Agradecimentos

Agradecemos à CAPES, à UNIPAR e ao CNPq pelo apoio financeiro por meio das bolsas e do financiamento de pesquisa, fundamentais para a realização deste trabalho.

Anexo:

Normas referentes aos Capítulos I e II da tese que será submetida à revista *Rhizosphere*.

About the journal**Aims and scope**

Note: the journal will no longer consider descriptions of new rhizobacteria isolates.

Rhizosphere is a multidisciplinary journal that publishes research on the interactions between **plant roots, soil organisms, nutrients, and water**. Except carbon fixation by photosynthesis, plants obtain all other elements primarily from soil through roots. *Rhizosphere* aims to advance the frontier of our understanding of **plant-soil interactions**.

Scientists are beginning to understand how communications at the rhizosphere, with soil organisms and other plant species, affect root exudates and nutrient uptake. This rapidly evolving subject utilizes molecular biology and genomic tools, food web or community structure manipulations, high performance liquid chromatography, isotopic analysis, diverse spectroscopic analytics, tomography and other microscopy, complex statistical and modeling tools.

Field experiments, microcosm experiments, and soil-free research are considered. Research papers, technical or method papers, reviews, and commentaries are welcome. Papers discussing informative negative results are also considered.

Article types

Regular Research Paper, Review Article, Short Communication, Opinion Paper, Feature Article, Book Review.

Regular papers

Original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, may be submitted as regular papers.

Short Communication

These short papers should not exceed 1800 words, excluding references and legends. The manuscript should be in a continuous form without sections such as Introduction, Materials and methods, Results and Discussion. However, a Cover page, Abstract and a list of Keywords are required at the beginning of the communication, and Acknowledgements and References at the end. Submissions should include a short abstract of less than 150 words that focuses on the main conclusion of the work, placed in context. Figures and tables are limited to no more than four combined. References should be limited to 15–20 citations. Occasionally authors may use subtitles of their own choice to organize sections of the text.

Opinion paper

Opinion papers are peer reviewed but provide authors with broad scope to express their opinion, at the discretion of the handling editor. Authors may submit a critical perspective, or a novel synthesis on any subject covered by the Aims and Scope. The manuscript text (excluding references) should not exceed 4000 words.

Review Article

Reviews are not limited in length, but if your document is unusually lengthy (more than twenty published pages) contact the Editor-in-Chief. Reviews are particularly useful if they bring together information scattered in different disciplines or in diverse journals. In rapidly evolving subjects, timely reviews are very useful if they provide an opinionated synthesis. Translating technical subjects into more accessible vocabulary for a more diverse audience is sometimes beneficial. Literature surveys are not acceptable as a review, unless they provide critical and analytical insight.

Peer review

This journal follows a double anonymized review process. Your submission will initially be assessed by our editors to determine suitability for publication in this journal. If your submission is deemed suitable, it will typically be sent to a minimum of two reviewers for an independent expert assessment of the scientific quality. The decision as to whether your article is accepted or rejected will be taken by our editors. Authors who wish to appeal the editorial decision for their manuscript may submit a formal appeal request in accordance with the procedure outlined in [Elsevier's Appeal Policy](#). Only one appeal per submission will be considered and the appeal decision will be final.

Read more about [peer review](#).

Our editors are not involved in making decisions about papers which:

- they have written themselves.
- have been written by family members or colleagues.
- relate to products or services in which they have an interest.

Any such submissions will be subject to the journal's usual procedures and peer review will be handled independently of the editor involved and their research group. Read more about [editor duties](#).

Special issues and article collections

The peer review process for special issues and article collections follows the same process as outlined above for regular submissions, except, a guest editor will send the submissions out to the reviewers and may recommend a decision to the journal editor. The journal editor oversees the peer review process of all special issues and article collections to ensure the high standards of

publishing ethics and responsiveness are respected and is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles.

Open access

We refer you to our [open access information page](#) to learn about open access options for this journal.

