



LETÍCIA DA SILVA RODRIGUES

**FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR NO CRESCIMENTO
E NA PRODUÇÃO DE CUMARINA EM *Mikania laevigata*
Shultz Bip. ex Baker**

**LAVRAS - MG
2025**

LETÍCIA DA SILVA RODRIGUES

**FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR NO CRESIMENTO E PRODUÇÃO DE
CUMARINA EM *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro

Coorientadora

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Coorientador

Dr. Arnon Afonso de Souza Cardoso

**LAVRAS-MG
2025**

**Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração
de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Rodrigues, Leticia da Silva.

Fungo micorrízico arbuscular no crescimento e na produção de cumarina em
Mikania laevigata Shultz Bip. ex Baker / Leticia da Silva Rodrigues. - 2025.
66 p. : il.

Orientador: Marco Aurelio Carbone Carneiro
Coorientadora: Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Coorientador: Arnon Afonso de Souza Cardoso

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.
Bibliografia.

1. Micorrizas. 2. Planta medicinal. 3. Metabólitos secundários. 4. Fitoquímica. I.
Aurelio Carbone Carneiro, Marco . II. Kelly Vilela Bertolucci, Suzan . III. Afonso
de Souza Cardoso, Arnon . IV. Universidade Federal de Lavras. V. Título.

LETÍCIA DA SILVA RODRIGUES

**FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR NO CRESIMENTO E PRODUÇÃO DE
CUMARINA EM *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker**

**ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGUS IN THE GROWTH AND
PRODUCTION OF COUMARIN IN *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Plantas Medicinais, Aromáticas e
Condimentares, para a obtenção do
título de Mestre.

APROVADA em 30 de outubro de 2025.

Prof. Dra. Luciane Vilela Resende
Dr. Orivaldo José Saggin Junior

UFLA Dra. Aline Oliveira Silva UFLA
EMBRAPA



Documento assinado digitalmente

MARCO AURELIO CARBONE CARNEIRO

Data: 01/12/2025 16:24:45-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Orientador

Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro

**LAVRAS
-MG 2025**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Maria Rodrigues e Fabiana das Graças da Silva Rodrigues, por todo amor, cuidado e incentivo. Vocês foram meu alicerce em todos os momentos mesmo nos dias mais difíceis.

Ao meu namorado, Rai de Souza Reis, minha profunda gratidão por estar ao meu lado com paciência, escuta e carinho. Seu apoio constante, me deu equilíbrio e segurança para seguir com confiança.

Ao professor Dr. Marco Aurélio Carbone, meu orientador, agradeço sinceramente pela orientação dedicada, pelos conselhos certos e pela confiança no meu potencial. Cada conversa foi uma oportunidade de crescimento.

Aos coorientadores Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci e Dr. Arnon Afonso de Souza Cardoso, muito obrigada pela contribuição valiosa ao longo da pesquisa. Os conhecimentos compartilhados e a disponibilidade de ambos foram fundamentais para a construção deste trabalho.

Aos amigos e familiares, deixo meu carinho e gratidão pelo incentivo constante, pelas palavras de ânimo e por celebrarem comigo cada pequena conquista.

Aos colegas do laboratório, obrigada pela parceria, pelas trocas sinceras e pelo aprendizado coletivo. Compartilhar o cotidiano da pesquisa com vocês tornou tudo mais leve e significativo.

Aos técnicos Paulo (Laboratório de Microbiologia do Solo) e Anete (Laboratório de Fitoquímica), minha gratidão pelo suporte técnico, pela paciência e pela disposição.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, obrigada por me acolherem e oferecerem um ambiente propício à formação científica e humana.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para que este trabalho se tornasse possível. Cada gesto de apoio, cada palavra de encorajamento ou troca de experiência ajudou a construir este caminho.

Este estudo contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O guaco (*Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker) é uma planta medicinal utilizada no tratamento de doenças respiratórias, como tosse e bronquite. Seus principais compostos bioativos incluem cumarina, ácidos clorogênico e dicafeoilquínico, além de óleos essenciais como germacreno D, óxido de cariofileno e spatulenol. Uma das estratégias para estimular a produção desses compostos é o manejo da microbiota do solo, sendo a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) uma prática promissora para favorecer o crescimento vegetal e a síntese de metabólitos secundários em plantas medicinais. Este estudo avaliou os efeitos da inoculação de *Rhizophagus clarus* sobre o crescimento, a produção de cumarina e a simbiose micorrízica em *M. laevigata* cultivada sob diferentes condições de solo (autoclavado ou não). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 2, com 10 repetições. Os fatores avaliados foram a inoculação com FMA (presença de inóculo – CF e ausência de inóculo – SF) e a condição do solo (autoclavado – SA e não autoclavado – SNA). Foram analisadas variáveis morfológicas (altura, número de folhas e biomassa aérea, radicular e total), teores de cumarina, colonização micorrízica e densidade de esporos. O tratamento com solo não autoclavado e inoculado (CFSNA) apresentou os melhores resultados, com biomassa total de 12,95 g, altura de 216,2 cm, 71,4 folhas, teor de cumarina de 0,83 mg, colonização micorrízica de 91,4% e densidade de 212,5 esporos/50 g de solo. Já o tratamento com solo autoclavado e sem inoculação (SFSA) resultou nos menores valores em todas as variáveis. O teor de cumarina observado em CFSNA representou um ganho de 20,59% em relação ao SFSA, superando o valor mínimo estabelecido pela Farmacopeia Brasileira (6ª edição), que exige pelo menos 0,15% de cumarina nas folhas secas de *M. laevigata*. Os resultados evidenciam que a presença simultânea de *R. clarus* e da microbiota nativa do solo potencializa a simbiose micorrízica, promovendo o crescimento vegetal e intensificando a biossíntese de cumarina, principal composto bioativo do *M. laevigata*. O aumento significativo nos teores dessa substância reforça o papel dos FMAs na otimização do metabolismo secundário da planta. Assim, o uso de *R. clarus* representa uma estratégia eficaz para o cultivo de *M. laevigata* com maior produtividade, teor de cumarina e qualidade farmacológica.

Palavras-chave: Micorrizas; Planta medicinal; Metabólitos secundários; Fitoquímica.

ABSTRACT

Guaco (*Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker) is a medicinal plant traditionally used to treat respiratory diseases such as cough and bronchitis. Its main bioactive compounds include coumarin, chlorogenic and dicaffeoylquinic acids, as well as essential oils containing germacrene D, caryophyllene oxide, and spathulenol. One strategy to enhance the production of these compounds is through soil microbiota management, with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation being a promising approach to stimulate plant growth and secondary metabolite synthesis in medicinal species. This study evaluated the effects of *Rhizophagus clarus* inoculation on the growth, coumarin production, and mycorrhizal symbiosis of *M. laevigata* cultivated under different soil conditions (autoclaved or non-autoclaved). The experiment was conducted in a completely randomized design, in a 2 x 2 factorial scheme, with 10 replicates. The factors evaluated were AMF inoculation (presence of inoculum – CF and absence of inoculum – SF) and soil condition (autoclaved – SA and non-autoclaved – SNA). Morphological variables (height, number of leaves, and shoot, root, and total biomass), coumarin content, mycorrhizal colonization, and spore density were analyzed. The treatment with non-autoclaved and inoculated soil (CFSNA) showed the best results, with a total biomass of 12.95 g, height of 216.2 cm, 71.4 leaves, coumarin content of 0.83 mg, 91.4% mycorrhizal colonization, and 212.5 spores/50 g of soil. In contrast, the treatment with autoclaved soil and no inoculation (SFSA) presented the lowest values for all variables. The coumarin content observed in CFSNA represented a 20.59% increase compared to SFSA, exceeding the minimum value established by the Brazilian Pharmacopoeia (6th edition), which requires at least 0.15% coumarin in dried *M. laevigata* leaves. The results demonstrate that the simultaneous presence of *R. clarus* and native soil microbiota enhances mycorrhizal symbiosis, promoting plant growth and intensifying the biosynthesis of coumarin, the main bioactive compound of *M. laevigata*. The significant increase in coumarin content reinforces the role of AMF in optimizing the plant's secondary metabolism. Thus, the use of *R. clarus* represents an effective strategy for cultivating *M. laevigata* with greater productivity, higher coumarin levels, and improved pharmacological quality.

Keywords: Mycorrhizae, Medicinal plant, Secondary metabolites, Phytochemistry.

INDICADORES DE IMPACTO

O presente trabalho apresenta impactos em diferentes áreas, contribuindo para os avanços científico, ambiental, social e econômico. Cientificamente, amplia o conhecimento sobre a relação entre *M. laevigatae* fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), especificamente *Rhizophagus clarus*, no crescimento da planta e na produção da cumarina, um metabólito secundário de importância terapêutica e reconhecido pela Farmacopeia Brasileira. A aplicação de FMAs como bioinsumos representa uma estratégia agroecológica sustentável, reduzindo o uso de insumos químicos e seus impactos ambientais. Socialmente, o estudo fortalece o uso de fitoterápicos na saúde pública, ao indicar formas de cultivo que aumentam a disponibilidade e a qualidade de extratos naturais. Economicamente, o trabalho pode beneficiar produtores e cooperativas ao propor uma técnica de cultivo de baixo custo e alto valor agregado, promovendo o uso comercial sustentável da espécie.

IMPACT INDICATORS

This study presents impacts across multiple areas, contributing to scientific, environmental, social, and economic advancements. Scientifically, it expands the understanding of the relationship between *M. laevigata* and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), specifically *Rhizophagus clarus*, in terms of plant growth and the production of coumarin a secondary metabolite of therapeutic relevance and recognized by the Brazilian Pharmacopoeia. The application of AMF as bioinputs represents a sustainable agroecological strategy, reducing the use of chemical inputs and their environmental impacts. Socially, the study strengthens the use of herbal medicines in public health by identifying cultivation practices that increase the availability and quality of natural extracts. Economically, the study may benefit producers and cooperatives by proposing a low-cost cultivation technique with high added value, promoting the sustainable commercial use of the species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mudas de <i>M. laevigata</i> utilizadas na experimento.....	31
Figura 2 – Mudas de <i>M. laevigata</i> transplantadas para os devidos tratamentos	31
Figura 3 – Número de folhas de <i>M. laevigata</i> (guaco) aos 120 dias após o plantio, cultivada em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com <i>Rhizophagus clarus</i>	41
Figura 4 – Efeito da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e da autoclavagem do solo sobre a matéria seca da parte aérea, da raiz e total de <i>M. laevigata</i> , cultivadas em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com <i>Rhizophagus clarus</i>	42
Figura 5 – Cromatogramas representativos da seletividade do método: (A) amostra de extrato, (B) padrão de referência de cumarina e (C) co-injeção (amostra + padrão), evidenciando a intensificação do pico de cumarina no tempo de retenção correpondente.....	45
Figura 6 – Curva analíticas de cumarina obtidas em três dias consecutivos de análise, evidenciando linearidade e consistência entre os ensaios.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Significância estatística dos efeitos da inoculação micorrízica (I), autoclavagem do solo (S) e IxS sob as variáveis: altura de planta, número de folhas, matéria seca parte aérea, de raízes e total, colonização micorrízica, densidade de esporos e cumarina.....	39
Tabela 2 – Efeito da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e da autoclavagem do solo sobre a altura de plantas de <i>M. laevigata</i> , cultivadas em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com <i>Rhizophagus clarus</i>	40
Tabela 3 – Colonização micorrízica (%) de <i>M. laevigata</i> sob diferentes tratamentos, em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com <i>Rhizophagus clarus</i>	37
Tabela 4 – Densidade de esporos de FMAs no solo sob diferentes tratamentos, em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com <i>Rhizophagus clarus</i>	44
Tabela 5 – Concentração de cumarina (mg/g de folha seca) em <i>M. laevigata</i> sob diferentes tratamentos, em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com <i>Rhizophagus clarus</i>	44
Tabela 6 – Parâmetros estatísticos das curvas analíticas de cumarina obtidas em três dias consecutivos de análise.....	47

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
aPTT	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
AMF	Arbuscular Mycorrhizal Fungi
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cu	Cobre
DHA	Ácido Decosaheptaenoico
FMA	Fungo Micorrízico Arbuscular
FMA _s	Fungo Micorrízico Arbusculares
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas
IN	Instrução Normativa
K	Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
MgO	Óxido de Magnésio
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
MSC	Matéria Seca do Caule
MSF	Matéria Seca das Folhas
MSPA	Matéria Seca da Parte Aérea
MSR	Matéria Seca das Raízes
MST	Matéria Total
N	Nitrogênio

OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fósforo
PRNT	Poder Relativo de Neutralização Total
PT	Tempo Protrombina
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
S	Enxofre
SUS	Sistema Único de Saúde
TY	Tyler Mesh Size
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UV	Ultravioleta
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	PLANTAS MEDICINAIS	18
2.2	<i>M. LAEVIGATA</i>	19
2.3	CUMARINA	21
2.3.1	<i>Cumarina na M. laevigata</i>	22
2.4	FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMAS)	24
2.5	IMPORTÂNCIA DOS FMAS EM PLANTAS MEDICINAIS	26
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	LOCAL DO EXPERIMENTO, MATERIAL VEGETAL E SOLO	29
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
3.3	IMPLANTAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	30
3.4	CONTAGEM DE FOLHAS E MENSURAÇÃO DA ALTURA DAS PLANTAS.....	32
3.5	ANÁLISE MATÉRIA SECA	32
3.6	DENSIDADE DE ESPOROS DE FUNGOS MICORRIZICOS ARBUSCULARES E COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA.....	33
3.6.1	<i>Extração e contagem de esporos</i>	33
3.6.2	<i>Coloração de raízes e contagem da colonização</i>	34
3.7	MATERIAL VEGETAL E PREPARO DE EXTRATO DE <i>M. LAEVIGATA</i>	35
3.8	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	35
3.8.1	<i>Padrão e Reagentes</i>	35
3.8.2	<i>Equipamentos</i>	36
3.8.3	<i>Condição cromatográfica</i>	36
3.8.4	<i>Quantificação de cumarina</i>	37
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	37
4	RESULTADOS.....	39
5	DISCUSSÃO.....	48
6	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXOS.....	66

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem uma importante fonte de compostos bioativos utilizados na prevenção e no tratamento de diversas doenças, tanto na medicina tradicional quanto na moderna. Seus efeitos farmacológicos estão diretamente relacionados aos seus constituintes fitoquímicos, os quais se dividem em metabólitos primários essenciais às funções metabólicas básicas da planta e metabólitos secundários, que podem ser produzidos em resposta a diversos estímulos ambientais. O segundo grupo tem importância na medicina tradicional e moderna, fornecendo compostos bioativos utilizados no tratamento de diversas enfermidades (HUSSEIN & EL-ANSSARY, 2019). Os metabólitos secundários, como fenóis, flavonoides, terpenoides, esteroides e alcaloides (POTT et al., 2019), são particularmente sensíveis às condições ambientais, como sazonalidade, luminosidade, altitude e temperatura (PEREIRA & ANDRADE, 2014).

A *M. laevigata* Shultz Bip. ex Baker (Asteraceae) é uma planta nativa da América do Sul, amplamente utilizada como antiespasmódico no tratamento de doenças respiratórias. Popularmente conhecida como guaco, apresenta uso recorrente por populações locais, especialmente na forma de infusões e chás. A cumarina é o principal composto químico presente nesta espécie, atingindo concentrações elevadas no extrato vegetal, com valores de até 13,46 mg (GRAÇA et al., 2007). Além da cumarina, foram identificados outros compostos fitoquímicos relevantes, como os ácidos clorogênico e dicafeoilquínico (DELLA PASQUA et al., 2019). O óleo essencial de *M. laevigata* contém substâncias como germacreno D, óxido de cariofileno, biciclogermacreno e spatulenol, cuja composição pode variar de acordo com a sazonalidade (FONSECA et al., 2020).

