

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE

CHARLYANA DE CARVALHO BENTO

***Machaerium acutifolium* Vogel: uma análise química e seus efeitos fitotóxicos**

São Paulo

2023

CHARLYANA DE CARVALHO BENTO

***Machaerium acutifolium* Vogel: uma análise química e seus efeitos fitotóxicos**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola de Artes,  
Ciências e Humanidades da Universidade de  
São Paulo para obtenção do título de Mestre em  
Ciências pelo Programa de Pós-graduação em  
Sustentabilidade.

Área de Concentração:  
Ciência e Tecnologia Ambiental

Orientadora:  
Profa. Dra. Miriam Sannomiya

São Paulo  
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Escola de Artes, Ciências e Humanidades,  
com os dados inseridos pelo(a) autor(a)  
Brenda Fontes Malheiros de Castro CRB 8-7012; Sandra Tokarevicz CRB 8-4936

Carvalho Bento, Charlyana de  
Machaerium acutifolium Vogel: uma análise química  
e seus efeitos fitotóxicos / Charlyana de Carvalho  
Bento; orientadora, Miriam Sannomiya. -- São  
Paulo, 2023.  
70 p: il.

Dissertacao (Mestrado em Ciencias) - Programa de  
Pós-Graduação em Sustentabilidade, Escola de Artes,  
Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo,  
2023.

Versão corrigida

1. Machaerium acutifolium. 2. Flavonoides. 3.  
Saponinas. 4. Fitotoxicidade. I. Sannomiya, Miriam,  
orient. II. Título.

Nome: BENTO, Charlyana de Carvalho

Título: *Machaerium acutifolium* Vogel: uma análise química e seus efeitos fitotóxicos

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade.

Área de Concentração:

Ciência e Tecnologia Ambiental

Aprovado em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

### **Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico aos meus pais, Gerardo (in memoriam) e Maria, por compreender minha ausência ao longo desse percurso. Dedico ao meu irmão Charlys pelo apoio e incentivo.*

## Agradecimentos

À Deus, por me conceder a força necessária para seguir, por estar ao meu lado em cada momento.

Agradeço ao meu pai Gerardo (*in memoriam*) pelo cuidado, por me ensinar a ser forte e independente, por apoiar meus estudos. Saudades eterna.

Agradeço a minha mãe Maria, com quem aprendi sobre cuidado e amor ao próximo. Meu exemplo de dedicação à docência. Sou grata pelo apoio quando decidi sair da estabilidade de um emprego de muitos anos e me dedicar 100 % a graduação e depois a pós-graduação.

Ao meu irmão Charlys que sempre vinha com a pergunta: “*Você escreveu muito hoje?*” e queria ouvir sobre a pesquisa e assim me incentivar a continuar buscando novos caminhos, obrigada pelo apoio e amizade.

À minha orientadora profa. Dra. Miriam Sannomiya, por caminhar comigo desde a Iniciação Científica abrindo um mundo de possibilidades, mostrando o quanto a química de produtos naturais é incrível, me encontrei no laboratório. Agradeço a amizade, as conversas, os conselhos, por acreditar em mim e por ser exemplo.

Ao grupo do Laboratório e da pós, Ana Rocha, Camila, Jeferson, Letícia, pelas discussões enriquecedoras, aprendi muito com cada um de vocês. Aos meus queridos ICs, Matteo e Tati agradeço pela troca e torço muito pelo sucesso de vocês.

À Daniéle, obrigada por cada risada, cafés depois de dias intensos e conversas compartilhadas. Agradeço por dividir tanto, sempre com a palavra certa.

À Luciana, irmã amiga, agradeço por não deixar eu desistir de voltar para a pesquisa. Você é um exemplo, nos dias difíceis sempre deixa as coisas mais leves e divertidas. Obrigada por todo suporte durante as minhas dúvidas das mais simples até as burocráticas.

Aos amigos de vida, sem vocês essa jornada não teria graça. À Jesiane e Silvana, por compartilharem dos meus sonhos e vibrarem com cada conquista, pela escuta, acolhimento e celebração. Ao Bruno, por sempre me desafiar a mais, por compartilhar o aprendizado e as conquistas, do técnico para a pós e além. À Nathali, pelo apoio quando escolhi a pós, por entender minhas ausências e por me mostrar a importância de celebrar. À Isabella Vallin, que me dizia o quanto a pós era algo que eu ia gostar, já que sabia do meu amor pela pesquisa, é você está certa.

Ao Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira (IB-USP) por disponibilizar o seu laboratório e realizar as análises por HPLC-DAD-UV. À Dra. Priscila Torres, pela colaboração nos ensaios de fitotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas (UNESP-IB-CLP), pela colaboração e dispor o seu laboratório. Ao Dr. Renan Canute Kamikawashi, pelos experimentos de UHPLC-ESI-IT-MS/MS e junto com Me. Virginia Carrara realizaram o teste de toxicidade aguda em *Danio rerio*.