Ethics and policies

Ethics in publishing

Authors must follow ethical guidelines stated in [Elsevier's Publishing Ethics Policy](#).

Submission declaration

When authors submit an article to an Elsevier journal it is implied that:

- the work described has not been published previously except in the form of a preprint, an abstract, a published lecture, academic thesis or registered report. See our policy on [multiple, redundant or concurrent publication](#).
- the article is not under consideration for publication elsewhere.
- the article's publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out.
- if accepted, the article will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder.

To verify compliance with our journal publishing policies, we may check your manuscript with our screening tools.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following:

1. The conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data.
2. Drafting the article or revising it critically for important intellectual content.
3. Final approval of the version to be submitted.

Authors should appoint a corresponding author to communicate with the journal during the editorial process. All authors should agree to be accountable for all aspects of the work to ensure that the questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Changes to authorship

The editors of this journal generally will not consider changes to authorship once a manuscript has been submitted. It is important that authors carefully consider the authorship list and order of authors and provide a definitive author list at original submission.

The policy of this journal around authorship changes:

- All authors must be listed in the manuscript and their details entered into the submission system.
- Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should only be made prior to acceptance, and only if approved by the journal editor.
- Requests to change authorship should be made by the corresponding author, who must provide the reason for the request to the journal editor with written confirmation from all authors, including any authors being added or removed, that they agree with the addition, removal or rearrangement.
- Only in exceptional circumstances will the journal editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors post acceptance.
- Publication of the manuscript may be paused while a change in authorship request is being considered.
- Any authorship change requests approved by the journal editor will result in a corrigendum if the manuscript has already been published.
- Any unauthorised authorship changes may result in the rejection of the article, or retraction, if the article has already been published.

Declaration of interests

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence or bias their work. Examples of potential competing interests include:

- Employment
- Consultancies
- Stock ownership
- Honoraria
- Paid expert testimony
- Patent applications or registrations
- Grants or any other funding

The Declaration of Interests tool should always be completed.

Authors with no competing interests to declare should select the option, "I have nothing to declare".

The resulting Word document containing your declaration should be uploaded at the "attach/upload files" step in the submission process. It is important that the Word document is saved in the .doc/.docx file format. Author signatures are not required.

We advise you to read our [policy on conflict of interest statements, funding source declarations, author agreements/declarations and permission notes](#).

Funding sources

Authors must disclose any funding sources who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article. The role of sponsors, if any, should be declared in relation to the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and decision to submit the article for publication. If funding sources had no such involvement this should be stated in your submission.

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants, scholarships and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Declaration of generative AI in scientific writing

Authors must declare the use of generative AI in scientific writing upon submission of the paper. The following guidance refers only to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process:

- Generative AI and AI-assisted technologies should only be used in the writing process to improve the readability and language of the manuscript.
- The technology must be applied with human oversight and control and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. Authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.
- Authors must not list or cite AI and AI-assisted technologies as an author or co-author on the manuscript since authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans.

The use of generative AI and AI-assisted technologies in scientific writing must be declared by adding a statement at the end of the manuscript when the paper is first submitted. The statement will appear in the published work and should be placed in a new section before the references list. An example:

- Title of new section: Declaration of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process.

- Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the published article.

The declaration does not apply to the use of basic tools, such as tools used to check grammar, spelling and references. If you have nothing to disclose, you do not need to add a statement.

Please read Elsevier's author policy on the use of generative AI and AI-assisted technologies, which can be found in our [GenAI Policies for journals](#).

Please note: to protect authors' rights and the confidentiality of their research, this journal does not currently allow the use of generative AI or AI-assisted technologies such as ChatGPT or similar services by reviewers or editors in the peer review and manuscript evaluation process, as is stated in our [GenAI Policies for journals](#). We are actively evaluating compliant AI tools and may revise this policy in the future.

Preprints

Preprint sharing

Authors may share preprints in line with Elsevier's [article sharing policy](#). Sharing preprints, such as on a preprint server, will not count as prior publication.