A *M. laevigata* está registrada no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, sendo indicada para o tratamento de afecções das vias respiratórias superiores (BRASIL, 2024). A Instrução Normativa (IN) nº 2/2014, da ANVISA, classifica o guaco (*M. glomerata* e *M. laevigata*) como produto tradicional fitoterápico, recomendado como expectorante e broncodilatador, com dose diária de 0,5 a 5 mg de cumarina por via oral (BRASIL, 2014; (BRASIL, 2024). Ambas as espécies constam na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS

(RENISUS).

A crescente demanda por produtos naturais com ação farmacológica tem impulsionado a busca de estratégias que aumentem a produção desses metabólitos em plantas medicinais. Nesse contexto, o manejo da área de cultivo, principalmente por meio da manipulação da microbiota do solo e a inoculação microbiana tem se mostrado promissor. Entre os microrganismos do solo que mais potencializam o crescimento vegetal se destacam as micorrizas. Micorrizas são associações simbióticas entre fungos de solo e raízes, em que se proporciona benefícios mútuos. Enquanto os fungos recebem fotoassimilados das plantas hospedeiras, favorecem a absorção de água e nutrientes, devido à exploração de maiores volumes de solo pelas hifas extrarradiculares (WU *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2024; FAVRE- GODAL *et al.*, 2020). Dentre as micorrizas, as formadas pelos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) estão entre as mais importantes relações simbióticas das plantas vasculares terrestres. Os FMAs são biotróficos obrigatórios e estão amplamente distribuídos nos ecossistemas terrestres, caracterizando-se como organismos cosmopolitas (HUEY *et al.*, 2020).

Os FMAs promovem respostas positivas em crescimento, produtividade e aumento da concentração de metabólitos secundários em diferentes espécies medicinais (THOKCHOM *et al.*, 2023; TSIOKANOS *et al.*, 2022; MELATO *et al.*, 2024). A simbiose com FMAs também promovem o crescimento vegetal, elevam o teor de clorofila e aumentam o rendimento de óleo essencial em diversas espécies (WEISANY, 2024). De modo geral, a inoculação com FMAs favorece a produção e acúmulo de compostos como terpenos, fenóis e alcaloides, otimizando o perfil fitoquímico e, conseqüentemente, a qualidade dos produtos fitoterápicos (ZENG *et al.*, 2013). No caso específico de *M. laevigata*, BARAZETTI *et al.* (2021) relataram que a colonização por FMAs promoveu aumento nas taxas de assimilação líquida de CO₂ e na produção de biomassa, além de resultados promissores na síntese de metabólitos secundários, como óleo essencial e flavonoides.

Sob estresse abiótico, os FMAs desempenham papel importante na tolerância das plantas. HASHEM *et al.* (2016) relataram que a inoculação aumentou teores de prolina, fenóis e enzimas antioxidantes, reduzindo a peroxidação lipídica e fortalecendo o sistema antioxidante frente ao cádmio. Em *Stevia rebaudiana*, SARMIENTO-LÓPEZ *et al.* (2020) observaram maiores níveis de flavonoides, compostos fenólicos e tricomas glandulares em plantas colonizadas. Resultados

semelhantes foram descritos em *Medicago sativa* (KAUR & SUSEELA 2020) e *Allium sativum* (BORDE *et al.*, 2009), com aumento de flavonoides e atividade enzimática em plantas inoculadas.

Já em *Anchusa officinalis*, a associação com diferentes espécies de FMAs, incluindo *Rhizophagus clarus*, influenciou a produção de metabólitos primários e secundários (TSIOKANOS *et al.*, 2022). Em plantas de arruda (*Ruta graveolens* L.), a inoculação com *R. clarus* aliada à adição de fósforo proporcionou melhorias significativas no crescimento (MELATO *et al.*, 2024).

De acordo com STURMER *et al.* (2025), *Rhizophagus clarus* é uma espécie de FMA cosmopolita, registrada em todos os continentes e em pelo menos 31 países, com ampla ocorrência nas Américas e na Ásia. Está presente em biomas variados, como florestas, desertos, manguezais e ambientes tropicais, sendo associada a diversas culturas agrícolas, como soja, café, milho e cana-de-açúcar. A espécie ocorre, em geral, em regiões com precipitação média anual de 2.000 mm, temperatura de 20 °C e solos com pH entre 5 e 6, mesmo sob altos níveis de fósforo. Além disso, o gênero *Rhizophagus* apresenta potencial para induzir compostos bioativos e melhorar variáveis fisiológicas em plantas medicinais (YUAN *et al.*, 2023).

Considerando o valor terapêutico da *M. laevigata* no contexto fitoterápico nacional e o potencial do *R. clarus* como indutor da produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico, este estudo propõe testar a hipótese de que a inoculação com esse FMA promove incremento na biomassa da parte aérea e no teor de cumarina, contribuindo para o aprimoramento da qualidade fitoquímica da planta. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação com *Rhizophagus clarus* no cultivo de *M. laevigata*, visando o aumento da qualidade e da quantidade de cumarina, além do desempenho vegetativo da planta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

O uso de plantas medicinais acompanha a história. Registros demonstram sua utilização desde 60.000 anos A.C. Povos antigos, como os egípcios, gregos, hindus, persas, chineses, babilônios, assírios, hebreus, e, mais recentemente, as civilizações da América Pré-colombiana, aplicavam esses recursos terapêuticos (PATWARDHAN *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2015). Esse conhecimento botânico, muitas vezes associado a práticas cerimoniais desses povos, deu origem à medicina tradicional, presente em todo o mundo e transmitida verbalmente a cada geração (PEDRAZA-ALVA *et al.*, 2019).

Assim, o ser humano sempre manteve uma relação de dependência com a natureza, inicialmente pela necessidade de alimentação, abrigo e proteção, e posteriormente pela utilização de plantas para tratar doenças. Desde então, a medicina e a botânica mantêm uma ligação estreita, pois grande parte dos medicamentos modernos têm origem em fontes vegetais (RAHMAN *et al.*, 2019). As plantas são reconhecidas como fontes de medicamentos importantes, como a morfina, a digoxina, a vincristina e a vimblastina. É amplamente aceito que os recursos naturais continuam a influenciar o desenvolvimento de moléculas farmacêuticas sintéticas, transformadas em tratamentos eficazes para diversas condições humanas, como câncer, doenças cardíacas e alívio da dor (HOWES *et al.*, 2020).

Por exemplo, o uso de papoula (*Papaver somniferum*) e maconha (*Cannabis sativa*) data de 4.000 anos atrás. No entanto, a busca pelos constituintes ativos das plantas medicinais começou apenas no século XIX. Em 1806, Friedrich Serturner isolou o alcaloide morfina da papoula, marcando o início de uma era de descobertas. Seguindo essa linha, Pierre-Jean Robiquet isolou a codeína, e George Merck Fraz descobriu a papaverina, ambos também derivados da papoula. Outros exemplos notáveis incluem a atropina, a cafeína e a digoxina. Um marco significativo foi a descoberta da salicina a partir do salgueiro-branco (*Salix alba*). A primeira alteração estrutural da salicina originou-se do ácido salicílico, usado no tratamento da artrite reumatoide (DUTRA *et al.*, 2016).

Por esses motivos, as plantas medicinais são de grande interesse para a

pesquisa científica. Estima-se que existam cerca de 400 mil espécies de plantas, e acredita-se que menos de 10% delas têm suas atividades biológicas conhecidas. Tal evidência mostra que o reino vegetal contém muitas moléculas ainda pouco estudadas, sendo de grande relevância para a descoberta de novos medicamentos (ROMANO *et al.*, 2021). As moléculas presentes nas plantas medicinais são utilizadas para tratar e promover a saúde globalmente, pois contêm uma vasta gama de fitoquímicos, incluindo carotenoides, flavonoides, lignanas e ácidos fenólicos, entre outros, os quais apresentam ampla variedade de atividades biológicas (CHEN, 2020).

Na última década, as terapias naturais recuperaram a atenção do público, resultando em grande interesse nas plantas medicinais e em suas moléculas bioativas. Esse interesse deve-se, em parte, à possibilidade de estudar uma vasta quantidade de espécies botânicas inexploradas, adotando uma abordagem ecológica e econômica em termos de pesquisa. Além disso, há uma grande possibilidade de descobrir novos produtos naturais com potencial terapêutico (LUCARIELLO *et al.*, 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 50% da população global em países subdesenvolvidos utilizam plantas medicinais ou preparações destas para aliviar sintomas de doenças, devido às dificuldades socioeconômicas e à falta de acesso aos profissionais de saúde. Os remédios tradicionais desempenham um papel crucial na prestação de cuidados de saúde em países em desenvolvimento, participando tanto como tratamentos primários quanto como terapias complementares (SHOPO *et al.*, 2022).

2.2 *M. laevigata*

A família Asteraceae, uma das maiores entre as angiospermas, compreende entre 24.000 e 30.000 espécies distribuídas em aproximadamente 1.600 a 1.700 gêneros ao redor do mundo, com exceção da Antártica (FUNK *et al.*, 2005). No Brasil, essa família apresenta ampla utilização tradicional e científica (BERTOL *et al.*, 2021). Um dos gêneros relevantes pertencentes à Asteraceae é *Mikania* Willdenow, criado em 1803 (OLIVEIRA *et al.*, 1992), que engloba cerca de 430 espécies, predominantemente neotropicais (FEITOSA *et al.*, 2021). Aproximadamente 35% dessas espécies são endêmicas do Brasil, incluindo *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, popularmente conhecida como “guaco-cheiroso” ou “guaco-do-mato” (FERREIRA & OLIVEIRA, 2010).

A espécie *M. laevigata* é endêmica do Brasil, encontrada nas regiões Nordeste, Centro- Oeste, Sudeste e Sul (RITTER *et al.*, 2024). Apresenta porte subarbustivo e hábito trepador, exigindo tutoramento durante o cultivo. Seu caule é cilíndrico e lenhoso, com coloração escura nas porções mais antigas e verde-clara nas mais novas. As folhas são opostas, com base obtusa, formato oval, consistência coriácea e medem entre 10 e 15 cm de comprimento. Suas nervuras são menos evidentes na face adaxial e salientes na face abaxial. As inflorescências são compostas por capítulos, cujas flores apresentam tubo curto e limbo com cinco lacínias triangulares (OLIVEIRA *et al.*, 1994).

Na medicina tradicional, *M. laevigata* é amplamente empregada como broncodilatador, expectorante e supressor da tosse, sendo indicada no tratamento de doenças respiratórias como bronquite, pleurisia, gripes, resfriados, asma e inflamações com dor de garganta. Também é utilizada popularmente contra picadas de cobra (MEDEIROS MAZZORANA *et al.*, 2013; NAPIMOGA & YATSUDA, 2010; YAZBEK *et al.*, 2019). Reconhecendo seu potencial terapêutico, a sexta edição da Farmacopeia Brasileira padronizou o uso da droga vegetal obtida das folhas secas de *M. laevigata*, exigindo teor mínimo de 0,15% de cumarina (BRASIL, 2024).

Os principais compostos fitoquímicos identificados em *M. laevigata* incluem derivados do ácido cinâmico, como a cumarina e o ácido o-cumárico, além de diterpenos do tipo caureno, como o ácido caurenóico e o ácido cinamoil grandiflórico (BERTOLUCCI *et al.*, 2013). Essas substâncias estão associadas às propriedades farmacológicas observadas em diferentes estudos.

A decocção das folhas demonstrou atividade anti-inflamatória, com inibição de edema em pata de rato e redução da migração leucocitária em modelo de pleurisia, sugerindo ação moduladora da resposta inflamatória (SUYENAGA *et al.*, 2002). Em um modelo murino de pneumonite alérgica, o tratamento com extrato hidroalcoólico da planta resultou em redução significativa do influxo de leucócitos, especialmente eosinófilos, para o espaço broncoalveolar. As análises histopatológicas evidenciaram melhora no perfil pulmonar dos animais tratados, o que indica uma possível atividade broncodilatadora (DOS SANTOS *et al.*, 2006).

Estudos clínicos e *in vitro* também reforçam seu potencial antimicrobiano. Um ensaio clínico randomizado e duplo-cego revelou que enxaguantes bucais contendo extratos etanólicos de *M. laevigata* inibiram o crescimento de *Streptococcus mutans* (LESSA *et al.*, 2012). Além disso, extratos da planta

demonstraram atividade ovicida e larvicida contra *Toxocara canis* e *Ancylostoma caninum*, indicando viabilidade no controle de parasitoses gastrointestinais (ZAMPROGNO *et al.*, 2015).

A fração de acetato de etila do extrato de *M. laevigata* também se destacou por apresentar efeito inibitório e bactericida contra patógenos orais, como *Enterococcus faecalis* e *Actinomyces israelii*, com capacidade de eliminação de biofilmes em 24 horas (MASSUNARI *et al.*, 2020). Ainda, os extratos da planta mostraram atividade antioxidante em modelos experimentais de distrofia muscular, sugerindo papel na redução do estresse oxidativo (BORGHI *et al.*, 2023).

A propagação da planta é preferencialmente realizada por estaquia semilenhosa, mantendo-se um par de folhas cortadas ao meio. Após o enraizamento, as mudas podem ser transplantadas para o campo, com a necessidade de tutoramento devido ao hábito trepador. Por tratar-se de uma espécie medicinal, recomenda-se o cultivo livre de agrotóxicos. A colheita deve ocorrer 12 meses após o plantio, preferencialmente pela manhã. A secagem de folhas e caules deve ser feita em estufa a 45 °C. Ambos os órgãos podem ser comercializados na forma seca (PEREIRA *et al.*, 2015).

Estudos comparativos entre *Mikania glomerata* e *M. laevigata* revelam diferenças importantes em suas composições químicas e morfológicas. Enquanto a cumarina é encontrada em alta concentração nas folhas de *M. laevigata*, está ausente ou presente em baixa quantidade nas folhas de *M. glomerata*, além de uma diferença na morfologia das folhas entre as duas espécies (COSTA *et al.*, 2018).

2.3 Cumarina

Diversas substâncias naturais são amplamente utilizadas na produção de medicamentos ao redor do mundo, e a cumarina é uma delas. Essa molécula é valorizada por suas propriedades físico-químicas, que conferem versatilidade farmacológica e facilidade de modificação sintética (STEFANACHI *et al.*, 2018). A cumarina foi identificada pela primeira vez em 1820, a partir do isolamento realizado na fava-tonka (*Dipteryx odorata*, família Fabaceae), também conhecida como coumarou ou cumaru (VOGEL, 1820).

As cumarinas podem ser encontradas em diferentes partes das plantas, como raízes, flores e frutos, estando presentes em várias famílias botânicas. A família Asteraceae se destaca por apresentar alta frequência desses compostos (RIBEIRO &

KAPLAN, 2002). Derivadas do metabolismo secundário vegetal (HARBORNE, 1999), as cumarinas são classificadas em diversos subtipos: cumarinas simples, cumarinas 7-oxigenadas, piranocumarinas e fenilcumarinas (ESTÉVEZ-BRAUN & GONZÁLEZ, 1997). Cumarinas simples, furanocumarinas e piranocumarinas derivam da via do ácido chiquímico, enquanto as fenilcumarinas têm origem no metabolismo de isoflavonas (BOURGAUD *et al.*, 2006).

Do ponto de vista químico, a cumarina pertence à classe das benzopironas e se apresenta como um composto sólido, cristalino e de coloração branca. Sua estrutura consiste em um anel aromático fundido a um anel lactona. Além disso, ela possui boa solubilidade em solventes orgânicos como etanol, clorofórmio e éter etílico (COHEN, 1979). Entre as cumarinas mais comuns na natureza, destacam-se a umbeliferona, esculetina e escopoletina (JAIN & JOSHI, 2012), todas com reconhecido potencial bioativo.

A biossíntese das cumarinas derivadas do ácido chiquímico inicia-se com a condensação de dois metabólitos derivados da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. Essa combinação leva à formação do ácido corísmico (ou corismato), que é precursor de aminoácidos aromáticos como triptofano, tirosina e fenilalanina sendo a fenilalanina o principal precursor das cumarinas. A enzima fenilalanina-amônio-liase (PAL) atua sobre a fenilalanina, removendo um grupo amino e originando o ácido cinâmico. Esse, por sua vez, sofre reações de hidroxilação e transformação no ácido o-cumárico, que passa por etapas de glicosilação e isomerização cis/trans. Essas etapas são fundamentais para a lactonização e formação do núcleo cumarínico, sendo que a cumarina é liberada após hidrólise enzimática e fechamento do anel lactônico (CZELUSNIAK *et al.*, 2012).