À profa. Dra. Renata Colombo pelos testes de LC-MS.

Ao Rodrigo Lucena técnico do Lacite, pelo auxílio no laboratório.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP pela oportunidade.

*“Sozinhos, pouco podemos fazer; juntos podemos fazer muito.”*

**Helen Keller**



## RESUMO

BENTO, Charlyana de Carvalho. *Machaerium acutifolium* Vogel: uma análise química e seus efeitos fitotóxicos. 2023. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023. Versão corrigida.

O uso intenso de agrotóxicos para aumentar a produtividade agrícola em todo o mundo enfrenta diversos problemas que incluem a saúde humana, além de grandes impactos ambientais e sociais. Para minimizar os efeitos nocivos, principalmente ambientais, uma estratégia interessante como recurso alternativo para auxiliar ou substituir o uso de agrotóxicos seria o estudo de metabólitos secundários de plantas como as pertencentes ao gênero *Machaerium*. Os estudos químicos descritos na literatura e biológicos indicam o potencial dos extratos deste gênero como fonte de controle natural de pragas, incluindo metabólitos com ação fitotóxica. Este trabalho tem como objetivo estudar quimicamente e analisar o potencial fitotóxico de extratos hidroetanólicos das folhas e galhos de *Machaerium acutifolium*. Os resultados obtidos em experimentos de Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance/Ionização por *Electrospray* Tandem Espectrometria de Massa permitem identificar putativamente vinte e sete metabólitos secundários nas folhas e dezenove nos extratos de galhos de *M. acutifolium*. Os extratos foram submetidos aos ensaios de fitotoxicidade contra sementes de *Bidens pilosa* e *Urochloa decumbens*. Ambos os extratos mostraram um efeito de inibição semelhante na concentração de 0,8 mg. mL<sup>-1</sup> no comprimento da raiz de *B. pilosa*. O extrato de folhas apresentou a mesma inibição para comprimento de hipocótilo e comprimento de raiz nas concentrações de 0,4 e 0,8 mg. mL<sup>-1</sup> para *U. decumbens*. Essa ação observada possivelmente está associada ao efeito dos flavonoides e saponinas no extrato das folhas. Para o ensaio com *Danio rario* os extratos não apresentaram toxicidade ou alteração no comportamento. Os resultados obtidos indicam o potencial do extrato das folhas no desenvolvimento de um herbicida natural.

Palavras-chave: *Machaerium acutifolium*. Flavonoides. Saponinas. Fitotoxicidade.

## ABSTRACT

BENTO, Charlyana de Carvalho. ***Machaerium acutifolium* Vogel: a chemical analysis and phytotoxic effects**. 2023. 70 p. Dissertation (Master of Science) – School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2023. Corrected version.

The intense use of pesticides to increase agricultural productivity around the world faces several problems that include human health, in addition to major environmental and social impacts. To minimize negative effects, mainly environmental, an interesting strategy as an alternative resource to help or replace the use of pesticides would be the study of secondary metabolites of plants belonging to the genus *Machaerium*. Chemical and biological studies described in the literature indicate the potential of extracts from this genus as a source of natural pest control, including metabolites with phytotoxicity action. This work aims to chemically study and evaluate the phytotoxic potential of hydroethanolic extracts from leaves and branches of *Machaerium acutifolium*. The results obtained in experiments of Ultra High Performance Liquid Chromatography/Ionization by Electrospray Tandem Mass Spectrometry allow for the putative identification of twenty-seven secondary metabolites in the leaves and nineteen in the extracts of branches of *M. acutifolium*. The extracts were protected against phytotoxicity assays against *Bidens pilosa* and *Urochloa decumbens* seeds. Both extracts had a similar effect at a concentration of 0.8 mg mL<sup>-1</sup> on root length of *B. pilosa*. The leaf extract showed the same continuity for hypocotyl length and root length at concentrations of 0.4 and 0.8 mg mL<sup>-1</sup> for *U. decumbens*. This action is possibly associated with the effect of flavonoids and saponins in the leaves extract. For the test with *Danio rario*, the extracts did not show toxicity or change in behavior. The results obtained indicate the potential of the leaf extract in the development of a natural herbicide.