We advise you to read our policy on [multiple, redundant or concurrent publication](#).

Free preprint posting on SSRN

In support of [open science](#) this journal offers authors a free preprint posting service on [SSRN](#) to ensure early registration and dissemination of research and facilitate early citations and collaboration. Posting to SSRN is subject to SSRN's standard checks.

You will be provided with the option to release your manuscript on SSRN during the submission process. Agreeing to this option will have no effect on the editorial process or outcome, and your manuscript will remain publicly available and free to read on SSRN whether our editors accept or reject your manuscript.

You will receive an email when your preprint is posted online on SSRN and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned.

Corresponding authors must seek approval from all co-authors before agreeing to release a manuscript publicly on SSRN.

We advise you to read about [SSRN](#), including the [SSRN Terms of Use](#) and [SSRN FAQs](#) before selecting this option.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Authors should ensure their work uses inclusive language throughout and contains nothing which might imply one individual is superior to another on the grounds of:

- age
- gender
- race
- ethnicity
- culture
- sexual orientation
- disability or health condition

We recommend avoiding the use of descriptors about personal attributes unless they are relevant and valid. Write for gender neutrality with the use of plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default. Wherever possible, avoid using "he, she," or "he/she."

No assumptions should be made about the beliefs of readers and writing should be free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions.

These guidelines are meant as a point of reference to help you identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

There is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender. We offer the following guidance:

- Sex and gender-based analyses (SGBA) should be integrated into research design when research involves or pertains to humans, animals or eukaryotic cells. This should be done in accordance with any requirements set by funders or sponsors and best practices within a field.
- Sex and/or gender dimensions of the research should be addressed within the article or declared as a limitation to the generalizability of the research.
- Definitions of sex and/or gender applied should be explicitly stated to enhance the precision, rigor and reproducibility of the research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer.

We advise you to read the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER checklist \(PDF\)](#) on the EASE website, which offer systematic approaches to the use of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation.

For further information we suggest reading the rationale behind and recommended [use of the SAGER guidelines](#).

Definitions of sex and/or gender

We ask authors to define how sex and gender have been used in their research and publication. Some guidance:

- Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features such as chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy. A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth") and is in most cases based solely on the visible external anatomy of a newborn. In reality, sex categorizations include people who are intersex/have differences of sex development (DSD).
- Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society.

Jurisdictional claims

Elsevier respects the decisions taken by its authors as to how they choose to designate territories and identify their affiliations in their published content. Elsevier's policy is to take a neutral position with respect to territorial disputes or jurisdictional claims, including, but not limited to, maps and institutional affiliations. For journals that Elsevier publishes on behalf of a third party owner, the owner may set its own policy on these issues.

- Maps: Readers should be able to locate any study areas shown within maps using common mapping platforms. Maps should only show the area actually studied and authors should not include a location map which displays a larger area than the bounding box of the study area. Authors should add a note clearly stating that "*map lines delineate study areas and do not necessarily depict accepted national boundaries*". During the review process, Elsevier's editors may request authors to change maps if these guidelines are not followed.
- Institutional affiliations: Authors should use either the full, standard title of their institution or the standard abbreviation of the institutional name so that the institutional name can be independently verified for research integrity purposes.

Writing and formatting

File format

We ask you to provide editable source files for your entire submission (including figures, tables and text graphics). Some guidelines:

- Save files in an editable format, using the extension .doc/.docx for Word files and .tex for LaTeX files. A PDF is not an acceptable source file.
- Lay out text in a single-column format.
- Use spell-check and grammar-check functions to avoid errors.

We advise you to read our [Step-by-step guide to publishing with Elsevier](#).