2.3.1 Cumarina na *M. laevigata*

As plantas medicinais e aromáticas são amplamente utilizadas e valorizadas em todo o mundo, despertando grande interesse por parte da indústria farmacêutica e de fitoterápicos (AFTAB & HAKEEM, 2020). Dentre essas espécies, destaca-se *M. laevigata*, uma planta medicinal nativa do Brasil que apresenta relevante potencial terapêutico devido à presença de metabólitos secundários com propriedades anti-inflamatórias, adstringentes, broncodilatadoras e antialérgicas (BARAZETTI *et al.*, 2022).

As folhas de *M. laevigata* contêm, como principais constituintes, derivados

do ácido cinâmico, notadamente a cumarina e o ácido o-cumárico (BERTOLUCCI *et al.*, 2013). A cumarina é considerada o marcador químico oficial da espécie na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2024). Essa substância confere ao guaco um aroma característico semelhante ao da baunilha (OLIVEIRA *et al.*, 1994). Para sua identificação e quantificação, são utilizados métodos analíticos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, em inglês) e sua combinação com espectrometria de massas (HPLC-MS) (VOGL *et al.*, 2011; MELO & SAWAYA, 2015).

Diversos estudos farmacológicos demonstram os efeitos benéficos da cumarina e de extratos de *M. laevigata*. O extrato hidroalcoólico bruto e a cumarina isolada demonstraram reduzir lesões ulcerativas induzidas por agentes como indometacina, etanol, estresse e reserpina, além de diminuir a concentração de íons hidrogênio, indicando efeito gastroprotetor (BIGHETTI *et al.*, 2005). Em modelo murino de pneumonite alérgica, o extrato aquoso e os compostos cumarina e ácido o-cumárico estimularam a síntese hepática de ácido docosahexaenoico (DHA), reconhecido por sua ação anti-inflamatória (PEDROSO *et al.*, 2008).

Além disso, ALVES *et al.* (2009) relataram que o extrato bruto de guaco diminuiu a permeabilidade vascular e a migração de leucócitos por um mecanismo dependente de óxido nítrico. A cumarina foi identificada como responsável por inibir a migração de neutrófilos para o foco inflamatório, reforçando sua ação anti-inflamatória.

No contexto da atividade antitumoral, RUFATTO *et al.* (2013) caracterizaram a presença de cumarina em extratos de *M. laevigata* e testaram contra linhagens celulares tumorais (Hep-2, HeLa) e não tumorais (MRC-5). Todos os extratos analisados (clorofórmio, acetato de etila, hexano e etanol) demonstraram inibição significativa do crescimento celular. Em complemento, PINTO *et al.* (2017) observaram que um extrato seco padronizado de *M. laevigata* apresentou efeito antiulcerogênico significativo em modelo animal, além de possuir propriedades físico-químicas estáveis e concentrações padronizadas de cumarina e ácido o-cumárico, sugerindo potencial para uso como fitofármaco intermediário.

Estudos *in vitro* também revelaram a atividade anticoagulante de compostos presentes na espécie, como ácidos cinnamoylgranifórico, o-cumárico, cumarina e flavonoides. Sugere-se que tais compostos prolongaram o tempo de protrombina (PT) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), além de reduzirem a formação

de trombina e os níveis de fibrinogênio (LEITE *et al.*, 2019).

No que se refere à segurança, GRAÇA *et al.* (2007) testaram um xarope de *M. laevigata* com quantidades controladas de cumarina em ratos e não observaram alterações nos parâmetros hematológicos ou bioquímicos, tampouco sinais de toxicidade hepática, renal ou pancreática. Em estudo clínico recente, BERTOL *et al.* (2024) avaliaram o uso oral da planta por duas semanas em voluntários humanos, constatando sua segurança nas doses testadas, apesar da ocorrência de um efeito adverso moderado (pirose) e de alterações laboratoriais dentro dos valores fisiológicos.

A concentração de cumarina em extratos de *M. laevigata* varia de acordo com fatores como o método de extração e a estação de colheita. BIAVATTI *et al.* (2004) constataram que extratos com maior teor de etanol e obtidos no verão apresentaram maiores concentrações do composto. FONSECA *et al.* (2020) observaram que a secagem das folhas a 60 °C também resultou em maior teor de cumarina no óleo essencial.

Por fim, a biossíntese da cumarina na planta é influenciada por fatores ambientais. Temperaturas constantes próximas a 20 °C, luminosidade moderada (50%) e condições de déficit hídrico favorecem a produção do composto. Por outro lado, o excesso de água não promove alterações significativas nesse processo (UENO & SAWAYA, 2019).

2.4 Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs)

As micorrizas são associações simbióticas entre determinados fungos do solo e raízes de plantas, proporcionando benefícios significativos às plantas hospedeiras (FAVRE-GODAL *et al.*, 2020). Essas simbioses favorecem o crescimento vegetal, contribuem para a estruturação

das comunidades vegetais e, em sistemas agrícolas, promovem práticas sustentáveis. As micorrizas são essenciais para a funcionalidade e a manutenção de ecossistemas naturais e manejados, incluindo áreas degradadas (BERUDE *et al.*, 2015). Classificam-se, em termos gerais, em duas categorias principais: ectomicorrizas, nas quais os fungos colonizam os espaços intercelulares das raízes, e endomicorrizas, nas quais os fungos se desenvolvem tanto dentro quanto fora das células radiculares (FAVRE-GODAL *et al.*, 2020).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) constituem um grupo de

micorrizas endossimbióticas que colonizam os espaços intra e intercelulares das raízes. Esses fungos foram identificados em registros fósseis de plantas rudimentares, evidenciando sua longa coevolução com as plantas terrestres (HUEY *et al.*, 2020). Os FMAs desempenham papéis cruciais no desenvolvimento vegetal, ao facilitar a absorção de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, em troca de carboidratos derivados da fotossíntese promovendo, assim, uma relação de benefício mútuo (STÜRMER & KEMMELMEIER, 2020; WU *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2024). São considerados simbiontes obrigatórios, ou seja, dependem dos carboidratos fornecidos pelas plantas para seu desenvolvimento e conclusão do ciclo de vida. Por sua ampla distribuição nos ecossistemas terrestres, são reconhecidos como os simbiontes mais comuns do solo, formando associações com mais de 70% das espécies de plantas vasculares (ZHAO *et al.*, 2022).

O termo “micorriza” foi proposto pelo botânico alemão Albert Bernard Frank em 1885, derivando do grego: *mykes* (fungo) e *rhiza* (raiz). Embora essas associações já fossem observadas cerca de 50 anos antes, eram inicialmente interpretadas como formas de parasitismo (SOUZA *et al.*, 2006). As associações micorrízicas ocorrem em diversos grupos filogenéticos, abrangendo plantas vasculares e algumas briófitas talosas. Os FMAs pertencem ao filo Glomeromycota (ou Mucoromycota, segundo classificações mais recentes) e figuram entre os principais parceiros simbióticos das plantas (BRUNDRETT & TEDERSOO, 2018).

As estruturas características dos FMAs incluem arbúsculos, formados pela penetração das hifas nas células corticais da raiz e responsáveis pela troca de metabólitos entre fungo e planta. Além disso, os FMAs produzem vesículas, estruturas globosas ricas em lipídios, localizadas dentro ou entre as células radiculares. A germinação dos esporos ocorre na superfície da raiz, sendo a penetração mediada por ação mecânica e enzimática. O crescimento da hifa segue uma trajetória intercelular até alcançar a colonização intracelular, usualmente restrita à epiderme, exoderme e parênquima cortical, sem atingir o cilindro central ou tecidos meristemáticos (BONFANTE-FASOLO, 2018).

Os FMAs exercem papel fundamental na resiliência das plantas frente a estresses ambientais, aprimorando a absorção de nutrientes, otimizando o uso da água, modulando a expressão gênica e fortalecendo as defesas antioxidantes. Sua presença contribui para a mitigação de estresses bióticos e abióticos, conferindo maior resistência a condições adversas como déficit hídrico, salinidade, altas

temperaturas, contaminação por metais pesados e ataque de patógenos (NIE *et al.*, 2024).

Além dos efeitos diretos nas plantas hospedeiras, os FMAs promovem impactos positivos na qualidade e estrutura do solo, contribuindo para a formação de agregados, a estabilidade física e a funcionalidade do solo. Também influenciam positivamente a diversidade e a estrutura das comunidades microbianas e vegetais, reforçando o equilíbrio ecológico e a sustentabilidade dos ecossistemas (DIAGNE *et al.*, 2020).

Nesse cenário, os FMAs vêm sendo cada vez mais utilizados como biofertilizantes e bioestimulantes em diferentes sistemas agrícolas. Sua capacidade de intensificar a absorção de nutrientes, imobilizar e translocar elementos potencialmente tóxicos e estimular o crescimento vegetal faz deles aliados estratégicos para a agricultura, especialmente sob condições de estresse ambiental (CHAUHAN *et al.*, 2022).

2.5 Importância dos FMAs em plantas medicinais

As plantas medicinais e aromáticas têm desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento cultural e terapêutico ao longo da história. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% da população mundial depende de medicamentos derivados de plantas para atender às suas necessidades básicas de saúde (HOSSEINZADEH *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, o comércio global de plantas medicinais e aromáticas cresceu exponencialmente, beneficiando especialmente países desenvolvidos. Entre 1966 e 2015, o valor comercial dessas espécies aumentou de 2,4 para 25,6 bilhões de dólares, com previsão de crescimento contínuo (TRIPATHI *et al.*, 2017). Essa crescente demanda por metabólitos secundários tem impulsionado a busca por estratégias que otimizem sua produção nas plantas medicinais (THOKCHOM *et al.*, 2023).

NELL *et al.* (2009) demonstraram que os FMAs aumentam a biomassa radicular e afetam de forma distinta as concentrações totais de compostos fenólicos e ácidos rosmarínicos nas folhas e raízes, com maior acúmulo nas porções aéreas das plantas. Essa simbiose é capaz de melhorar as condições nutricionais, fornecer proteção ao hospedeiro e estimular as vias biossintéticas de metabólitos secundários, promovendo, assim, um aumento na produção de compostos de interesse terapêutico

(WEISANY, 2024).

Além de atuarem como bioestimulantes, os FMAs auxiliam na resistência contra patógenos, incrementam a eficiência na absorção de nutrientes e água, promovem o desenvolvimento radicular e o equilíbrio entre parte aérea e sistema radicular, além de aumentarem a tolerância das plantas a condições adversas, como salinidade, seca e variações térmicas (DE SOUZA *et al.*, 2017; CARRILLO-SAUCEDO *et al.*, 2022).

O impacto dos FMAs sobre a produção de metabólitos secundários pode ocorrer de maneira direta, por meio do aumento da biomassa, ou indiretamente, ao induzir a expressão de genes e rotas metabólicas envolvidas na biossíntese desses compostos. A magnitude desse efeito varia em função do genótipo vegetal, da cepa do fungo inoculado e de fatores ambientais, como intensidade luminosa e época de colheita (ZHAO *et al.*, 2022).

TABER & TRAPPE (1982) foram os primeiros a documentar a presença de FMAs em uma planta medicinal, ao estudar o cultivo de gengibre nas Ilhas Fiji e Havaí. Desde então, diversos estudos têm evidenciado os efeitos benéficos dessa simbiose em diferentes espécies medicinais. ARAIM *et al.* (2009) observaram aumentos significativos na massa seca e nos teores de compostos fenólicos em raízes e parte aérea de *Echinacea purpurea* inoculada com *Glomus intraradices*.

De forma semelhante, CECCARELLI *et al.* (2010) investigaram a influência de diferentes espécies de FMAs na produção de compostos bioativos em *Cynara cardunculus* var. *scolymus* (alcachofra), demonstrando que a inoculação com *G. intraradices* ou sua combinação com *G. mosseae* resultou em maiores teores de fenóis totais em comparação às plantas inoculadas apenas com *G. mosseae*.

Estudos com plantas produtoras de óleos essenciais também demonstram efeitos significativos dos FMAs. Em *Artemisia annua* e *Ocimum basilicum*, por exemplo, foi constatado aumento na produção e alteração no perfil de constituintes do óleo essencial após inoculação com FMAs (DOMOKOS *et al.*, 2018; ZOLFAGHARI *et al.*, 2013). Afshari *et al.* (2022) relataram que a colonização micorrízica elevou os teores de monoterpenos oxigenados como 1,8-cineol, cânfora e borneol, enquanto compostos como E- β -cariofileno e α -humuleno foram reduzidos em *S. abrotanoides* e *S. yangii*.

NELL *et al.* (2010) também verificaram que, embora a colonização por FMAs tenha diminuído a biomassa de rizomas e raízes de *Valeriana officinalis*, os

níveis de ácidos sesquiterpênicos aumentaram significativamente. Já *F. mosseae* promoveu a melhora da biomassa da parte aérea e da raiz, da arquitetura radicular e do acúmulo de flavonoides em *Glycyrrhiza uralensis* sob condições de deficiência de fósforo (CHEN *et al.*, 2017).

Outros estudos relataram incremento na concentração de compostos ativos específicos: trigonelina em raízes e folhas de *Prosopis laevigata* colonizada por *Gigaspora rosea*; colchicina em tubérculos de *Gloriosa superba* inoculada com *F. mosseae*; e escopolamina em folhas de *Eclipta prostrata* colonizada por uma combinação de FMAs como *Claroideoglomus etunicatum*, *F. mosseae*, *R. irregularis* e *Rhizogloium microaggregatum* (ROJAS-ANDRADE *et al.*, 2003; PANDEY *et al.*, 2014; VO *et al.*, 2019).

No caso de *Thymus kotschyanus*, SAMMAK *et al.* (2022) constataram que *Rhizophagus clarus* atingiu 94,9% de colonização, sendo altamente eficiente na formação da simbiose e na promoção do crescimento vegetal. LERMEN *et al.* (2023) também evidenciaram que a inoculação com *R. clarus* em combinação com alta disponibilidade de fósforo aumentou o teor de óleo essencial em *Lippia alba*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento, material vegetal e solo

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA), localizada no município de Lavras, região Sul de Minas Gerais, nas coordenadas geográficas 21°14'42" S e 45°00'00". A condução ocorreu entre a primavera e o verão em casa de vegetação com temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

Foram utilizadas mudas de *M. laevigata*, obtidas a partir de estacas provenientes do Horto de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares da UFLA, onde as plantas matrizes se desenvolveram em condições naturais. As estacas, com aproximadamente 5 cm de comprimento, continham um nó na porção superior e apresentavam um par de folhas cortadas transversalmente.

As estacas foram enraizadas em bandejas de isopor com 72 células, preenchidas com o substrato comercial Tropstrato HA, composto por casca de pinus, vermiculita, PG Mix 14.16.18, nitrato de potássio, superfosfato simples e turfa. Para garantir a assepsia do substrato, este foi autoclavado a 120°C e 1 atm durante uma hora, com repetição do processo após 24 horas, visando maior eficiência na esterilização.

As mudas foram inicialmente mantidas em estufas e submetidas à aclimação gradual, por meio do aumento controlado da intensidade luminosa. O período da produção das mudas foi de 90 dias.

O solo utilizado foi coletado na profundidade de 0–20 cm, em uma área de mata pertencente à UFLA, sendo classificado como Latossolo Vermelho. Após a coleta, o solo foi transportado para o Departamento de Ciência do Solo, onde foi seco ao ar, peneirado em malha de 4 mm, homogeneizado e armazenado em caixa d'água.