Keywords: *Machaerium acutifolium*. Flavonoids. Saponins. Phytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – *Machaerium acutifolium* Vogel. (A) Aspecto geral dos ramos, (B) Inflorescência paniculada, com estandarte enegrecido, na face externa e esbranquiçada, na face interna, (C) Sâmara imatura, com mancha próximo a base..... 20
- Figura 2 – Distribuição geográfica de *Machaerium acutifolium* no Brasil..... 21
- Figura 3 – A: Perfil cromatográfico da análise por HPLC-DAD-UV em 352 nm do extrato hidroetanólico dos galhos (Macg) de *M. acutifolium* e B: Perfil cromatográfico da análise por HPLC-DAD-UV do extrato hidroetanólico das folhas (Macf) de *Machaerium acutifolium* em 352 nm ..... 33
- Figura 4 – Cromatograma de pico base (BPC) do extrato de folhas de *M. acutifolium* obtido por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massa tandem de ionização por *eletrospray* (UHPLC-IT-ESI-MS/MS). Os picos de destaque representam algumas substâncias listados na Tabela 4..... 36
- Figura 5 – Cromatograma de pico base (BPC) do extrato de galhos de *M. acutifolium* obtido por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas tandem de ionização por *electrospray* (UHPLC-IT-ESI-MS/MS). Os picos de destaque representam algumas substâncias listados na Tabela 5..... 41
- Figura 6 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  191 em modo negativo (35 eV), identificado como ácido quínico. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental ..... 46
- Figura 7 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  623 em modo negativo (35 eV) - identificado como isorhamnetina-3-*O*-rutinosideo. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental ..... 47
- Figura 8 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  285 em modo negativo (35 eV) - identificado como prunetina. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental..... 48
- Figura 9 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  593 em modo negativo (35 eV) - identificado como apigenin-*C*-hexose-*C*-hexose. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental ..... 49

Figura 10 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de $m/z$ 811 em modo negativo (35 eV) - identificado como Soyasapogenol A-AHex-Hex. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental .....	50
Figura 11 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de $m/z$ 941 em modo negativo (35 eV) - identificado como Soyasapogenol B- AHex-Hex-dHex. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental .....	51
Figura 12 – Espectro de massas de primeira-ordem do íon precursor de $m/z$ 955 em modo negativo (35 eV) - identificado como Hederagenina- AHex-Hex-dHex. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental .....	52
Figura 13 – Efeitos inibitórios (%) dos extratos de folhas (Macf) e galhos (Macg) na taxa de germinação, comprimento do hipocótilo (ou parte aérea) e comprimento da raiz em <i>Biden pilosa</i> (A) ou <i>Urochloa decumbens</i> (B). O controle negativo é representado por zero, enquanto valores negativos indicam inibição do crescimento. Um asterisco indica uma diferença significativa quando comparado com o controle negativo ( $p < 0,05$ ). Os valores foram expressos como uma diferença em porcentagens do controle .....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classes de agroquímicos, ingredientes ativos (IA), mais vendidos no Brasil em 2021 .....	15
Tabela 2 – Resultados obtidos a partir do doseamento de fenóis totais e flavonoides totais nos extratos de folhas (Macf) e galhos (Macg) de <i>Machaerium acutifolium</i> .....	34
Tabela 3 – Quantificação de flavonoides (quercetina) presentes nos extratos de folhas (Macf) e galhos (Macg) de <i>M. acutifolium</i> .....	35
Tabela 4 – Substâncias identificadas pela análise UHPLC-IT-ESI-MS/MS do extrato hidroetanólico das folhas de <i>M. acutifolium</i> .....	37
Tabela 5 – Substâncias identificadas pela análise UHPLC-IT-ESI-MS/MS do extrato hidroetanólico de galhos de <i>M. acutifolium</i> .....	42
Tabela 6 – Taxa de mortalidade (%) do peixe-zebra a partir de diferentes concentrações dos extratos de folhas (Macf) e galhos (Macg) no período de 96 horas .....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AHex	Ácido Glicurônico
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
dHex	Deoxihexose
EtOH	Etanol
Hex	Hexose
HPLC-DAD-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Arranjo de Fotodiodo de varredura do espectro Ultravioleta
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
Macf	Folhas de <i>Machaerium acutifolium</i>
Macg	Galhos de <i>Machaerium acutifolium</i>
MeOH	Metanol
<i>m/z</i>	Relação Massa/carga
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
Pent	Pentose
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
UPLC-ESI-IT-MS <sup>n</sup>	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência com Espectrometria de Massa de Armadilha de Íons
v/v	volume/volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1	GÊNERO <i>Machaerium</i> .....	19
1.2	ESPÉCIE <i>Machaerium acutifolium</i> Vogel.....	20
1.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	22
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1	ETAPA BOTÂNICA.....	25
3.2	ETAPA QUÍMICA.....	25
3.2.1	Extração.....	25
3.2.2	Triagem Cromatográfica: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	26
3.2.3	Doseamento dos fenóis totais dos extratos de folhas e galhos de <i>M. acutifolium</i> .....	26
3.2.4	Doseamento dos flavonoides totais dos extratos de folhas e galhos de <i>M. acutifolium</i> .....	27
3.2.5	Análises dos extratos por HPLC-DAD-UV .....	27
3.2.6	Análise dos extratos de <i>M. acutifolium</i> por UHPLC-ESI-IT-MS/MS.....	28
3.2.7	Quantificação de flavonoides.....	29
3.3	ETAPA BIOLÓGICA.....	29
3.3.1	Ensaio Fitotóxico.....	29
3.3.2	Teste de toxicidade aguda.....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
4.1	TRIAGEM CROMATOGRÁFICA E ANÁLISE POR HPLC-DAD-UV.....	32
4.2	DOSEAMENTO DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS.....	34
4.3	ANÁLISE DOS EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS POR UHPLC-ESI-IT-MS/MS.....	35
4.3.1	Identificação putativa do perfil químico dos extratos hidroetanólico das folhas de <i>M. acutifolium</i> .....	35
4.3.2	Identificação putativa do perfil químico dos extratos hidroetanólico dos	40