Title page

You are required to include the following details in the title page information:

- Article title. Article titles should be concise and informative. Please avoid abbreviations and formulae, where possible, unless they are established and widely understood, e.g., DNA).
- Author names. Provide the given name(s) and family name(s) of each author. The order of authors should match the order in the submission system. Carefully check that all names are accurately spelled. If needed, you can add your name between parentheses in your own script after the English transliteration.
- Affiliations. Add affiliation addresses, referring to where the work was carried out, below the author names. Indicate affiliations using a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the corresponding address. Ensure that you provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the email address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence for your article at all stages of the refereeing and publication process and also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about your results, data, methodology and materials. It is important that the email address and contact details of your corresponding author are kept up to date during the submission and publication process.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in your article was carried out, or the author was visiting during that time, a "present address" (or "permanent address") can be indicated by a footnote to the author's name. The address where the author carried out the work must be retained as their main affiliation address. Use superscript Arabic numerals for such footnotes.

Abstract

You are required to provide a concise and factual abstract which does not exceed 250 words. The abstract should briefly state the purpose of your research, principal results and major conclusions. Some guidelines:

- Abstracts must be able to stand alone as abstracts are often presented separately from the article.
- Avoid references. If any are essential to include, ensure that you cite the author(s) and year(s).
- Avoid non-standard or uncommon abbreviations. If any are essential to include, ensure they are defined within your abstract at first mention.

Keywords

You are required to provide 1 to 7 keywords for indexing purposes. Keywords should be written in English. Please try to avoid keywords consisting of multiple words (using "and" or "of").

We recommend that you only use abbreviations in keywords if they are firmly established in the field.

Highlights

You are encouraged to provide article highlights at submission.

Highlights are a short collection of bullet points that should capture the novel results of your research as well as any new methods used during your study. Highlights will help increase the discoverability of your article via search engines. Some guidelines:

- Submit highlights as a separate editable file in the online submission system with the word "highlights" included in the file name.
- Highlights should consist of 3 to 5 bullet points, each a maximum of 85 characters, including spaces.

We encourage you to view example [article highlights](#) and read about the benefits of their inclusion.

Tables

Tables must be submitted as editable text, not as images. Some guidelines:

- Place tables next to the relevant text or on a separate page(s) at the end of your article.
- Cite all tables in the manuscript text.
- Number tables consecutively according to their appearance in the text.
- Please provide captions along with the tables.
- Place any table notes below the table body.
- Avoid vertical rules and shading within table cells.

We recommend that you use tables sparingly, ensuring that any data presented in tables is not duplicating results described elsewhere in the article.

Figures, images and artwork

Figures, images, artwork, diagrams and other graphical media must be supplied as separate files along with the manuscript. We recommend that you read our detailed [artwork and media instructions](#). Some excerpts:

When submitting artwork:

- Cite all images in the manuscript text.
- Number images according to the sequence they appear within your article.
- Submit each image as a separate file using a logical naming convention for your files (for example, Figure_1, Figure_2 etc).
- Please provide captions for all figures, images, and artwork.
- Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX, text graphics may also be embedded in the file.

Artwork formats

When your artwork is finalized, "save as" or convert your electronic artwork to the formats listed below taking into account the given resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations:

- Vector drawings: Save as EPS or PDF files embedding the font or saving the text as "graphics."
- Color or grayscale photographs (halftones): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 300 dpi (for single column: min. 1063 pixels, full page width: 2244 pixels).
- Bitmapped line drawings: Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 1000 dpi (for single column: min. 3543 pixels, full page width: 7480 pixels).
- Combinations bitmapped line/halftones (color or grayscale): Save as TIFF, JPG or PNG files using a minimum of 500 dpi (for single column: min. 1772 pixels, full page width: 3740 pixels).

Please do not submit:

- files that are too low in resolution (for example, files optimized for screen use such as GIF, BMP, PICT or WPG files).
- disproportionately large images compared to font size, as text may become unreadable.

Figure captions

All images must have a caption. A caption should consist of a brief title (not displayed on the figure itself) and a description of the image. We advise you to keep the amount of text in any image to a minimum, though any symbols and abbreviations used should be explained.