Uma parte do solo foi submetida à esterilização em autoclave, nas mesmas condições descritas para o substrato, e armazenada em recipiente fechado até o momento do transplante das mudas. A outra parte do solo foi mantida em condições naturais, em caixa d'água tampada. Uma alíquota do solo foi encaminhada para análise química

O solo apresentou pH em água de 5,2, caracterizando-se como um solo

levemente ácido. Os teores de potássio (K) e fósforo (P) disponíveis foram de 75,25 mg dm⁻³ e 0,09 mg dm⁻³, respectivamente, indicando baixa disponibilidade de fósforo. As concentrações de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram de 2,24 e 0,70 cmol_c dm⁻³, enquanto o alumínio trocável (Al) apresentou baixo valor, de 0,11 cmol_c dm⁻³. A soma de bases trocáveis (SB) foi de 3,13 cmol_c dm⁻³, com capacidade de troca catiônica efetiva (t) de 3,24 cmol_c dm⁻³ e capacidade de troca catiônica a pH 7,0 (T) de 7,63 cmol_c dm⁻³. A acidez potencial (H+Al) foi de 4,50 cmol_c dm⁻³. O índice de saturação por bases (V) foi de 41,06%, enquanto a saturação por alumínio (m) apresentou valor reduzido, de 3,40%. O teor de matéria orgânica (M.O.) no solo foi de 5,17 dag kg⁻¹ e o fósforo remanescente (P-Rem) de 11,80 mg L⁻¹, sugerindo capacidade intermediária de adsorção de fósforo. Esses atributos refletem um solo de fertilidade moderada, com baixa disponibilidade de fósforo e acidez que pode influenciar o desenvolvimento da cultura.

3.2 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 2, com 10 repetições, totalizando 40 unidades experimentais, cada uma com uma planta. Os fatores foram a inoculação com FMAs (*Rhizophagus clarus*) (presença de inoculo (CF) e ausência de inoculo (SF)) e a autoclavagem do solo (solo autoclavado (SA) ou não autoclavado (SNA)).

3.3 Implantação do experimento

O solo foi acondicionado em vasos com capacidade para 5 kg e, com base nos resultados da análise química, foi realizada a correção da acidez, visando elevar a saturação por bases para 60%. Para isso, utilizou-se calcário dolomítico na dosagem de 1,44 g kg⁻¹ de solo, com 24,0% de CaO, 17,1% de MgO e 70,0% de poder relativo de neutralização total (PRNT). Após a aplicação do corretivo, o solo permaneceu em repouso na casa de vegetação por 30 dias, com a umidade mantida a 60% do volume total de poros.

Simultaneamente ao transplante das mudas, foi realizada a adubação com a aplicação, via solução, de 150 mg kg⁻¹ de fósforo (P), 100 mg kg⁻¹ de potássio (K), 100 mg kg⁻¹ de nitrogênio (N), 40 mg kg⁻¹ de enxofre (S), 0,8 mg kg⁻¹ de boro (B), 1,3 mg kg⁻¹ de cobre (Cu), 3,6 mg kg⁻¹ de manganês (Mn), 0,15 mg kg⁻¹ de molibdênio (Mo) e 4 mg kg⁻¹ de zinco (Zn). A dose de fósforo utilizada foi baseada em

recomendações agronômicas, sem ajuste específico para a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares. Embora tal conduta tenha garantido adequada nutrição das mudas, reconhece-se que níveis elevados de fósforo no solo podem reduzir a colonização micorrízica, e deve ser considerado para o manejo da inoculação de FMAs.

O inóculo de FMA utilizado no experimento continha esporos de *Rhizophagus clarus* (Nicolson & Schenck) C. Walker & A. Schüssler, fornecidos pela Coleção de Fungos Micorrízicos Arbusculares da UFLA. Para os tratamentos com inoculação, foram adicionados 0,034 g de solo inoculante, contendo aproximadamente 120 esporos de *R. clarus*, em cada vaso, no dia da implantação do experimento.

Após 30 dias de aclimação, foram selecionadas mudas de *M. laevigata* com três a quatro pares de folhas, conforme ilustração na Figura 1. Essas mudas foram transplantadas para os vasos, nos quais foram aplicados os respectivos tratamentos experimentais (Figura 2).

Figura 1 - Mudas de *M. laevigata* utilizadas no experimento.



Fonte: Do autor (2025).

Figura 2 - Mudas de *M. laevigata* transplantadas para os devidos tratamentos.



Fonte: Do autor (2025).

A irrigação foi realizada manualmente com água destilada, de três a cinco vezes por semana, utilizando volumes iniciais de 60 mL por vaso, ajustados de acordo com o crescimento das plantas e as condições de umidade do solo. O experimento teve duração total de 120 dias, desde o transplante até o encerramento da fase experimental, as plantas e solos foram coletadas e realizadas as análises experimentais no primeiro semestre de 2025.

3.4 Contagem de folhas e mensuração da altura das plantas

O número de folhas foi contabilizado manualmente, folha por folha, em todas as plantas experimentais, nos seguintes períodos: no dia da instalação do experimento, aos 15, 30, 60, 90 e 120 dias após a implantação, sendo este último correspondente ao término do experimento. A altura das plantas foi mensurada individualmente com auxílio de uma fita métrica, no dia da implantação e no dia da desmontagem do experimento. Para a mensuração final, cada planta foi posicionada sobre um plano horizontal coberto com tecido de TNT branco, garantindo padronização e melhor visualização, sendo a altura medida do colo até o ápice da planta.

3.5 Análise matéria seca

A análise da matéria seca foi realizada com o objetivo de avaliar os parâmetros de crescimento e a alocação de biomassa em diferentes partes da planta, incluindo a matéria seca das folhas (MSF), dos caules (MSC) e das raízes (MSR). Além disso, foram determinados a matéria seca da parte aérea (MSPA = MSF + MSC) e a matéria seca total (MST = MSF + MSC + MSR).

Cada planta foi colhida e separada em folhas, caule e raízes. As raízes foram lavadas em água corrente para remoção do solo aderido e, em seguida, secas com papel absorvente para eliminação do excesso de umidade. As folhas e os caules foram limpos manualmente, sem necessidade de lavagem adicional. As partes vegetativas foram acondicionadas separadamente em sacos de papel pardo, de modo a evitar a mistura entre as amostras.

As amostras foram então secas em estufa com circulação de ar forçada, mantida a temperatura constante de 45 °C, até atingirem peso constante. Essa

temperatura foi adotada por permitir uma secagem gradual, minimizando a degradação térmica dos tecidos vegetais e preservando a integridade dos metabólitos secundários presentes nas amostras. O processo de secagem teve duração entre 48 e 72 horas.

Após a secagem, as amostras foram retiradas da estufa e transferidas para dessecadores, a fim de promover o resfriamento e evitar a reabsorção de umidade do ambiente. Em seguida, cada parte da planta foi pesada em balança digital de alta precisão, e os valores de peso seco foram registrados em gramas.

3.6 Densidade de esporos de fungos micorrizicos arbusculares e colonização micorrízica

3.6.1 Extração e contagem de esporos

A extração e a contagem de esporos de FMAs foram realizadas por meio da técnica de decantação e peneiramento por via úmida, conforme descrito por GERDEMANN & NICOLSON (1963), seguida da centrifugação em solução de sacarose a 50%, de acordo com JENKINS (1964), para posterior contagem em microscópio estereoscópico.

Uma alíquota de 50 g de solo foi pesada, posteriormente completamente desagregada e suspensa com água em um recipiente com capacidade aproximada de cinco litros, ao qual se adicionou água de torneira até a metade do volume. A suspensão obtida foi cuidadosamente peneirada com o auxílio de duas peneiras sobrepostas: uma peneira superior com malha de 0,071 mm, para reter partículas maiores, e uma peneira inferior com malha de 0,045 mm, na qual os esporos e partículas menores foram retidos. O material acumulado na peneira inferior foi então transferido, com o auxílio de uma pisseta contendo água, para tubos de centrífuga de 50 mL.

Em seguida, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 3.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o resíduo no fundo dos tubos foi submetido a uma nova centrifugação, desta vez utilizando uma solução de sacarose a 50%. Para isso, adicionaram-se de 10 a 12 mL da solução ao resíduo, que foi homogeneizado antes da centrifugação a 2.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante obtido, contendo os esporos flutuantes, foi novamente peneirado utilizando uma peneira de 0,045 mm, e os esporos retidos foram lavados com água corrente para a

remoção dos resíduos de sacarose.

Os esporos limpos foram transferidos para frascos de 10 mL contendo água destilada e armazenados em câmara fria a 5 °C até o momento da contagem. A densidade de esporos foi determinada em placa canelada, que permitiu a separação e visualização sob microscópio estereoscópico. O número total de esporos foi expresso em esporos por 50 g de solo seco.

3.6.2 Coloração de raízes e contagem da colonização

A coloração das raízes foi realizada segundo o método de PHILLIPS & HAYMAN (1970), com modificações propostas por KOSKE & GEMMA (1989), para avaliação da colonização micorrízica. De cada uma das repetições foi retirada uma amostra de quatro gramas de raízes finas, lavadas, em água corrente para remoção de resíduos de solo, e armazenadas em álcool 70%. Para o procedimento de coloração, aproximadamente 1 g de raízes foi lavado em água corrente e acondicionadas em cápsulas plásticas para o início do processo de coloração.

As raízes foram submetidas à descoloração em solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% e permaneceram imersas no reagente durante uma noite, com o objetivo de clarear os tecidos e realizar uma quebra química de substâncias como lignina e compostos fenólicos, que dificultam a visualização microscópica. Após essa etapa, o KOH foi removido por meio de três lavagens consecutivas com água corrente, e as raízes foram imersas em solução de ácido clorídrico (HCl) a 1% por 5 minutos, a fim de neutralizar resíduos alcalinos e preparar o material para a fixação do corante.

As raízes então foram coradas com azul de tripiano a 0,05%, sendo mantidas em banho- maria a 90 °C por 30 minutos, o que permitiu a coloração de estruturas micorrízicas como hifas, arbúsculos e vesículas. Após esse período, as raízes foram armazenadas em frascos de vidro contendo solução de glicerol acidificado (500 mL de glicerina, 450 mL de água destilada e 50 mL de HCl a 1%), utilizada para a preservação das características anatômicas e remoção do excesso de corante.

A análise da colonização foi realizada com o auxílio de microscópio óptico, seguindo os métodos descritos por TROUVELOT *et al.* (1986), com modificações de MCGONIGLE *et al.* (1990) e HERRERA-PERRAZA *et al.* (2004). A porcentagem de colonização foi determinada com base em uma escala de seis níveis: 0% (sem

colonização), 1 (1–20%), 2 (21–40%), 3 (41–60%), 4 (61–80%) e 5 (>80%) de colonização.

3.7 Material vegetal e preparo de extrato de *M. laevigata*

Todas as folhas de *M. laevigata* foram coletadas, acondicionadas em sacos de papel kraft e secas em estufa de circulação de ar forçada a 45 °C até atingirem peso constante. Em seguida, as folhas secas foram trituradas em moinho de facas e tamisadas em peneira com abertura de 8500 M e malha 20 TY, visando padronizar o tamanho das partículas.

A extração da droga vegetal foi realizada de acordo com a metodologia descrita na *Farmacopeia Brasileira* (7ª edição, BRASIL, 2024), com adaptações na quantidade de material vegetal e nas vidrarias utilizadas.

Pesou-se 0,4 g da droga vegetal pulverizada e transferiu-se para um balão de fundo redondo de 250 mL. Adicionaram-se 40 mL de etanol a 50% (v/v), e a mistura foi submetida à extração sob refluxo, a 90 °C, por 30 minutos. Após resfriamento, o extrato foi filtrado em papel-filtro e transferido para um balão volumétrico de 100 mL.

O resíduo vegetal retido no balão e no filtro passou por uma segunda extração, com mais 40 mL de etanol a 50% (v/v), nas mesmas condições de refluxo, por 10 minutos. Após novo resfriamento, os extratos foram reunidos no balão volumétrico e o volume final foi completado com etanol a 50% (v/v).

Para a concentração do extrato, alíquotas de 10 mL foram transferidas para balões e submetidas à rotaevaporação em banho-maria a 40 °C. O resíduo extrativo obtido foi ressuspenso em 1 mL de acetonitrila e água acidificada com 1% de ácido fosfórico, na proporção de 40:60 (v/v), seguido de sonicação por 5 minutos. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido para frascos tipo *vial*, destinados à posterior injeção no cromatógrafo.

3.8 Análises Cromatográficas

3.8.1 Padrão de reagentes

Para as análises quantitativas foram utilizados padrão de cumarina $\geq 99\%$, (Sigma- Aldrich), álcool etílico absoluto (Merck), ácido fosfórico P.A. (Êxodo), água ultrapura Milli-Q (Millipore), acetonitrila grau HPLC (J.T.Baker).

3.8.2 Equipamentos

A presença da cumarina em *M. laevigata*, é bem documentada na literatura (GRAÇA *et al.*, 2007; BERTOLUCCI *et al.*, 2013; FONSECA *et al.*, 2020). Entretanto, sua presença nos extratos obtidos pelos experimentos de inoculação com FMAs foi caracterizada empregando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos (HPLC-DAD).

A caracterização da cumarina nas amostras por HPLC-DAD foram realizadas em sistema Agilent 1200 Series (Agilent Technologies®, Waldbronn, Alemanha), equipado com bomba quaternária (G1311A), sistema de degasificação (G1322A), amostrador automático ALS (G1322A) e detector de arranjo de diodos (G1315D), com detector ultravioleta de comprimento de onda variável (G1315D), conectado ao computador com sistema controlado pelo *software* EzChrom, versão OpenLAB. As separações foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa Eclipse XDB-C18 (5 µm × 250 mm × 4,6 mm I.D.) (Agilent Technologies®, EUA), com pré-coluna, mantida a 25 °C.

3.8.3 Condição cromatográfica

A análise cromatográfica foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em sistema equipado com detector de ultravioleta (UV) ajustado a 210 nm. O sistema operou em modo de eluição gradiente, utilizando água (fase A) e acetonitrila (fase B), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fosfórico. O gradiente foi programado da seguinte forma: 0–3 min, 60% B (isocrático); 3–5 min, 95% B; 5–14 min, 95% B; 14–15 min, 95–60% B; 15–20 min, 60% B. A taxa de fluxo foi de 1,5 mL/min, com volume de injeção de 10 µL, e a detecção realizada no comprimento de onda de 210 nm.

A coluna analítica empregada foi empacotada com sílica modificada com grupos octadecilsilano (C18), com dimensões de 250 mm de comprimento, 3,9 mm de diâmetro interno e partículas de 4 µm, acoplada a uma pré-coluna compatível para proteção e estabilização do sistema.

Foram injetados separadamente 10 µL da solução padrão e das amostras. A presença de cumarina nas amostras foi confirmada pela comparação dos tempos de retenção, espectros no UV e co-injeção com o padrão de referência. O teor de cumarina foi determinado pela comparação das áreas dos picos da amostra com as da solução padrão, utilizando o método de quantificação por padrão externo, conforme preconizado pela Farmacopeia Brasileira.

3.8.4 Quantificação de cumarina

A quantificação da cumarina foi realizada pelo método do padrão externo (SILVA et al., 2008), empregando-se as mesmas condições cromatográficas utilizadas para a caracterização do composto.

A seletividade do método foi avaliada por três critérios: (i) comparação do tempo de retenção do analito com o padrão de referência; (ii) realização de ensaio de coeluição, adicionando o padrão à amostra para observar a intensificação do pico correspondente; e (iii) análise espectral no detector de arranjo de diodos (DAD), monitorando o comprimento de onda de 210 nm.

A curva analítica foi construída a partir de diferentes concentrações do padrão, com cinco pontos por curva, obtidos por injeções em triplicata. Três curvas independentes foram construídas em dias distintos.

Para a avaliação da linearidade, foram preparadas soluções de referência de cumarina a partir de uma solução-mãe obtida pela pesagem de 10 mg do padrão, dissolvidos em 10 mL da mistura de acetonitrila e água acidificada com 1% de ácido fosfórico (40:60, v/v), resultando em uma concentração de 1.000 µg/mL. A partir desta solução, realizaram-se diluições sucessivas no mesmo solvente até se obter a solução de trabalho de 50 µg/mL, utilizada para injeção no cromatógrafo.