	galhos de <i>M. acutifolium</i> .....	
4.3.3	Caracterização das substâncias por UHPLC-ESI-MS/MS.....	45
4.4	ENSAIO FITOTÓXICO.....	53
4.5	TESTE DE TOXICIDADE AGUDA EM PEIXE-ZEBRA .....	55
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da produção de alimentos em função do crescimento demográfico e da expectativa de vida é uma questão importante e complexa que a agricultura enfrenta atualmente. O uso intenso de agroquímicos, como pesticidas, herbicidas e fungicidas, tem sido uma das estratégias adotadas para o controle de pragas e doenças que afetam as lavouras e, assim, garantir maior produtividade (Demartelaere et al., 2021; Rodrigues et al., 2022). Esses produtos químicos ajudam a proteger de ataques de insetos, fungos, roedores, plantas daninhas e outros organismos que podem causar danos às plantações e comprometer a segurança alimentar (Lopes; Albuquerque, 2018; Moraes, 2019). No entanto, o emprego exacerbado desses agroquímicos pode promover um conjunto de efeitos negativos para a saúde humana e bem como seus impactos ambientais e sociais (Silva, 2013).

Órgãos ambientais, como o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), são responsáveis por monitorar e regulamentar a produção, importação, exportação e venda de produtos agroquímicos no Brasil. Em 2021, o Ibama divulgou relatório que envolveu 194 empresas registradas no país, as quais forneceram informações sobre a quantidade de agroquímicos produzidos, importados, exportados e vendidos (Ibama, 2022). O envio desses relatórios por parte das empresas é uma forma de acompanhar a quantidade e a movimentação desses produtos no mercado. Na tabela 1 apresentada a seguir, verifica-se a quantidade em toneladas dos 3 Ingredientes Ativos (IA) mais vendidos por classes de uso dos produtos formulados, conforme o boletim mais recente divulgado pelo Ibama.

**Tabela 1 - Classes de agroquímicos, ingredientes ativos (IA), mais vendidos no Brasil em 2021**

<b>Classes Uso</b>	<b>Organismo alvo</b>	<b>Quantidade (ton. IA)</b>	<b>Percentual (%)</b>
Herbicida	Plantas daninhas	407.462,73	57 %
Fungicida	Fungos	128.756,61	18 %
Inseticida	Insetos	92.625,19	13 %
Outros	Roedores, formigas, cupim, ácaros, moluscos etc.	90.662,92	12 %

Fonte: Adaptado do IBAMA, 2022.

De acordo com a tabela 1, os herbicidas foram os mais vendidos em 2021, o que corresponde a mais de 400 toneladas e eles são utilizados no combate de plantas daninhas. O Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit) tem registrado 101 ingredientes ativos presentes nos herbicidas, sendo os mais vendidos: glifosato, 2,4-D; mancozebe, atrazina, acefato e Paraquat (Silva, 2021, Ibama, 2022; Agrofit, 2022).

As plantas daninhas causam impactos negativos na produção agrícola. Os principais efeitos adversos são competição direta por espaço, água, luz e nutrientes. Algumas delas podem servir como hospedeiras para pragas e doenças das plantações, além de afetarem negativamente a qualidade dos produtos agrícolas, impactando assim a produtividade com perdas econômicas significativas (Salomão; Ferro; Ruas, 2020). Portanto, o manejo adequado faz-se necessário para minimizar os impactos negativos, como é o caso da adoção de rotação de culturas, monitoramento das áreas cultivadas, um investimento em herbicidas, equipamentos e mão de obra adequados (Farooq et al., 2020).