Provide captions in a separate file.

Color artwork

If you submit usable color figures with your accepted article, we will ensure that they appear in color online.

Please ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision. Learn more about [color and web accessibility](#).

For articles appearing in print, you will be sent information on costs to reproduce color in the printed version, after your accepted article has been sent to production. At this stage, please indicate if your preference is to have color only in the online version of your article or also in the printed version.

Generative AI and Figures, images and artwork

Please read our policy on the use of generative AI and AI-assisted tools in figures, images and artwork, which can be found in Elsevier's [GenAI Policies for Journals](#). This policy states:

- We do not permit the use of Generative AI or AI-assisted tools to create or alter images in submitted manuscripts.
- The only exception is if the use of AI or AI-assisted tools is part of the research design or methods (for example, in the field of biomedical imaging). If this is the case, such use must be described in a reproducible manner in the methods section, including the name of the model or tool, version and extension numbers, and manufacturer.

- The use of generative AI or AI-assisted tools in the production of artwork such as for graphical abstracts is not permitted. The use of generative AI in the production of cover art may in some cases be allowed, if the author obtains prior permission from the journal editor and publisher, can demonstrate that all necessary rights have been cleared for the use of the relevant material, and ensures that there is correct content attribution.

Supplementary material

We encourage the use of supplementary materials such as applications, images and sound clips to enhance research. Some guidelines:

- Cite all supplementary files in the manuscript text.
- Submit supplementary materials at the same time as your article. Be aware that all supplementary materials provided will appear online in the exact same file type as received. These files will not be formatted or typeset by the production team.
- Include a concise, descriptive caption for each supplementary file describing its content.
- Provide updated files if at any stage of the publication process you wish to make changes to submitted supplementary materials.
- Do not make annotations or corrections to a previous version of a supplementary file.
- Switch off the option to track changes in Microsoft Office files. If tracked changes are left on, they will appear in your published version.

We recommend you upload research data to a suitable specialist or generalist repository. Please read our guidelines on [sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

Video

This journal accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. We encourage you to include links to video or animation files within articles. Some guidelines:

- When including video or animation file links within your article, refer to the video or animation content by adding a note in your text where the file should be placed.
- Clearly label files ensuring the given file name is directly related to the file content.
- Provide files in one of our [recommended file formats](#). Files should be within our preferred maximum file size of 150 MB per file, 1 GB in total.
- Provide "stills" for each of your files. These will be used as standard icons to personalize the link to your video data. You can choose any frame from your video or animation or make a separate image.
- Provide text (for both the electronic and the print version) to be placed in the portions of your article that refer to the video content. This is essential text, as video and animation files cannot be embedded in the print version of the journal.

We publish all video and animation files supplied in the electronic version of your article.

For more detailed instructions, we recommend that you read our [guidelines on submitting video content to be included in the body of an article](#).

Research data

We are committed to supporting the storage of, access to and discovery of research data, and our [research data policy](#) sets out the principles guiding how we work with the research community to support a more efficient and transparent research process.

Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Please read our [guidelines on sharing research data](#) for more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials.

For this journal, the following instructions from our [research data guidelines](#) apply.

Option C: Research data deposit, citation and linking

You are **required** to:

- Deposit your research data in a relevant data repository.
- Cite and link to this dataset in your article.
- If this is not possible, make a statement explaining why research data cannot be shared.

Data linking

Linking to the data underlying your work increases your exposure and may lead to new collaborations. It also provides readers with a better understanding of the described research.

If your research data has been made available in a data repository there are a number of ways your article can be linked directly to the dataset:

- Provide a link to your dataset when prompted during the online submission process.
- For some data repositories, a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.
- You can also link relevant data or entities within the text of your article through the use of identifiers. Use the following format: Database: 12345 (e.g. TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Learn more about [linking research data and research articles in ScienceDirect](#).

Research Elements

This journal enables the publication of research objects (e.g. data, methods, protocols, software and hardware) related to original research in [Elsevier's Research Elements journals](#).