As áreas dos picos foram correlacionadas com a massa injetada por regressão linear, utilizando o método dos mínimos quadrados. Os parâmetros estatísticos, incluindo inclinação, intercepto, erros padrão e coeficientes de determinação (R^2), foram determinados para cada curva. A similaridade entre as curvas foi avaliada por análise de covariância (ANCOVA), com nível de significância de $p < 0,05$, utilizando o software GraphPad Prism 8.02. As amostras foram analisadas em triplicata, e os teores de cumarina foram expressos em miligramas por grama de extrato (mg g⁻¹).

3.9 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise estatística utilizando-se o software R. Inicialmente, foi verificada a normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. Ao serem atendidos os requisitos, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para avaliar os efeitos principais e a interação dos fatores (inoculação com FMAs e condição do

solo) e para comparação das médias, foi aplicado o teste post hoc de Tukey, adotando-se nível de significância de 0,05.

4 RESULTADOS

A análise de variância revelou efeitos significativos da inoculação micorrízica e da autoclavagem do solo sobre todas as variáveis avaliadas, exceto para o teor de cumarina, que não foi influenciado pela autoclavagem (Tabela 1). Observou-se ainda que a interação entre os fatores foi significativa para a altura das plantas, a colonização micorrízica, a densidade de esporos e o teor de cumarina, indicando que a resposta dessas variáveis dependeu da combinação dos tratamentos. Os coeficientes de variação (CV) variaram de 1,86% a 20,54%, situando-se em níveis aceitáveis para experimentos desta natureza.

Tabela 1 - Significância estatística dos efeitos da inoculação micorrízica (I), autoclavagem do solo (S) e IxS sobre as variáveis: altura de planta, número de folhas, matéria seca parte aérea, de raízes e total, colonização micorrízica, densidade de esporos e cumarina.

Variáveis	Inoculação micorrízica (I)	Autoclavagem do solo (S)	IxS	CV (%)
Altura da planta (cm)	***	***	**	10,94
Número de folhas	***	***	ns	13,63
Matéria seca parte aérea (g)	**	**	ns	19,71
Matéria seca raiz (g)	**	**	ns	20,54
Matéria seca total (g)	***	***	ns	18,31
Colonização micorrízica (%)	***	***	***	1,86
Densidade de esporos (50g/solo)	***	***	***	5,10
Cumarina (mg/g folha seca)	***	ns	***	3,46

Significância: *** ($p \leq 0,001$), ** ($p \leq 0,01$) e ns (não significativo). CV = coeficiente de variação.

A altura de plantas de *M. laevigata* apresentou diferenças em função dos tratamentos aplicados (Tabela 2). O maior valor foi obtido no tratamento com solo não autoclavado e inoculado com fungo micorrízico arbuscular (216,20 cm), indicando efeito positivo da inoculação em presença da microbiota nativa. Em solo não autoclavado, a ausência de inoculação resultou em redução significativa na altura (171,57 cm), evidenciando a importância da simbiose micorrízica no desenvolvimento

da parte aérea. No solo autoclavado, a inoculação com fungo (175,50 cm) promoveu incremento em relação à ausência de inoculação (95,30 cm), mas não alcançou os valores observados no solo não autoclavado, o que sugere que a presença da microbiota nativa potencializa os efeitos da inoculação. O coeficiente de variação foi de 10,93%, indicando adequada precisão experimental.

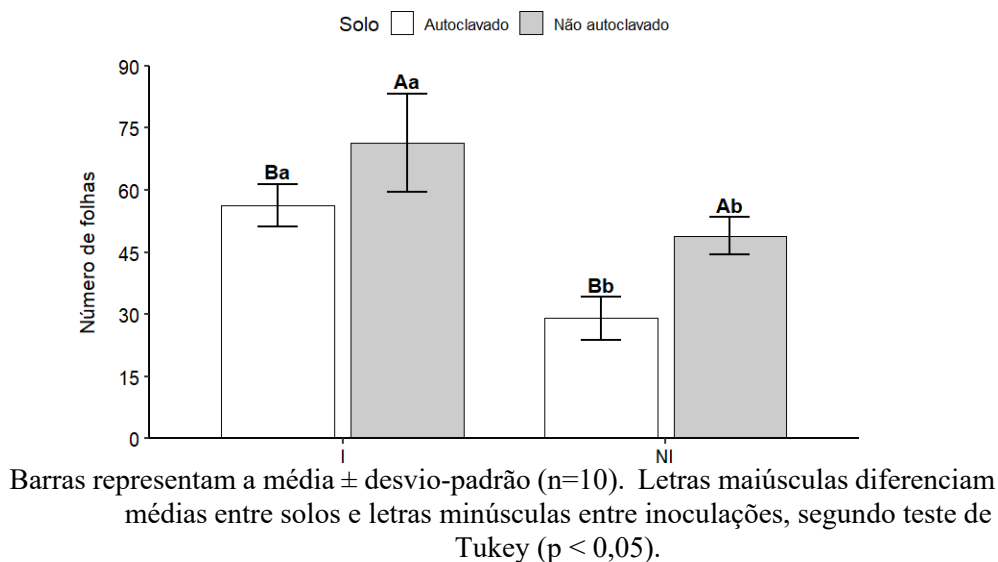
Tabela 2 - Efeito da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e da autoclavagem do solo sobre a altura de plantas (cm) de *M. laevigata*, cultivadas em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com *Rhizophagus clarus*

Solo \ Fungo	Inoculado	Não inoculado
Autoclavado	175,50 Ba	95,30 Bb
Não autoclavado	216,20 Aa	171,57 Ab
CV (%)	—	10,93

Letras maiúsculas diferenciam médias entre solos e letras minúsculas entre inoculações, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). O coeficiente de variação (CV).

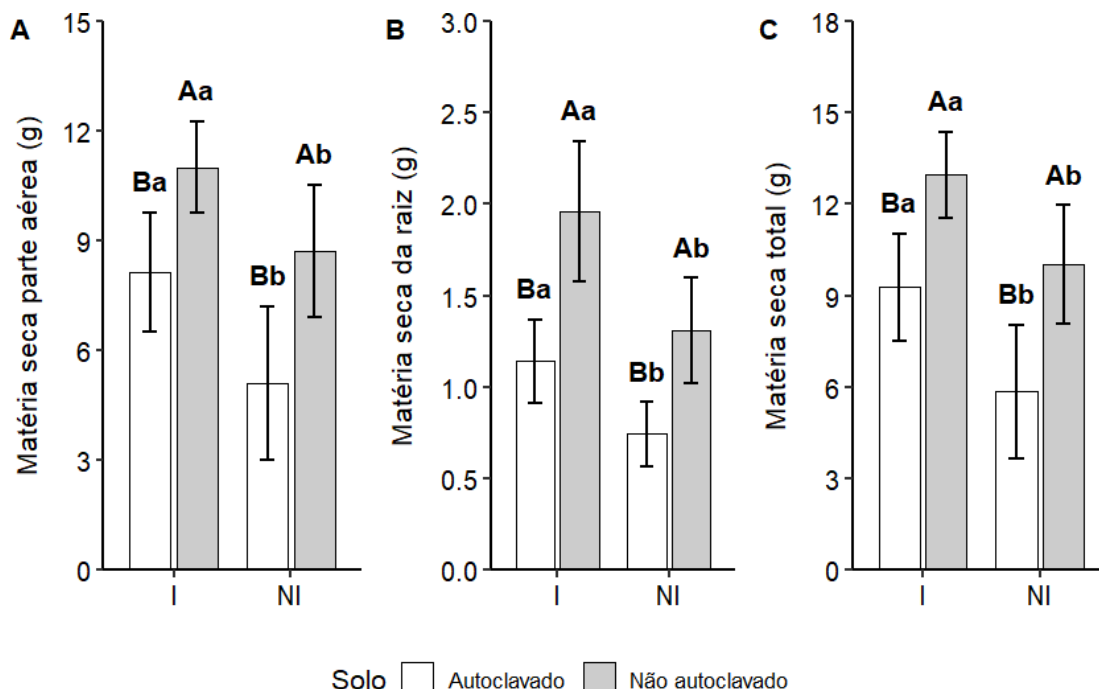
O número de folhas foi influenciado pela inoculação com FMA e pelo tipo de solo (Figura 3). O maior valor foi observado em plantas inoculadas cultivadas em solo não autoclavado (71,4 folhas), enquanto o menor ocorreu em plantas não inoculadas em solo autoclavado (29,0 folhas). O tratamento solo autoclavado e inoculado (56,3 folhas) e não autoclavado e não inoculado (48,9 folhas) apresentaram valores intermediários (Tukey, $p \leq 0,05$).

Figura 3 - Número de folhas de *M. laevigata* (guaco) aos 120 dias após o plantio, cultivada em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com *Rhizophagus clarus*.



Os resultados obtidos para a biomassa de *M. laevigata* estão representados na Figura 4, que mostra os valores da matéria seca da parte aérea, das raízes e total, em função da inoculação com FMAs e do tipo de solo (autoclavado ou não autoclavado). De modo geral, a inoculação com FMAs promoveu aumentos na biomassa da planta, tanto em solo autoclavado quanto não autoclavado, com os maiores valores observados no tratamento inoculado cultivado em solo não autoclavado. Esse desempenho evidencia a importância da microbiota nativa do solo na efetividade da simbiose micorrízica. A maior matéria seca total foi registrada no tratamento solo não autoclavado e com fungo, enquanto o menor desempenho ocorreu no tratamento solo autoclavado e sem fungo, sugerindo que a combinação da inoculação com a presença da microbiota nativa do solo favorece o crescimento de *M. laevigata*.

Figura 4 - Efeito da inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e da autoclavagem do solo sobre a matéria seca da parte aérea, da raiz e total de *M. laevigata*, cultivadas em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com *Rhizophagus clarus*



Solo ☐ Autoclavado ☒ Não autoclavado
 As barras representam as médias ($n = 10$) $\pm$ desvio padrão. Letras maiúsculas diferenciam médias entre solos e letras minúsculas entre inoculações, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Conforme apresentado na Tabela 3, a colonização micorrízica (%) de *M. laevigata* variou entre os diferentes tratamentos de solo e inoculação com *Rhizophagus clarus* ($p < 0,05$). Observou-se diferenças tanto entre os fatores solo (autoclavado vs. não autoclavado) e inoculação (inoculado vs. não inoculado), quanto na interação entre esses dois fatores. O solo não autoclavado com inoculação apresentou o maior percentual de colonização, alcançando 91,40%, diferindo dos demais tratamentos. No solo autoclavado, a inoculação também resultou em alta colonização (76,25%), superior ao tratamento sem inoculação nesse mesmo solo (8,38%). Já no solo não autoclavado, a ausência de inoculação ainda possibilitou uma colonização considerável (80,76%), indicando a presença de microrganismos nativos.

Tabela 3 - Colonização micorrízica (%) de *M. laevigata* sob diferentes tratamentos, em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com *Rhizophagus clarus*.

Solo \ Fungo	Inoculado	Não inoculado
Autoclavado	76,25 Ba	8,38 Bb
Não autoclavado	91,40 Aa	80,76 Ab
CV (%)	—	1,86

Letras maiúsculas diferenciam médias entre solos e letras minúsculas entre inoculações, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). O coeficiente de variação (CV).

A densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no solo variou entre os tratamentos aplicados, conforme apresentado na Tabela 4. O tratamento com solo não autoclavado e inoculado com fungo apresentou a maior média (212,5 esporos), diferindo de todos os demais grupos. No mesmo solo, a ausência de inoculação resultou em densidade de 81,67 esporos, evidenciando que, embora a microbiota nativa esteja presente, a inoculação com fungo contribui para um aumento expressivo na densidade de esporos. No solo autoclavado, a inoculação resultou em 85,70 esporos, semelhante à observada no tratamento solo não autoclavado e não inoculado, enquanto a ausência de inoculação no solo autoclavado apresentou a menor densidade (16,60 esporos), indicando efeito deletério da autoclavagem do solo quando não há reposição de fungos simbiossiontes. A interação entre os fatores solo e inoculação ($p < 0,001$) reforça que a resposta da densidade de esporos à inoculação depende da condição microbiológica do solo.

Tabela 4- Densidade de esporos de FMAs no solo sob diferentes tratamentos, em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com *Rhizophagus clarus*.

Solo \ Fungo	Inoculado	Não inoculado
Autoclavado	85,70 Ba	16,60 Bb
Não autoclavado	212,50 Aa	81,67 Ab
CV (%)	—	5,10

Letras maiúsculas diferenciam médias entre solos e letras minúsculas entre inoculações, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). O coeficiente de variação (CV).

A concentração de cumarina nas folhas secas de *M. laevigata* foi influenciada pelo fator inoculação ($p < 0,001$) e pela interação entre solo e inoculação ($p < 0,001$), enquanto o fator solo isolado não apresentou efeito significativo ($p = 0,6254$) (Tabela 5). O maior teor de cumarina foi observado no tratamento com solo não autoclavado e inoculado com fungo, com média de 0,82 mg/g, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. A inoculação promoveu incremento na biossíntese da cumarina apenas quando realizada em solo não autoclavado, sugerindo que a presença da microbiota nativa favoreceu a simbiose micorrízica funcional. Nos demais tratamentos, não foram observadas diferenças entre si, indicando que, na ausência da microbiota ou do fungo inoculado, o acúmulo do composto não foi significativamente afetado

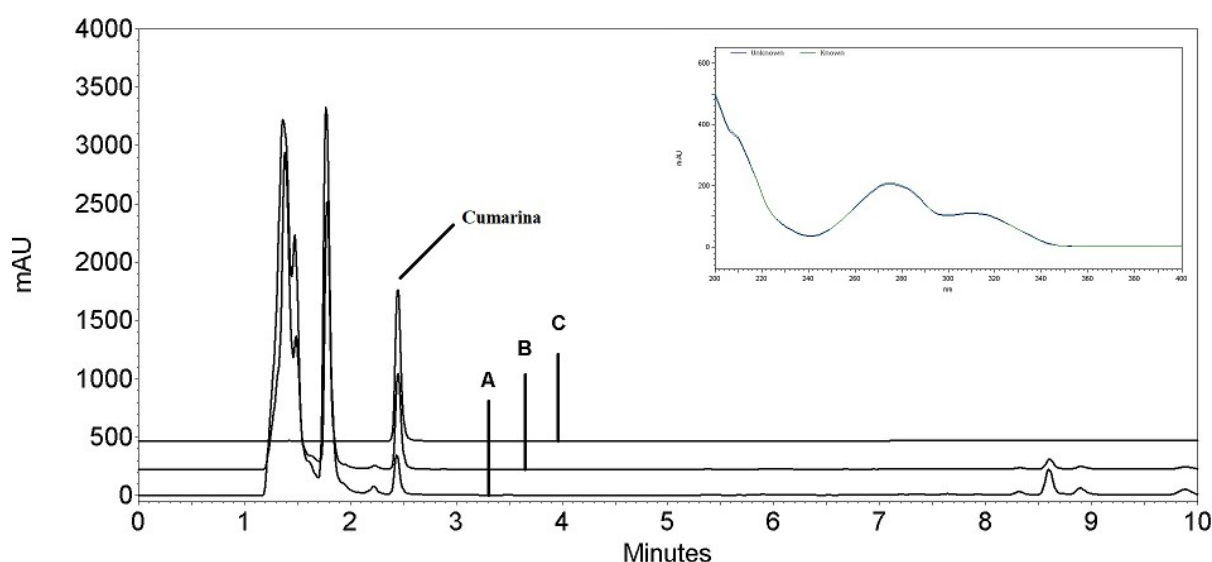
Tabela 5 - Concentração de cumarina (mg/g de folha seca) em *M. laevigata* sob diferentes tratamentos, em solo autoclavado ou não e inoculado ou não com *Rhizophagus clarus*.