Sob a perspectiva ambiental, o uso intenso de agroquímicos pode provocar a contaminação dos lençóis freáticos, bacias hidrográficas, do solo, levando a extinção de micro-organismos essenciais para a ciclagem dos nutrientes no solo. Além disso, essa prática pode favorecer a seleção de organismos resistentes aos defensivos agrícolas utilizados, afetando a flora e a fauna, o que pode de certa forma promover a redução de organismos vivos (Bohner; Araújo; Nishijima, 2013). O uso de glifosato pode causar contaminação dos lençóis freáticos, redução da biodiversidade, afetar a reprodução animal, intoxicação entre outros. Apesar da variedade de produtos agroquímicos no mercado e seu uso intenso, algumas plantas daninhas acabam se tornando resistentes (Bettiol; Morandi, 2009; Salomão; Ferro; Ruas, 2020).

Os impactos desses agroquímicos relacionados à saúde humana são alguns sintomas como náusea, dores de cabeça e irritações cutâneas, e em casos de intoxicação grave, podem causar efeitos como o diabetes, alguns tipos de câncer e até mesmo más formações congênitas, dependendo do tempo de exposição, quantidade do produto absorvido e toxicidade (Who, 2019). Os trabalhadores agrícolas e população do entorno das regiões de grande aplicação destes produtos, acabam sendo os mais vulneráveis aos efeitos nocivos e irreversíveis dessas substâncias.

A partir da necessidade de adequar o desenvolvimento socioeconômico com a preservação ambiental de forma sustentável, diversas autoridades buscam estabelecer regras

para que as substâncias comprovadamente tóxicas sejam utilizadas dentro de limites mínimos, mas ainda não existe um padrão internacional. Esses valores modificam de acordo com o país, e em alguns casos, determinados agroquímicos são banidos ou de uso restrito (Matthews et al., 2011), como é o caso de acefato e atrazina, amplamente empregados em nosso país e são proibidos na União Europeia (de Souza, 2021).

A elaboração de novos herbicidas naturais a partir de extratos de plantas podem contribuir para atender uma série de metas globais definidas pela Organização das Nações Unidas (ONU), contemplando alguns Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), que entre outras ações, buscam iniciativas para a erradicação da pobreza e a carência alimentar, promover a agricultura sustentável, agir contra as mudanças climáticas e a perda da biodiversidade, além de enfrentar outros grandes desafios (Menezes, 2019; UN, 2022).

A partir desse cenário, os ODS 2, 3, 12 e 15, que serão abordados a seguir, podem ser relacionados ao desenvolvimento de pesquisas que possam mitigar ou extinguir o uso de alguns agroquímicos e um controle rigoroso destas substâncias químicas, através da promoção de herbicidas a partir de bioativos (Bettiol; Morandi, 2009; UN, 2022).

Com a criação de novos herbicidas proveniente de extratos de plantas, é possível assegurar uma maior disponibilidade de alimentos com menor teor de resíduos de agroquímicos convencionais, fomentar a prática da agricultura ecologicamente equilibrada, conforme a ODS 2 – “...aumentar a produtividade agrícola, ...garantir sistema sustentável de produção de alimentos”. O uso de herbicida natural pode auxiliar no controle do crescimento de plantas daninhas. A segurança alimentar melhora através do controle de plantas invasoras, já que elimina a presença de resíduos químicos oriundos de herbicidas sintéticos, contribuindo com uma prática da agricultura sustentável (Lima, 2019; UN, 2022). Além disso, os herbicidas naturais podem ser uma alternativa mais segura contribuindo com a saúde e o bem-estar de todos, incluindo os trabalhadores agrícolas e comunidades do entorno reduzindo a exposição a produtos químicos nocivos à saúde humana, atendendo assim o previsto na ODS 3 (Menezes et al., 2019; UN, 2022).

Esses novos herbicidas naturais podem contribuir ainda com ODS 12 – “Consumo e produção responsáveis”, os quais visam reduzir o uso intensivo de produtos químicos, focando no estudo de modos alternativos de se minimizar através de estratégias de cultivo. Herbicidas naturais são degradados mais facilmente no ambiente e reduzem a permanência de resíduos químicos no solo e na água. Além de promover um comércio justo com condições de trabalho

e remuneração adequadas (Moreira, 2019; Menezes et al., 2019; UN, 2022). Assim como o estudo das plantas dos diversos biomas brasileiros, que abriga uma vasta riqueza, é de grande relevância para preservação de nossa flora, tanto da perspectiva química quanto biológica, conforme descrito na ODS 15 “*buscando proteger, recuperar...e deter a perda da biodiversidade*” (Menezes et al., 2019; UN, 2022). Neste contexto, uma das alternativas que alguns grupos de pesquisas têm se dedicado ao longo dos anos, é no desenvolvimento de um herbicida de origem natural para controlar o avanço de plantas daninha, com potencial biodegradável, menos tóxico ao homem e ao meio ambiente e ainda que agregue valor econômico a um produto que envolva a flora nacional (Tahira et al., 2021a).