Research Elements are peer-reviewed, open access journals which make research objects findable, accessible and reusable. By providing detailed descriptions of objects and their application with

links to the original research article, your research objects can be placed into context within your article.

You will be alerted during submission to the opportunity to submit a manuscript to one of the Research Elements journals. Your Research Elements article can be prepared by you, or by one of your collaborators.

Article structure

Article sections

Divide your manuscript into clearly defined sections covering all essential elements using headings.

Theory and calculation

The theory section should lay the foundation for further work by extending the background you provided in the introduction to your article. The calculation section should represent a practical development from a theoretical basis.

Glossary

Please provide definitions of field-specific terms used in your article, in a separate list.

Acknowledgements

Include any individuals who provided you with help during your research, such as help with language, writing or proof reading, in the acknowledgements section. Acknowledgements should be placed in a separate section which appears directly before the reference list. Do not include acknowledgements on your title page, as a footnote to your title, or anywhere else in your article other than in the separate acknowledgements section.

Author contributions: CRediT

Corresponding authors are required to acknowledge co-author contributions using CRediT (Contributor Roles Taxonomy) roles:

- Conceptualization
- Data curation
- Formal analysis
- Funding acquisition
- Investigation
- Methodology
- Project administration
- Resources
- Software
- Supervision
- Validation

- Visualization
- Writing – original draft
- Writing – review and editing

Not all CRediT roles will apply to every manuscript and some authors may contribute through multiple roles.

We advise you to read [more about CRediT](#) and [view an example of a CRediT author statement](#).

Funding sources

Authors must disclose any funding sources who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article. The role of sponsors, if any, should be declared in relation to the study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the report and decision to submit the article for publication. If funding sources had no such involvement this should be stated in your submission.

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants, scholarships and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Appendices

We ask you to use the following format for appendices:

- Identify individual appendices within your article using the format: A, B, etc.
- Give separate numbering to formulae and equations within appendices using formats such as Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc. and in subsequent appendices, Eq. (B.1), Eq. (B. 2) etc. In a similar way, give separate numbering to tables and figures using formats such as Table A.1; Fig. A.1, etc.

References

References within text

Any references cited within your article should also be present in your reference list and vice versa. Some guidelines:

- References cited in your abstract must be given in full.
- We recommend that you do not include unpublished results and personal communications in your reference list, though you may mention them in the text of your article.
- Any unpublished results and personal communications included in your reference list must follow the standard reference style of the journal. In substitution of the publication date add "unpublished results" or "personal communication."
- References cited as "in press" imply that the item has been accepted for publication.

Linking to cited sources will increase the discoverability of your research.

Before submission, check that all data provided in your reference list are correct, including any references which have been copied. Providing correct reference data allows us to link to abstracting and indexing services such as Scopus, Crossref and PubMed. Any incorrect surnames, journal or book titles, publication years or pagination within your references may prevent link creation.

We encourage the use of Digital Object Identifiers (DOIs) as reference links as they provide a permanent link to the electronic article referenced.

Web references

When listing web references, as a minimum you should provide the full URL and the date when the reference was last accessed. Additional information (e.g. DOI, author names, dates or reference to a source publication) should also be provided, if known.

You can list web references separately under a new heading directly after your reference list or include them in your reference list.

Data references

We encourage you to cite underlying or relevant datasets within article text and to list data references in the reference list.

When citing data references, you should include:

- author name(s)
- dataset title
- data repository
- version (where available)
- year
- global persistent identifier

Add [dataset] immediately before your reference. This will help us to properly identify the dataset. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

We ask you to mark preprints clearly. You should include the word "preprint" or the name of the preprint server as part of your reference and provide the preprint DOI.

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, use the formal publication as your reference.

If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but they are not yet formally published, you may reference the preprint.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in popular reference management software products. These include products that support Citation Style Language (CSL) such as Mendeley Reference Manager.