Solo \ Fungo	Inoculado	Não inoculado
Autoclavado	0,57 Ab	0,68 Ab
Não autoclavado	0,82 Aa	0,67 Ab
CV (%)	—	3,46

Letras maiúsculas diferenciam médias entre solos e letras minúsculas entre inoculações, segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). O coeficiente de variação (CV).

A seletividade do método de quantificação de cumarina foi confirmada pela coincidência do tempo de retenção entre a cumarina padrão e a amostra, pela intensificação do pico após co-injeção do padrão e pela sobreposição dos espectros no detector DAD a 210 nm. O tempo de retenção médio da cumarina observado foi de 2,42 minutos, sendo coincidente entre a amostra e o padrão. A Figura 5 apresenta os cromatogramas representativos da seletividade do método, evidenciando o pico característico da cumarina nas três condições: amostra, padrão e co-injeção.

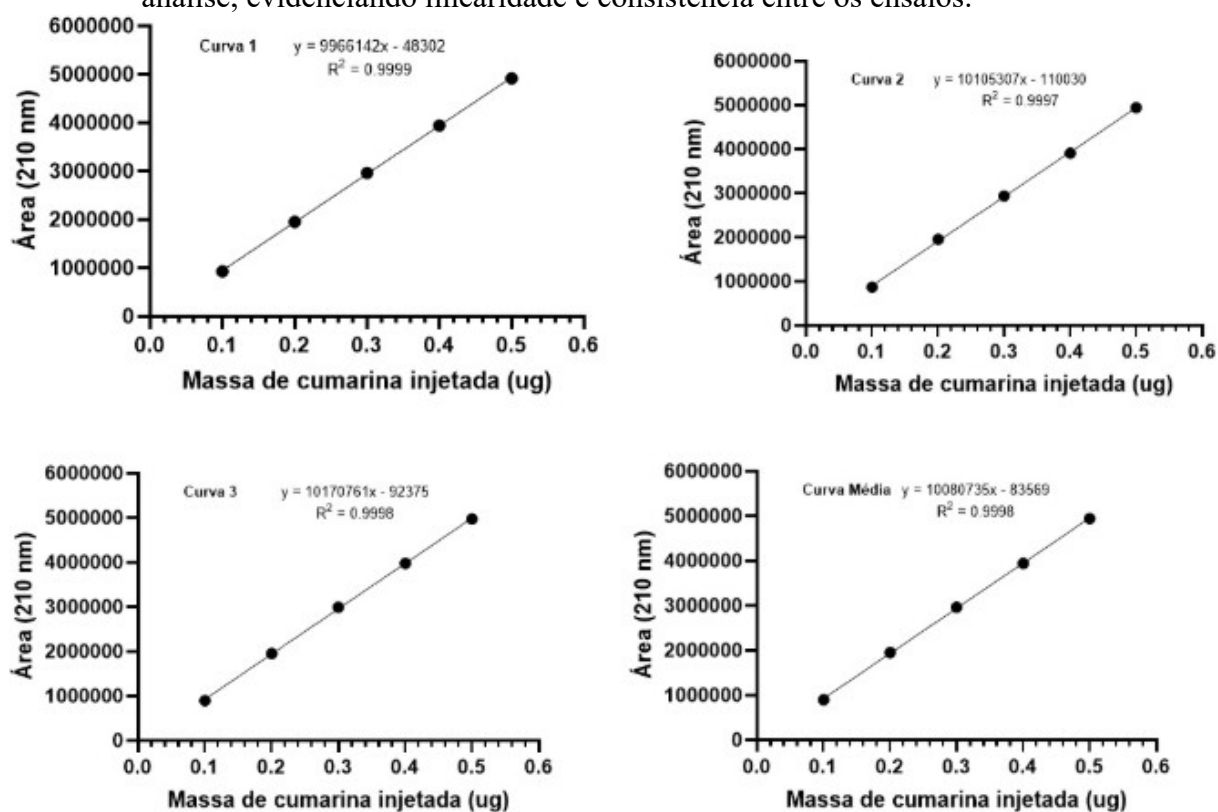
Figura 5 – Cromatogramas representativos da seletividade do método: (A) amostra de extrato, (B) padrão de referência de cumarina e (C) co-injeção (amostra + padrão), evidenciando a intensificação do pico de cumarina no tempo de retenção correspondente.



Fonte: Autora (2025).

A linearidade do método foi avaliada a partir de três curvas analíticas independentes, construídas em dias consecutivos, utilizando cinco pontos por curva e injeções em triplicata. A relação entre a área do pico e a massa injetada apresentou excelente correlação, com coeficientes de determinação (R^2) variando de 0,9997 a 0,9999. As curvas foram estatisticamente comparadas por análise de covariância (ANCOVA, $p < 0,05$), confirmando a robustez e repetibilidade do método.

Figura 6 – Curvas analíticas de cumarina obtidas em três dias consecutivos de análise, evidenciando linearidade e consistência entre os ensaios.



Fonte: Autora (2025).

Os parâmetros estatísticos das curvas estão apresentados na Tabela 6. Todos os valores de inclinação, intercepto e coeficiente de determinação confirmam a adequação do método para quantificação precisa da cumarina nas amostras analisadas.

Tabela 6 – Parâmetros estatísticos das curvas analíticas de cumarina obtidas em três dias consecutivos de análise.

Parâmetros estatísticos	Dia 1	Dia 2	Dia 3
Faixa linear (μg)	0,1 a 0,5		
Coefficiente de determinação	0,9999	0,9997	0,9998
Inclinação	9966142	10105307	10170761
Erro padrão da inclinação	65086	107771	90669
Valor P - inclinação das 3 curvas	0,3045		
Intercepto	-48302	-110030	-92375
Erro padrão do intercepto	21587	35744	30071
Valor P - interceptos das 3 curvas	0,1768		

Fonte: Autora (2025).

5 DISCUSSÃO

A *M. laevigata* inoculada com o fungo micorrízico arbuscular *Rhizophagus clarus* em solo não autoclavado apresentou o melhor desempenho vegetativo, evidenciando o efeito sinérgico entre o fungo e a microbiota nativa do solo. Esses fatores, isolados e em interação, atuam promovendo benefícios na altura, número de folhas, matéria seca, densidade de esporos, colonização de raízes e teores de cumarina na planta. Tal resultado pode ser atribuído à interação positiva entre *R. clarus* e os microrganismos naturalmente presentes, que potencializam a colonização micorrízica e os efeitos fisiológicos associados. Segundo REYES- SÁNCHEZ *et al.* (2022), a integridade da comunidade microbiana edáfica é essencial para o sucesso da simbiose, favorecendo mecanismos como maior absorção de fósforo, modulação hormonal e eficiência no uso da água (SMITH & SMITH, 2011; CHAHAL *et al.*, 2021).

Isso demonstra o papel fundamental dos microrganismos indígenas da rizosfera no crescimento das plantas e na sustentabilidade agrícola (CASTRILLO *et al.*, 2017; COBB *et al.*, 2017). Tais microrganismos, como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PGPRs) e fungos micorrízicos, beneficiam o desenvolvimento das plantas não apenas por facilitarem a aquisição de nutrientes e água, mas também pela regulação hormonal e defesa contra patógenos (PANKE-BUISSE *et al.*, 2015). Além disso, aumentam a resiliência das plantas frente a estresses abióticos intensificados pelas mudanças climáticas como seca, salinidade, temperaturas extremas e deficiências nutricionais, influenciam positivamente a ecologia do microbioma do solo, promovem a fertilidade e melhoram a estrutura do solo (VALENZUELA- ARAGON *et al.*, 2025; FARHAOUI *et al.*, 2025).

A inoculação isolada do fungo em solo autoclavado resultou em crescimento vegetativo, mas inferior ao observado no solo não autoclavado inoculado (Tabela 2 e Figura 4), reforçando que a autoclavagem elimina simbiontes essenciais ao desenvolvimento vegetal. De forma consistente, a matéria seca total foi significativamente maior no tratamento com solo não autoclavado e inoculado, enquanto o menor valor foi registrado no solo autoclavado e sem fungo, evidenciando que a combinação entre FMAs e microbiota nativa favorece a alocação de biomassa na planta (Figura 5). A superioridade do tratamento com solo não

autoclavado e inoculado também foi refletida em variáveis morfofisiológicas, como altura da planta e número de folhas, indicadoras do vigor vegetativo.

URCOVICHE (2015) demonstrou que a inoculação com *R. clarus* promoveu aumento da altura e do número de folhas em *Mentha crispa*, especialmente em solos com suprimento de fósforo (colocar a dose). BARAZETTI et al. (2021) observaram, em *M. laevigata* cultivada sob 70% de irradiância, maior colonização por FMAs e maior produção de biomassa seca, reforçando que a simbiose com FMAs contribui para a nutrição mineral e o equilíbrio metabólico da planta. Adicionalmente, BARAZETTI et al. (2022) relataram aumento da biomassa seca e da colonização micorrízica em *M. laevigata* cultivada com vermicomposto, evidenciando que práticas sustentáveis que mantêm a microbiota ativa potencializam os efeitos dos FMAs. ALMEIDA et al. (2018) também destacaram o impacto positivo da micorrização na biomassa seca foliar de *M. laevigata*, com menor influência sobre raízes e caules, corroborando os achados do presente estudo.

Outros estudos com espécies medicinais e alimentícias reforçam os benefícios da micorrização. Em *Erythrina variegata*, MANOHARAN et al. (2010) verificaram aumento significativo da biomassa seca após inoculação com *Funneliformis mosseae* sob estresse hídrico. Em *Sesbania sesban*, ABDEL-FATTAH et al. (2015) observaram incremento no crescimento e no peso fresco com diferentes FMAs. Esses dados sustentam a consistência dos benefícios da simbiose micorrízica em diversas espécies e condições ambientais.

Os teores de cumarina em *M. laevigata* foram influenciados pela interação entre o tipo de solo e a inoculação com fungo micorrízico arbuscular (tabela 5). O maior incremento na concentração de cumarina foi verificado no tratamento com solo não autoclavado inoculado com o fungo. Esses resultados indicam que a presença concomitante do fungo micorrízico arbuscular e da microbiota nativa potencializou a biossíntese de cumarina, possivelmente refletindo melhor adaptação da planta ao ambiente e favorecimento das vias metabólicas secundárias em condições simbióticas.

Resultados semelhantes foram relatados por LIMA (2017), que observou aumento nos teores de fenóis totais e taninos em *Caesalpinia leptophloeos* após inoculação com *Gigaspora albida*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Acaulospora longula*, destacando o potencial da simbiose micorrízica na indução de metabólitos de relevância farmacológica. De forma análoga, OLIVEIRA et al. (2013)

demonstraram que mudas de *Myracrodruon urundeuva* associadas a *Acaulospora longula* apresentaram maiores concentrações de fenóis e flavonoides, reforçando o papel biotecnológico das micorrizas na qualidade química de plantas medicinais. LIMA *et al.* (2015) e ANDRADE (2013) também relataram que a inoculação com FMAs aumentou significativamente os teores de compostos fenólicos em *Inga vera* (*Gigaspora albida*, *Claroideoglossum etunicatum* e *Acaulospora longula*) e de alcaloides em *Catharanthus roseus* (*Glomus etunicatum*). XIE *et al.* (2018) sugeriram que a inoculação com *Rhizophagus irregularis* pode melhorar o acúmulo de glicirrizina e liquiritina nas raízes de alcaçuz (*Glycyrrhiza uralensis*).

A ausência de aumento na concentração de cumarina nos tratamentos com solo autoclavado, inoculado ou não, indica que, sem a microbiota funcional, o fungo micorrízico até estimula a biossíntese do metabólito, mas em menor intensidade do que quando essa microbiota está presente. Além disso, a inoculação fúngica isolada, sem o suporte da microbiota nativa, não aumentou a concentração de cumarina, tendência semelhante à observada por ALMEIDA *et al.* (2018) em *M. laevigata*, que registraram indução seletiva da via biossintética de terpenoides sem aumento nos níveis de cumarina. HARBORT *et al.* (2020), em estudos com *Arabidopsis thaliana*, demonstraram que a secreção de cumarinas sob deficiência de ferro contribui para a solubilização do nutriente e modulação da microbiota rizosférica, reforçando o papel dessas moléculas na defesa e adaptação vegetal.

Dessa forma, os resultados evidenciam que a produção de cumarina em *M. laevigata* está relacionada ao estado nutricional da planta, às interações simbióticas e ao contexto microbiano do solo. A simbiose micorrízica mostra-se uma ferramenta promissora para a indução de compostos bioativos quando associada ao manejo ecológico da microbiota edáfica.

YU *et al.* (2020) observaram que raízes de *G. uralensis* já apresentavam colonização por FMAs indígenas em solo não esterilizado, mas que a inoculação com fungo exógeno (*Rhizophagus irregularis*) aumentou a intensidade da colonização radicular. Isso demonstra que, embora o solo contenha propágulos nativos, a adição de inóculo pode intensificar a simbiose. Segundo VERBRUGGEN *et al.* (2013), três fatores principais interferem na eficácia da inoculação com FMAs: (1) a competitividade dos fungos nativos em relação aos introduzidos; (2) a compatibilidade entre planta, fungo e solo; e (3) os efeitos de prioridade ecológica e ambiental. Esses fatores ajudam a explicar por que o solo autoclavado com inóculo

isolado não atingiu o mesmo desempenho do solo não autoclavado com FMA, sugerindo que a presença da microbiota nativa favorece sinergias indispensáveis ao sucesso da simbiose.

Sob uma perspectiva agroecológica, os FMAs atuam como biofertilizantes naturais, eficazes no aumento da produtividade vegetal e na redução da dependência de insumos químicos, que têm impacto ambiental significativo (MA *et al.*, 2022; FAO, 2022; MRUNALINI *et al.*, 2022). O manejo da microbiota do solo, associado à inoculação de simbiontes radiculares, constitui uma estratégia promissora para o cultivo de espécies medicinais como *M. laevigata*.

A densidade de esporos e a colonização radicular também refletiram a influência direta da inoculação e das condições microbiológicas do solo. A alta densidade de esporos pode estar relacionada à interação sinérgica entre o fungo inoculado e a microbiota nativa, favorecendo o estabelecimento da simbiose e a reprodução dos propágulos. A literatura aponta que a densidade de esporos pode ser influenciada por exsudatos radiculares, atributos do solo, compatibilidade planta-fungo e interações microbianas (MUNKVOLD *et al.*, 2004; CHAUHAN *et al.*, 2013). No entanto, nem sempre se correlaciona com a colonização (DÍAZ & HONRUBIA, 1994; SHARMA *et al.*, 2025), pois a esporulação ocorre em estágios distintos do ciclo simbiótico e pode ser modulada por fatores ambientais.

A associação entre maior densidade de esporos e maiores valores de colonização foi observada no tratamento inoculado e cultivado em solo não autoclavado, indicando que a presença concomitante de *R. clarus* e da microbiota nativa favoreceu a simbiose micorrízica. O solo autoclavado inoculado também apresentou incremento expressivo em relação ao não inoculado, mas com valores inferiores aos obtidos no solo não autoclavado, sugerindo que a microbiota nativa exerceu papel sinérgico na promoção da colonização e esporulação.

De forma semelhante, DOS SANTOS *et al.* (2024) relataram que a colonização micorrízica aumenta com o tempo de cultivo, evidenciando que fungos nativos do solo são progressivamente recrutados ao longo do sistema de cultivo. Esses autores reforçam a importância da microbiota nativa na promoção da relação simbiótica e na melhoria da absorção de nutrientes essenciais.

Resultados convergentes também foram descritos por SOUZA *et al.* (2022), que observaram maior esporulação de *R. clarus* quando co-inoculado com *Azospirillum brasilense*. Embora este estudo não tenha utilizado co-inóculo, é plausível que a

microbiota do solo não autoclavado tenha promovido efeito funcional semelhante. LEAL *et al.* (2022) relataram que a inoculação com FMA comercial aumentou a disponibilidade de propágulos em solo salino, enquanto GEBRESLASSIE *et al.* (2024) mostraram que a co-inoculação de *R. clarus* com *Bacillus subtilis* promoveu maior esporulação e colonização em *Allium cepa*, *Lycopersicon esculentum* e *Cucurbita pepo*. COSCOLÍN *et al.* (2019) observaram que a inoculação com *Glomus intraradices* e *Glomus etunicatum* aumentou a densidade de esporos e a colonização sob maior umidade, destacando a influência de fatores abióticos.