Os herbicidas naturais podem ser uma opção menos nociva no controle de plantas invasoras, já que se trata de compostos que podem ser originárias de plantas, fungos e bactérias (Knogge, 1996; Dias, 2011). Atualmente tem-se disponíveis no mercado poucos herbicidas naturais, como por exemplo o Tricovab<sup>®</sup> que é desenvolvido a base de *Trichoderma stromaticum* e empregada no controle de “Vassoura de Bruxa” (*Moniliophthora perniciosa*). O Quinclorac por sua vez, é produzido a partir do ácido quinolínico, extraído de *Nicotiana tabacum* L., utilizado na inibição do crescimento de plantas daninhas em campos de arroz (Costa, 2009; Qiong et al., 2019).

O desenvolvimento de um novo produto se inicia com a avaliação da atividade fitotóxica frente a diferentes alvos como por exemplo, *Bidens pilosa* L. (picão preto), *Euphorbia heterophylla* L. (leiteiro) e *Urochloa decumbens* (Stapf) R. D. Webster (braquiária). De acordo com a literatura, diversos extratos de plantas possuem propriedades alelopáticas, como os extratos de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, *Cabralea canjerana* (Vell.) Mart. e *Machaerium eriocarpum* Benth. com efeitos alelopáticos, alterando a taxa de germinação inibindo o crescimento foliar de *Bidens pilosa* (Krenchinski et al., 2017; Costa et al., 2018; Pierobon, 2017; Bento et al., 2018).

## 1.1 GÊNERO *Machaerium*

*Machaerium* Persoon é um dos maiores gêneros de árvores tropicais pertencentes à família Fabaceae, da subfamília Papilionoideade. Este gênero engloba cerca de 130 espécies, com uma ampla distribuição principalmente na região neotropical, estendendo-se do sul do México até norte da Argentina, com apenas duas espécies no Caribe e costa oeste da África. É conhecida popularmente como “Jacarandá” (Polido; Sartori, 2011). O Brasil é reconhecido como a região central da diversidade para *Machaerium*, com aproximadamente 75 espécies que se distribuem por diferentes regiões do país. Desse total, 44 espécies são endêmicas (Filardi; Cardoso; Lima, 2022).

De acordo com a literatura, espécies como *Machaerium stipitatum*, *M. eriocarpum*, *M. multiflorum*, *M. amplum*, *M. hirtum* e *M. acutifolium* destacam-se pelas suas propriedades medicinais, com uso etnofarmacológico, no tratamento de feridas, infecções na boca, dor de estômago, úlceras, tosse, diarreia e cólicas menstruais (Díaz et al., 2011; Amen et al., 2015; Ribeiro et al., 2016; Bento et al., 2018; Sannomiya et al., 2020; Muhammad et al., 2020; Santos et al., 2021). Além disso, apresentam uma importância econômica e ecológica, pois são utilizadas na recomposição de áreas degradadas e o caule empregado na marcenaria, peças artesanais, fabricação de rolhas, entre outros (Bastos, 1987; Pott; Pott, 1994; Melo et al., 2021).

Os estudos químicos dos extratos de espécies de *Machaerium* identificam diversas classes de produtos naturais, dentre elas benzoquinonas, arilcoumarinas, cinamilfenóis, quinonas, estirenos, triterpenos, esteroides, saponinas e principalmente a ocorrência de flavonoides. Dentre os flavonóides encontram-se as isoflavonas, pterocarpanos, neoflavonas, flavanonas, chalconas e flavonas (Tangerina, 2012; Patrón-González; Rios, 2021; Tahira, 2022; Bento et al., 2022). Estas classes de substâncias são reconhecidas por inúmeras atividades biológicas, incluindo propriedades antibacteriana, antiparasitária, antifúngica, anti-inflamatória e antioxidante (Seo et al., 2001; Díaz et al., 2011; Bento et al., 2018; Lopes et al., 2020; Muhammad et al., 2020; Tahira, 2021b).