If you use a citation plug-in from these products, select the relevant journal template and all your citations and bibliographies will automatically be formatted in the journal style. We advise you to remove all field codes before submitting your manuscript to any reference management software product.

If a template is not available for this journal, follow the format given in examples in the reference style section of this Guide for Authors.

Journal specific information

Manuscripts should be prepared with numbered lines, with wide margins and double line spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc. should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections.

Submitting your manuscript

Submission checklist

Before completing the submission of your manuscript, we advise you to read our submission checklist:

- One author has been designated as the corresponding author and their full contact details (email address, full postal address and phone numbers) have been provided.
- All files have been uploaded, including keywords, figure captions and tables (including a title, description and footnotes) included.
- Spelling and grammar checks have been carried out.
- All references in the article text are cited in the reference list and vice versa.
- Permission has been obtained for the use of any copyrighted material from other sources, including the Web.
- For gold open access articles, all authors understand that they are responsible for payment of the article publishing charge (APC) if the manuscript is accepted. Payment of the APC may be covered by the corresponding author's institution, or the research funder.

Journal specific information

Discussion

Use sub-headings to organize your discussion. Explain the significance of each result, in context of the work of others that is relevant. A combined Results and Discussion section is not recommended. Avoid digressions, and excessive speculation.

Sequence data

Papers dealing with amino acid sequences of proteins or with nucleotide sequences must carry a statement that the data have been deposited with an appropriate data bank, e.g., the European Molecular Biology Laboratory (EMBL) or GenBank Data Libraries, PRIDE, etc. The database accession number must be given at the end of the Materials and Methods section of the manuscript under the separate heading 'Accession numbers'. For example: Coordinates and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank with accession number 2XYZ. Lengthy nucleotide sequences will be published only if, in the judgement of the Editorial Board, these results are of general interest and importance.

Cover letter

Authors should include a cover letter to the editors. If your rejected paper has been invited for re-submission by the editor, then please include information about your resubmission in the cover letter (including the submission number of the rejected paper and Handling Editor name) and rebuttals to the reviewer and editor's comments. Please note that re-submission of rejected papers, which have not been specifically invited to re-submit, is not endorsed.

After receiving a final decision

Publishing agreement

Authors will be asked to complete a publishing agreement after acceptance. The corresponding author will receive a link to the online agreement by email. We advise you to read [Elsevier's policies related to copyright](#) to learn more about our copyright policies and your, and your employer's/institution's, additional rights for subscription and gold open access articles.

License options

Authors will be offered [open access user license options](#) which will determine how you, and third parties, can reuse your gold open access article. We advise that you review these options and any funding body license requirements before selecting a license option.

Open access

We refer you to our [open access information page](#) to learn about open access options for this journal.

Permission for copyrighted works

If excerpts from other copyrighted works are included in your article, you must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) within your article using [Elsevier's permission request and license form](#) (Word).

Proof correction

To ensure a fast publication process we will ask you to provide proof corrections within two days.

Corresponding authors will be sent an email which includes a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to Word. You can edit text, comment on figures and tables and answer questions raised by our copy editor. Our web-based proofing service ensures a faster and less error-prone process.

You can choose to annotate and upload your edits on the PDF version of your article, if preferred. We will provide you with proofing instructions and available alternative proofing methods in our email.

The purpose of the proof is to check the typesetting, editing, completeness and correctness of your article text, tables and figures. Significant changes to your article at the proofing stage will only be considered with approval of the journal editor.

Responsible sharing

We encourage you to share and promote your article to give additional visibility to your work, enabling your paper to contribute to scientific progress and foster the exchange of scientific developments within your field. Read more about how to [responsibly share and promote your article](#).

Getting help and support

Author support

We recommend that you visit our [Journal Article Publishing Support Center](#) if you have questions about the editorial process or require technical support for your submission. Some popular FAQs:

- [How can I track the status of my submitted article?](#)
- [When will my article be published?](#)