Adicionalmente, ALMEIDA *et al.* (2018) reportaram colonização entre 80% e 87% em *M. laevigata* inoculada com *R. irregularis*, destacando sua alta compatibilidade micorrízica. URCOVICHE *et al.* (2015) observaram colonização de até 61% com *R. clarus*, mesmo sob baixos níveis de fósforo, reiterando a relevância da simbiose para a nutrição vegetal em ambientes desafiadores.

Apesar dos resultados promissores, reconhecem-se limitações metodológicas. A condução do experimento em casa de vegetação, embora controle a variabilidade ambiental, pode superestimar os efeitos simbióticos. HEINZE *et al.* (2016), SCHITTKO *et al.* (2016) e FORERO *et al.* (2019) apontam que os feedbacks planta-solo em estufas diferem dos observados em campo. Em ambientes naturais, a micorrização é influenciada por temperatura, umidade, antagonistas microbianos e competição. PEÑUELAS-RUBIO *et al.* (2022) relataram redução de 38% na colonização por FMAs com aumento da temperatura, enquanto SHUKLA *et al.* (2013) observaram variações na eficiência entre consórcios fúngicos sob diferentes níveis de umidade.

Outra limitação foi o uso de um único isolado fúngico. Estudos demonstram que consórcios com diferentes espécies de FMAs e rizobactérias promotoras de crescimento (RPCs) são mais eficazes. MOREIRA *et al.* (2020) mostraram maior eficiência de consórcios com *R. irregularis*, *P. reactans* e *P. alli* em solos salinos. MISHRA *et al.* (2016) observaram maior absorção de ferro com associações entre *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora* e bactérias como *Streptomyces*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* e *Paenibacillus*. YADAV *et al.* (2021) evidenciaram que consórcios entre FMAs e *Bacillus* sp. aumentaram o rendimento do trigo e melhoraram a fertilidade do solo.

Diante disso, recomenda-se que futuras pesquisas ampliem o enfoque metodológico, avaliando a inoculação com consórcios microbianos e em condições

de campo. Isso permitirá compreender melhor a resiliência e a funcionalidade da simbiose micorrízica, contribuindo para estratégias agroecológicas sustentáveis e para a biofortificação de espécies medicinais como *M. laevigata*.

6 CONCLUSÃO

A inoculação com *Rhizophagus clarus* exerce efeito positivo sobre o crescimento de *M. laevigata*, especialmente quando associada ao solo não autoclavado, cuja microbiota nativa potencializa a simbiose micorrízica. Nesse tratamento, observou-se teor de cumarina de 0,83 mg, representando um ganho de 20,59% em relação ao solo autoclavado e sem inoculação, além de superar o valor mínimo estabelecido pela Farmacopéia Brasileira (0,15%). Por outro lado, o solo autoclavado limitou a expressão desse potencial, possivelmente pela redução da complexidade microbiana e consequente perda de interações ecológicas essenciais. Esses achados reforçam a importância de considerar a integridade da microbiota do solo em programas de manejo e cultivo de espécies medicinais, indicando que estratégias integradas, aliando inoculação micorrízica e preservação da comunidade microbiana nativa, podem ser decisivas para otimizar a produção de cumarina e outros metabólitos de interesse farmacológico.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, G. M. *et al.* Influence of arbuscular mycorrhiza and phosphorus fertilization on the gas exchange, growth and phosphatase activity of soybean (*Glycine max* L.) plants. **Photosynthetica**, v. 52, n. 4, p. 581-588, 2014.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. **Gruver, TX USA: Texensis Publishing**, 2017.
- AFSHARI, M. *et al.* Mycorrhizal Colonization Modulates the Essential Oil Profile and Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidants to Mitigate the Adverse Effects of Water Deficit in *Salvia subg. Perovskia*. **Biology**, v. 11, n. 12, p. 1757, 2022.
- AFTAB, T.; HAKEEM, K. R. **Medicinal and aromatic plants: expanding their horizons through omics**. Academic Press, 2020.
- ALMEIDA, C. *et al.* Mycorrhizal influence on the growth and bioactive compounds composition of two medicinal plants: *Mikania glomerata* Spreng. and *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker (Asteraceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, p. 233-240, 2018.
- ALVES, C. F. *et al.* Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *M. laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 61, n. 8, p. 1097-1104, 2009.
- ANDRADE, S. A. L. *et al.* Association with arbuscular mycorrhizal fungi influences alkaloid synthesis and accumulation in *Catharanthus roseus* and *Nicotiana tabacum* plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 3, p. 867-880, 2013.
- ARAIM, G. *et al.* Root colonization by an arbuscular mycorrhizal (AM) fungus increases growth and secondary metabolism of purple coneflower, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 6, p. 2255-2258, 2009.
- BARAZETTI, V. M. *et al.* Growth, leaf gas exchange and mycorrhizal colonization of three medicinal species submitted to different irradiance levels. **Ciência Rural**, v. 52, n. 3, p. 2020- 0633, 2021.
- BARAZETTI, V. M. *et al.* Management perspectives aimed at maximizing the production of secondary metabolites from medicinal plants in agroforestry systems. **Agroforestry Systems**, v 96, n. 4, p. 681-695, 2022.
- BARBIERI, C.; BORSOTTO, P. Essential oils: market and legislation. **Potential of essential oils**, p. 107-127, 2018.
- BERTOL, G. *et al.* Differentiation of *Mikania glomerata* and *M. laevigata* species through mid-infrared spectroscopy and chemometrics guided by HPLC-DAD analyses. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 4, p. 442-452, 2021.
- BERTOL, G. *et al.* Safety evaluation of *Mikania glomerata* and *M. laevigata* in healthy volunteers: A randomized, open label and multiple dose phase I clinical trial.

J Ethnopharmacol, p. 117-118, 2024.

BERTOLUCCI, S. K. *et al.* Seasonal variation on the contents of coumarin and kaurane-type diterpenes in *M. laevigata* and *M. glomerata* leaves under different shade levels. **Chem Biodivers**, v. 10, n. 2, p. 288-295, 2013.

BERUDE, M. *et al.* MICORRIZAS E SUA IMPORTÂNCIA AGROECOLÓGICA. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 11, n. 22, 2015.

BIAVATTI, M. W. *et al.* Coumarin content and physicochemical profile of *M. laevigata* extracts. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 3-4, p. 197-200, 2004.

DIAZ, G.; HONRUBIA, M. A mycorrhizal survey of plants growing on mine wastes in Southeast Spain. **Arid Land Research and Management**, v. 8, n. 1, p. 59-68, 1994

BIGHETTI, A. *et al.* Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *M. laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, v. 12, n. 1-2, p. 72-77, 2005.

BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. **VA mycorrhiza**, p. 5-33, 2018.

BORDE, M. *et al.* Role of bioinoculant (AM fungi) increasing in growth, flavor content and yield in *Allium sativum* L. under field condition. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 37, n. 2, p. 124-128, 2009.

BORGHI, A. A. *et al.* Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of *Mikania glomerata* and *M. laevigata* Extracts. **Pharmacognosy Research**, v. 15, n. 1, 2023.

BOURGAUD, F. *et al.* Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 2, p. 293-308, 2006.

BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2a. ed), Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasília (2024).

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS. Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais. Disponível em: . Acesso em 18 de outubro de 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde e ANVISA. Instrução normativa nº 2, de 13 de maio de 2014, 2014b. Publica a “lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado

BRUNDRETT, M.; TEDERSOO, L. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. **New Phytologist**, v. 220, n. 4, p. 1108-1115, 2018.

CARRILLO-SAUCEDO, S. M. *et al.* Las micorrizas como una herramienta para la

restauración ecológica. **Acta botánica mexicana**, n. 129, p. 1932, 2022.

CASTRILLO, G. *et al.* Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. **Nature**, v. 543, n. 7646, p. 513-518, 2017.

CECCARELLI, N. *et al.* Mycorrhizal colonization impacts on phenolic content and antioxidant properties of artichoke leaves and flower heads two years after field transplant. **Plant and Soil**, v. 335, p. 311-323, 2010.

CHAHAL, Kavita; GUPTA, Vaishali; VERMA, Naveen Kumar. Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi as a Tool for Sustainable. **Mycorrhizal Fungi: Utilization in Agriculture and Forestry**, p. 19, 2021.

CHAUHAN, S. *et al.* AM fungal diversity in selected medicinal plants of Haryana, India.

Botany Research International, v. 6, n. 2, p. 41-46, 2013.

CHAUHAN, S. *et al.* Boosting Sustainable Agriculture by Arbuscular Mycorrhiza under Stress Condition: Mechanism and Future Prospective, p. 5275449, 2022.

CHEN, M. *et al.* Glomus mosseae inoculation improves the root system architecture, photosynthetic efficiency and flavonoids accumulation of liquorice under nutrient stress. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 931, 2017.

CHEN, J.-T. Phytochemical Omics in Medicinal Plants. **Biomolecules**, v.10, n. 6, p. 936, 2020.

COBB, A. B. *et al.* Assessing the influence of farm fertility amendments, field management, and sorghum genotypes on soil microbial communities and grain quality. **Applied Soil Ecology**, v. 119, p. 367-374, 2017.

COHEN, A. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Food and cosmetics toxicology**, v. 17, n. 3, p. 277-289, 1979.

COPETTA, A. *et al.* Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 485- 494, 2006.

COSCOLIN, R. B. S. *et al.* Associação de fungos micorrízicos no cultivo do amendoim sob deficiência hídrica. **Revista AgroFIB**, v. 1, n. 1, 2019.

COSTA, V. C. D. O. *et al.* Comparison of the Morphology, Anatomy, and Chemical Profile of *Mikania glomerata* and *M. laevigata*. **Planta Medica**, v. 84, n. 3, p. 191-200, 2018.

CZELUSNIAK, K. *et al.* Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *M. laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 14, p. 400-409, 2012.

DE LIMA SANTOS, L. M. *et al.* Fitotoxicidade do óleo essencial de *M. laevigata* sobre o desenvolvimento inicial de duas espécies invasoras. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 8, n. 4, p. 1-de7, 2017.

DELLA PASQUA, C. S. P. *et al.* Pharmacological study of anti-inflammatory activity of aqueous extracts of *Mikania glomerata* (Spreng.) and *M. laevigata* (Sch. Bip. ex Baker). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 231, p. 50-56, 2019.

DIAGNE, N. *et al.* Roles of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Plant Growth and Performance: Importance in Biotic and Abiotic Stressed Regulation. **Diversity**, v. 12, n. 10, p. 370, 2020.

DOMOKOS, E. *et al.* Increase in *Artemisia annua* Plant Biomass Artemisinin Content and Guaiacol Peroxidase Activity Using the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Rhizophagus irregularis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 478, 2018.

DOS SANTOS, S. C. *et al.* LC characterisation of guaco medicinal extracts, *M. laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta medica**, v. 72, n. 08, p. 679-684, 2006.

DOS SANTOS, L. A. M. *et al.* Arbuscular Mycorrhizal Association is Induced by Long-Term Cotton Cropping and Enhances P Uptake and Initial Growth of Cotton Plants by Legacy P Exploration in Soil. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 24, n. 4, p. 6507-6513, 2024.

DUARTE, M. C. T. *et al.* Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

DUTRA, R. C. *et al.* Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

ESTÉVEZ-BRAUN, A.; GONZÁLEZ, A. G. Coumarins. **Nat Prod Rep**, v. 14, n. 5, p. 465- 475, 1997.

FARHAOUI, A. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and their role in plant disease control: A state-of-the-art. **The Microbe**, 8, p. 100438, 2025/09/01/ 2025.

FARHAOUI, A. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and their role in plant disease control: A state-of-the-art. **The Microbe**, 8, p. 100438, 2025/09/01/ 2025.

FARHAOUI, A. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and their role in plant disease control: A state-of-the-art. **The Microbe**, 8, p. 100438, 2025/09/01/ 2025.

FARHAOUI, A. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and their role in plant disease control: A state-of-the-art. **The Microbe**, n. 8, p. 100438, 2025.

FARMACOPEIA EUROPEIA. 5ª ed. v. 2. Strasbourg: Council of Europe, 2004.

FAVRE-GODAL, Q. *et al.* Orchids and their mycorrhizal fungi: an insufficiently explored relationship. **Mycorrhiza**, v.30, n. 1, p. 5-22, 2020.

FAO. 2022. *Global Soil Partnership 2012-2022 – Sustainable soil management in action*. Rome.

FEITOSA, L. G. P. *et al.* Distribution of flavonoids and other phenolics in *Mikania* species (Compositae) of Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 97, p. 104273, 2021.

FERREIRA, F. P.; DE OLIVEIRA, D. C. R. New constituents from *M. laevigata* Shultz Bip. ex Baker. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 52, p. 6856-6859, 2010.

FONSECA, M. C. M. *et al.* Effect of drying temperature on yield and phytochemical quality of essential oil extracted from *M. laevigata*, **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 48960-48972, 2020.

FORERO, L. E. *et al.* Greenhouse-and field-measured plant-soil feedbacks are not correlated. **Frontiers in Environmental Science**, v. 7, p. 184, 2019.

FUNK, V. A. *et al.* Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. **Biol. Skr**, v. 55, p. 343-373, 2005.

GEBRESLASSIE, S. *et al.* Inoculation of Native Arbuscular Mycorrhizae and *Bacillus subtilis* can improve growth in vegetable crops. **International Journal of Microbiology**, n. 1, p. 9226715, 2024.

GERDEMANN, J.; NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving & decanting, 1963.

GRAÇA, C. *et al.* *M. laevigata* syrup does not induce side effects on reproductive system of male Wistar rats. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 1, p. 29-32, 2007.

GRAÇA, C. *et al.* In vivo assessment of safety and mechanisms underlying in vitro relaxation induced by *M. laevigata* Schultz Bip. ex Baker in the rat trachea. **J Ethnopharmacol**, v. 112, n. 3, p. 430-439, 2007.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products from plants. *In*: Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products: **World Scientific**, p. 1-25, 1999.

HARBORT, C. J. *et al.* Root-Secreted Coumarins and the Microbiota Interact to Improve Iron Nutrition in *Arabidopsis*. **Cell Host Microbe**, v. 28, n. 6, p. 825-837, 2020.

HASHEM, A. *et al.* Bioremediation of adverse impact of cadmium toxicity on *Cassia italica* Mill by arbuscular mycorrhizal fungi. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 1, p. 39-47, 2016.

HAZRATI, S. *et al.* Harvest time optimization for medicinal and aromatic plant secondary metabolites. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 212, p. 108735, 2024.

HEINZE, J. *et al.* Plant-soil feedbacks: a comparative study on the relative importance of soil feedbacks in the greenhouse versus the field. **Oecologia**, v. 181, p. 559-569, 2016.

HERRERA-PERAZA, R. A. *et al.* Functional strategies of root hairs and arbuscular mycorrhizae in an evergreen tropical forest, Sierra del Rosario, Cuba. **Revista CENIC. Ciencias Biológicas**, v. 35, n. 2, 2004.

HOSSEINZADEH, S. *et al.* The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 6, p. 635-642, 2015.

HOWES, M.-J. *et al.* Molecules from nature: Reconciling biodiversity conservation and global healthcare imperatives for sustainable use of medicinal plants and fungi. **Plants People Planet**, v. 2, p. 463-481, 2020.

HUEY, C. *et al.* Mycorrhiza: a natural resource assists plant growth under varied soil conditions. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-9, 2020.

HUSSEIN, R. A.; EL-ANSSARY, A. A. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. **Herbal medicine**, v. 1, n. 3, p. 11-30, 2019.

JAIN, P. K; JOSHI, H. Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. v. 6, p. 236-240, 2012.

JENKINS, W. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. 1964.

KAPOOR, R. *et al.* Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. **Mycorrhiza**, v. 17, p. 581-587, 2007.