Segundo o levantamento realizado por Tahira (2021b), apenas 11 % das espécies pertencentes ao gênero *Machaerium* foram estudadas do ponto de vista químico e/ou biológico. Em complementação a este levantamento em bases de dados (Periódicos da Capes, Pubchem, SciFinder e Google scholar), observou-se pesquisas adicionais envolvendo outras espécies do gênero, como é o caso do extrato hidroetanólico das folhas de *M. eriocarpum*. Este extrato e

um flavonóide dele isolado, a isovitexina, apresentam atividade alelopática em raízes de pepino e sorgo nas concentrações de 500 e 1000 mg. L<sup>-1</sup>. Além disso, foi relatada sua ação antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* e *Candida albicans* com uma CIM de 62,5 e 250 µg. mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Bento et al., 2018; Sannomiya et al., 2020). O estudo do extrato hidroetanólico de *M. hirtum* demonstra uma ação anti-inflamatória *in vivo* nas doses 125 e 250 mg. kg<sup>-1</sup>, bem como efeito antinociceptivo na concentração de 62,5 mg. kg<sup>-1</sup> (Lopes et al., 2020). O extrato bruto e frações das folhas *M. opacum* apresenta um efeito inseticida sobre as formigas *Atta sexdens* Linnaeus, que pode estar associado aos terpenos e flavonóides presentes nesta espécie (Santos et al., 2021). Estes dados indicam o potencial dos extratos de espécies pertencentes ao gênero *Machaerium* para as diversas atividades biológicas.

## 1.2 ESPÉCIE *Machaerium acutifolium* Vogel

*Machaerium acutifolium* é popularmente conhecida como “jacarandá do campo”, “jacarandá bico de pato”, “jacarandá caroba” e “canzileiro do cerrado”. Caracterizada pelo hábito estritamente arbóreo e inerme; de 4-8 metros de altura; lenticelas esbranquiçadas no caule e ramos; caule com sulcos longitudinais e cicatrizes horizontais, amarronzados e com folhas alternadas (Sartori; Tozzi, 1998) (Figura 1). A floração ocorre durante os meses de junho a dezembro e com frutificação simultânea de junho a setembro (Polido; Sartori, 2007).

Figura 1 - *Machaerium acutifolium* (A) Aspecto geral dos ramos, (B) Inflorescência paniculada, com estandarte enegrecido, na face externa e esbranquiçada, na face interna, (C) Sâmara imatura, com mancha próximo a base

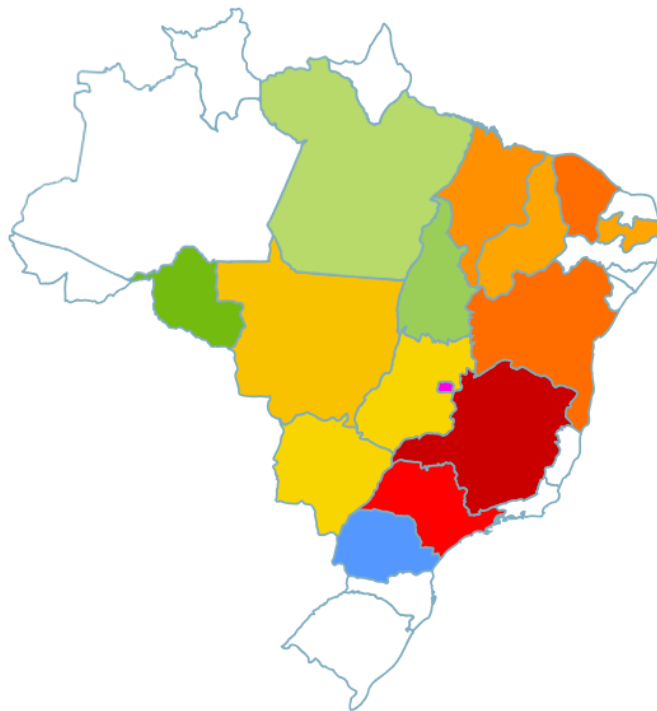


Fonte: Santana; Zappi; Kew, 2020.

Possui sinonímia com *Machaerium muticum* (Benth.), *Machaerium atratum* (Mohlenbr.) Yakovlev e *Sweetia atrata* Mohlenbr (Filardi; Cardoso; Lima, 2022; WFO, 2022). Pode ser confundida com *M. brasiliense* e *M. villosum* devido a semelhança na forma e dimensão dos folíolos. *M. brasiliense* são vilosos e seus folíolos são glabros, enquanto em *M. villosum* eles são cobertos por uma fina camada de velutinos em ambas as faces (Polido; Sartori, 2011).

Essa espécie está distribuída em várias regiões do Brasil, incluindo o Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, ocorrendo preferencialmente nas regiões da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Filardi; Cardoso; Lima, 2022) (Figura 2).

Figura 2 - Distribuição geográfica de *Machaerium acutifolium* no Brasil



Fonte: Filardi; Cardoso; Lima, 2022.

Empregada em projetos de paisagismo e na restauração de áreas degradadas (Universidade Federal Do Mato Grosso, 2020). Além disso, seu uso etnofarmacológico é como diuréticos, sudoríferos, anticoncepcionais, no tratamento de síndrome de dor menstrual e dor de estômago (Barbosa; Pinto, 2003).