KAUR, S.; SUSEELA, V. Unraveling arbuscular mycorrhiza-induced changes in plant primary and secondary metabolome. **Metabolites**, v. 10, n. 8, p. 335, 2020.

KOSKE, R.; GEMMA, J. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. 1989.

LAZZARA, S. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi altered the hypericin, pseudohypericin, and hyperforin content in flowers of *Hypericum perforatum* grown under contrasting P availability in a highly organic substrate. **Mycorrhiza**, v. 27, n. 4, p. 345-354, 2017.

LEAL, V. C. *et al.* Dupla inoculação (rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares) mitigam efeitos nocivos da salinidade no crescimento do feijão-caupi. In: **Congresso internacional de microbiologia em língua portuguesa Microbiologia**. 2022

LEITE, P. M. *et al.* In vitro anticoagulant activity of *M. laevigata*: deepening the study of the possible interaction between guaco and anticoagulants. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 574-583, 2019.

LERMEN, C. *et al.* Essential oil of bushy lippia inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of humic substances and phosphorus. **Rhizosphere**, v. 25, p. 100-660, 2023.

LESSA, F. C. *et al.* Efficacy of guaco mouthwashes (*Mikania glomerata* and *M. laevigata*) on the disinfection of toothbrushes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1330-1337, 2012.

LIMA, C. S. *et al.* Mycorrhizal Fungi (AMF) increase the content of biomolecules in leaves of *Inga vera* Willd. seedlings. **Symbiosis**, v. 65, n. 3, p. 117-123, 2015.

LIMA, C. S. *et al.* Mycorrhizal symbiosis increase the level of total foliar phenols and tannins in *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett seedlings. **Industrial Crops and Products**, v. 104, p. 28-32, 2017.

LIMBERGER, R. *et al.* Chemical Composition of Essential Oils from Three Southern Brazilian Species of *Mikania* (Asteraceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 4, p. 363-367, 1998.

LUCARIELLO, G. *et al.* Pharmacological Studies on Traditional Plant-Based Remedies. **Biomedicines**, v.9, n. 3, p. 315, 2021.

MA, K. *et al.* Application of organic fertilizer changes the rhizosphere microbial communities of a gramineous grass on Qinghai–Tibet plateau. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1148, 2022.

MANOHARAN, P. *et al.* Influence of AM fungi on the growth and physiological status of *Erythrina variegata* Linn. grown under different water stress conditions. **European Journal of Soil Biology**, 46, n. 2, p. 151-156, 2010.

MARQUES FONSECA, M. C. *et al.* Biomass production, essential oil's yield and composition of three genotypes of *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 43, n. 5, 2021.

MASSUNARI, L. *et al.* Inhibitory activity of *Varronia curassavica* and *M. laevigata* fractions against pathogens associated with persistent dental infections. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 41, p. 1-10, 2020.

MCGONIGLE, T. P. *et al.* A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular—arbuscular mycorrhizal fungi. **New phytologist**, v. 115, n. 3, p. 495- 501, 1990.

MEDEIROS, D. *et al.* Influence of *M. laevigata* Extract over the Genotoxicity Induced by Alkylating Agents. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, n. 1, p. 521432, 2013.

MELATO, E. *et al.* Inoculation of rue with arbuscular mycorrhizal fungi alters plant growth, essential oil production and composition. **Rhizosphere**, v. 29, p. 100-856, 2024.

MELO, L. V.; SAWAYA, A. C. H. F. UHPLC–MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *M. laevigata*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 105-110, 2015.

MISHRA, V. *et al.* Synergistic effects of Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria in bioremediation of iron contaminated soils. **Int J Phytoremediation**, v. 18, n. 7, p. 697-703, 2016.

MOREIRA, H. *et al.* Synergistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth- promoting bacteria benefit maize growth under increasing soil salinity. **Journal of Environmental Management**, v. 257, p. 109982, 2020.

MORONE-FORTUNATO, I.; AVATO, P. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 93, p. 139-149, 2008.

MRUNALINI, K. *et al.* Nature-based solutions in soil restoration for improving agricultural productivity. **Land Degradation & Development**, v. 33, n. 8, p. 1269-1289, 2022.

MUNKVOLD, L. *et al.* High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 164, n. 2, p. 357-364, 2004.

NAPIMOGA, M. H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for *M. laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, n. 7, p. 809-820, 2010.

NELL, M. *et al.* Effect of phosphorus uptake on growth and secondary metabolites of garden sage (*Salvia officinalis* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 6, p. 1090-1096, 2009.

NELL, M. *et al.* Root colonization by symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi increases sesquiterpenic acid concentrations in *Valeriana officinalis* L. **Planta Medica**, v. 76, n. 04, p. 393-398, 2010.

NIE, W. *et al.* Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Boosting Crop Resilience to Environmental Stresses. **Microorganisms**, v. 12, n. 12, p. 2448, 2024.

OLIVEIRA, F. d. *et al.* Anatomia foliar das espécies brasileiras de *Mikania Willdenow* seção *Globosae* Robinson: visão farmacognóstica. 1992.

OLIVEIRA, F. d. *et al.* Morfologia externa das partes aéreas e anatomia foliar das espécies brasileiras de *Mikania willdenow* seção *Globosae* Robinson: visão farmacognóstica. 1994.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Alma-Ata 1978 - Cuidados primários de saúde**. Relatório da conferência internacional sobre cuidados primários de saúde. Brasília: Organização Mundial da Saúde/Fundo das Nações Unidas para a Infância; 1979.

PANKE-BUISSE, K. *et al.* Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function. **The ISME journal**, v. 9, n. 4, p. 980-989, 2015.

PATWARDHAN, B. *et al.* In Search of Roots: Tracing the History and Philosophy of Indian Medicine. **Indian journal of history of science**, v. 50, p. 629-641, 2015.

PEDRAZA-ALVA, G. *et al.* From traditional remedies to cutting-edge medicine: Using ancient mesoamerican knowledge to address complex disorders relevant to psychoneuroimmunology. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 79, p. 3-5, 2019.

PEDROSO, A. P. D. *et al.* Isolation of syringaldehyde from *M. laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 63-69, 2008.

PEÑUELAS-RUBIO, O. *et al.* Warming reduces the root density and wheat colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in the Yaqui Valley, Mexico. **Agronomía Colombiana**, v. 40, n. 3, p. 440-446, 2022.

PEREIRA, R. *et al.* Produção de guaco no litoral cearense. **Embrapa Agroindústria Tropical**, p. 6, 2015.

PEREIRA, R. J.; ANDRADE, M. A. Metabólitos Secundários Vegetais. **Compostos Bioativos Vegetais**, p. 1-38, 2014.

PHILLIPS, J.; HAYMAN, D. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British mycological Society**, v. 55, n. 1, p. 158-118, 1970.

PINTO, M. V. *et al.* Obtaining a Dry Extract from the *M. laevigata* Leaves with Potential for Antiulcer Activity. **Pharmacogn Mag**, v. 13, n. 49, p. 76-80, 2017.

POTT, D. M. *et al.* From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 835, 2019.

RAHMAN, I. U. *et al.* Historical perspectives of ethnobotany. **Clinics in Dermatology**, v. 37, n. 4, p. 382-388, 2019.

REHDER, V. *et al.* Essential oils composition from leaves, inflorescences and seeds of *M. laevigata* Schultz Bip. ex Baker and *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira De Plantas Medica**, v. 8, p. 116-118, 2006.

REYES SANCHEZ, L. B. *et al.* Sustainable soil management as a key to preserve soil biodiversity and stop its degradation. **International Union of Soil Sciences [IUSS]**, 2022.

RIBEIRO, C. V. C.; KAPLAN, M. A. C. Tendências evolutivas de famílias produtoras de cumarinas em Angiospermae. **Química Nova**, v. 25, p. 533-538, 2002.

RITTER, M.. R *et al.* Mikania in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB5388>. Acesso em: 26 jun. 2024.

ROCHA, F. *et al.* O uso terapêutico da flora na história mundial. **HOLOS**, v. 1, p. 49-61, 2015.

ROJAS-ANDRADE, R. *et al.* Changes in the concentration of trigonelline in a semi-arid leguminous plant (*Prosopis laevigata*) induced by an arbuscular mycorrhizal fungus during the presymbiotic phase. **Mycorrhiza**, v. 13, n. 1, p. 49-52, 2003.

ROMANO, B. *et al.* Topical Collection “Pharmacology of Medicinal Plants”. **Biomolecules**, v.11, n. 1, p. 101, 2021.

RUFATTO, L. C. *et al.* M. laevigata: Chemical characterization and selective cytotoxic activity of extracts on tumor cell lines. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p. 883-889, 2013.

SAMMAK, A. *et al.* Evaluation of Inoculation *Pseudomonas fluorescens* and Arbuscular Mycorrhizal Fungus on Growth, Morphological Characteristics and Essential Oil Percentage of *Thymus kotschyanus*. **Journal of Medicinal plants and By-products**, v. 11, n. 2, p. 181- 189, 2022.

SARMIENTO-LÓPEZ, L. G. *et al.* Arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Stevia rebaudiana* increases trichome development, flavonoid and phenolic compound accumulation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101889, 2021.

SCHITTKO, C. *et al.* No evidence that plant–soil feedback effects of native and invasive plant species under glasshouse conditions are reflected in the field. **Journal of Ecology**, v. 104, n. 5, p. 1243-1249, 2016.

SHARMA, K. *et al.* Exploring the Diversity, Root Colonization, and Morphology of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Lamiaceae. **Journal of Basic Microbiology**, v. 65, n. 1, p. e2400379, 2025.

SHOPO, B. *et al.* Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in Gokwe South District, Zimbabwe. **South African Journal of Botany**, v. 149, p. 29-48, 2022.

SHUKLA, A. *et al.* Soil moisture levels affect mycorrhization during early stages of development of agroforestry plants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 5, p. 545-554, 2013.

SILVA, C. R. d. *et al.* Método espectroscópico para determinação de cumarina em xarope de *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 594-599, 2008.

SOUZA, B. C. *et al.* Inoculation of lemongrass with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobacteria alters plant growth and essential oil production. **Rhizosphere**, v. 22, p. 100514, 2022.

SOUZA, F. A. *et al.* A importância da tecnologia de inoculação de fungos micorrízicos para a sustentabilidade na olericultura. **Sustentabilidade e horticultura no Brasil: da retórica à prática**. p. 223-252, 2017.

SOUZA, V. C. d. *et al.* Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 612-618, 2006.

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, n. 1, p. 227-250, 2011.

STEFANACHI, A. *et al.* Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. v. 23, n. 2, 2018.

STÜRMER, S. L.; KEMMELMEIER, K. The Glomeromycota in the Neotropics. **Front Microbiol**, v. 11, p. 553679, 2020.

STÜRMER, S. L. *et al.* Synonymization of three species of Rhizophagus based on morphological and molecular evidence and biogeography of Rhizophagus clarus. **Mycorrhiza**, v. 35, n. 2, p. 16, 2025.

SUYENAGA, E. *et al.* Antiinflammatory investigation of some species of Mikania. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 16, n. 6, p. 519-523, 2002.

TABER, R. A.; TRAPPE, J. M. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in rhizomes, scale-like leaves, roots, and xylem of ginger. **Mycologia**, v. 74, n. 1, p. 156-161, 1982.

THOKCHOM, S. D. *et al.* An appraisal of arbuscular mycorrhiza-mediated augmentation in production of secondary metabolites in medicinal plants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 37, p. 100515, 2023.

TROUVELOT, A. Measure du taux de mycorrhization d'un systeme racinaire. Recherche de methods d'estimation ayant une signification fonctionnelle. **Physiological and genetical aspects of mycorrhizae**, p. 217-221, 1986.

TRIPATHI, H. *et al.* International trade in medicinal and aromatics plants: A case study of past 18 years. **Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences**, v. 39, p. 1-17, 2017.

TSIOKANOS, E. *et al.* The Metabolic Profile of Anchusa officinalis L. Differs According to Its Associated Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Metabolites**, v. 12, n. 7, p. 573, 2022.

UENO, V. A.; SAWAYA, A. C. H. F. Influence of environmental factors on the volatile composition of two Brazilian medicinal plants: M. laevigata and Mikania glomerata. **Metabolomics**, v. 15, n. 6, 2019.

URCOVICHE, R. C. *et al.* Plant growth and essential oil content of Mentha crispa inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi under different levels of phosphorus. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 103-107, 2015.

VALENZUELA-ARAGON, B. *et al.* The role of arbuscular mycorrhizal fungi in abiotic stress management in viticulture under climatic shifts. **Plant Stress**, n. 16, p. 100863, 2025.

- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography**, 1963.
- VERBRUGGEN, E. *et al.* Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. **New Phytologist**, v. 197, n. 4, p. 1104-1109, 2013.
- VOGEL, A. Darstellung von Benzoesäure aus der Tonka-Bohne und aus den Meliloten - oder Steinklee - Blumen. **Annalen der Physik**, v. 64, n. 2, p. 161-166, 1820.
- VOGL, S. *et al.* Identification and Quantification of Coumarins in *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch by HPLC-DAD and HPLC-DAD-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4371-4377, 2011.
- WEISANY, W. Chapter 16 - Arbuscular mycorrhizal fungi inoculation in the modulation of plant yield and bioactive compounds. *In*: HUSEN, A. (Ed.). **Biostimulants in Plant Protection and Performance**: Elsevier, p. 255-271, 2024.
- WU, S. *et al.* Arbuscular mycorrhiza and plant chromium tolerance. **Soil Ecology Letters**, v. 1, p. 94-104, 2019.
- XIE, W. *et al.* Arbuscular mycorrhiza facilitates the accumulation of glycyrrhizin and liquiritin in *Glycyrrhiza uralensis* under drought stress. **Mycorrhiza**, v. 28, n. 3, p. 285-300, 2018.
- YADAV, R. *et al.* *Bacillus* sp. and arbuscular mycorrhizal fungi consortia enhance wheat nutrient and yield in the second-year field trial: Superior performance in comparison with chemical fertilizers. v. 132, n. 3, p. 2203-2219, 2022.
- YAZBEK, P. B. *et al.* Plants utilized as medicines by residents of Quilombo da Fazenda, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brazil: A participatory survey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, p. 112123, 2019.
- YU, M. *et al.* Arbuscular Mycorrhizal Fungi Can Compensate for the Loss of Indigenous Microbial Communities to Support the Growth of Liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). **Plants**, v. 9, n. 1, p. 7, 2020.
- YUAN, M. L. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi enhance active ingredients of medicinal plants: a quantitative analysis. **Front Plant Sci**, v. 14, p. 1276918, 2023.
- ZAMPROGNO, T. T. *et al.* Activity of *Euterpe edulis* Martius, *Mikania glomerata* Spreng, and *M. laevigata* Schultz Bip. extracts on gastrointestinal nematodes *Toxocara canis* and *Ancylostoma caninum*. 2015.
- ZENG, Y. *et al.* Arbuscular mycorrhizal symbiosis and active ingredients of medicinal plants: current research status and perspectives. **Mycorrhiza**, v. 23, n. 4, p. 253-265, May 2013.

ZHANG, S. *et al.* Computer vision models enable mixed linear modeling to predict arbuscular mycorrhizal fungal colonization using fungal morphology. **Sci Rep**, v. 14, n. 1, p. 10866, 2024.

ZHAO, T. *et al.* Mycorrhizal Fungi Synergistically Promote the Growth and Secondary Metabolism of *Cyclocarya paliurus*. **Forests**, n. 13, n. 12, p. 2188, 2022.

ZHAO, Y. *et al.* Arbuscular mycorrhizal fungi and production of secondary metabolites in medicinal plants. **Mycorrhiza**, v. 32, n. 3, p. 221-256, 2022.

ZOLFAGHARI, M. *et al.* Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on plant growth and essential oil content and composition of *Ocimum basilicum* L. **Iranian Journal of Plant Physiology**, v. 3, n. 2, p. 643-650, 2013.

ANEXOS

ANEXO B – COMPARAÇÃO ESTATÍSTICA DAS CURVAS ANALÍTICAS POR ANÁLISE DE COVARIÂNCIA.