Do ponto de vista químico, a literatura relata estudos envolvendo o extrato benzênico do cerne da madeira de *M. acutifolium*, do qual foram isolados cinamilfenol, etilbeno, pterocarpano e isoflavanos (Ollis et al., 1978; Ollis et al., 1968). Segundo Carvalho e colaboradores (2019), o estudo químico do extrato etanólico das folhas desta mesma espécie por Espectrometria de Massas acoplada a um *ion trap* com interface de Ionização por *Electrospray* e inserção direta da amostra (FIA-ESI-IT-MS) permitiu a detecção de flavonóis e isoflavonoides. Em estudo posterior, Melo e colaboradores (2021) descreveram a atividade larvicida do extrato acetato de etila do tronco de *M. acutifolium* em relação ao *Aedes aegypti* com um valor de  $LC_{50}$  de 205 mg. L<sup>-1</sup>. A lectina purificada a partir da semente de *M. acutifolium* apresenta atividade antifúngica contra *Candida parapsilosis* com  $IC_{50}$  de 9 µM (Dias et al., 2020). O extrato aquoso das folhas de *M. acutifolium* foram avaliados quanto à atividade alelopática na germinação de sementes de *Lactuca sativa* (alface), a partir da concentração de 20 % houve uma redução significativa na taxa de germinação e a inibição completa com o extrato 100 % (Povh et al., 2007).

### 1.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Uma das principais finalidades do estudo de metabólitos secundários como fontes de herbicida natural, é reduzir as contaminações de áreas e organismos não-alvos por herbicidas sintéticos, além de seus benefícios ambientais. Existem relatos de que algumas espécies de *Machaerium* têm efeitos alelopáticos devido à presença de cumarinas, flavonoides, esteroides, glicosídeos e triterpenos, as quais apresentam ações fitotóxicas (Povh et al., 2007; Bento et al., 2018; Tahira, 2021b). A busca por atingir as metas definidas nos ODS vem estimulando a descoberta de novas tecnologias para o controle de ervas daninhas e outras pragas agrícolas com base em produtos naturais a partir de plantas. A atividade alelopática tem sido sugerida como uma das alternativas para diminuir o uso excessivo de herbicidas. A verificação dos efeitos alelopáticos tem sido feita por meio da aplicação de extratos vegetais, como nos ensaios fitotóxicos (Pires; Oliveira, 2011; Souza et al., 2019; Santos et al., 2022). Este ensaio consiste em monitorar a germinação de sementes e o crescimento inicial de espécies daninhas como *Bidens pilosa* (picão preto) e a *Urochloa decumbens* (braquiária), sob a presença de extratos de plantas (Silva et al., 2011; Costa et al., 2018; Bonfim et al., 2018).



A contaminação de ecossistemas aquáticos por agroquímicos tem aumentado progressivamente em todo mundo, podendo acarretar efeitos adversos em organismos não alvo, como os peixes (El-Nahhal, 2018; Wang et al., 2023). Entretanto, pouco se sabe sobre os riscos toxicológicos e efeitos letais de extratos de plantas em organismos não-alvo. Ainda assim, há uma necessidade de avaliar adequadamente os extratos de plantas contra alguns organismos modelo, como o caso do *Danio rerio*, também conhecido como peixe-zebra ou paulistinha (Zhao et al., 2019; Vasconcelos et al., 2020; de Carvalho et al., 2020; Brito et al., 2022).

O *Danio rerio* é frequentemente empregado em avaliações de qualidade da água devido ao seu pequeno porte, sensibilidade a estímulos ambientais como poluentes e embriões transparentes (Martínez et al., 2020; Abe et al., 2021). Portanto, a aplicação do peixe-zebra como modelo de organismo permite a investigação dos efeitos tóxicos dos extratos de plantas em organismos não-alvo. Os experimentos envolvendo esse organismo, tornam possível uma avaliação mais abrangente dos efeitos adversos associados ao uso de extratos como potencial herbicida, fornecendo informações valiosas para a proteção de organismos ecológicos e a manutenção do equilíbrio ecológico (Modarresi Chahardehi et al., 2020; Wang et al., 2023). Assim, o desenvolvimento de herbicidas naturais a partir de extratos vegetais, devem estar associados a ensaios que sinalizem sua ação e seguridade, como é o caso de fitotoxicidade e ecotoxicidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Realizar o estudo químico e biológico dos extratos hidroetanólicos das folhas e galhos de *Machaerium acutifolium*, a fim de identificar os metabólitos secundários e avaliar o potencial herbicida dessa espécie.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil químico dos extratos hidroetanólicos das folhas e galhos de *M. acutifolium* através das técnicas de cromatografia de alta performance acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD-UV) e a Cromatografia Líquida de Ultra Alta Performance/Ionização por *Electrospray* Tandem Espectrometria de Massa (UHPLC-ESI-MS/MS);
- Avaliar a atividade fitotóxica dos extratos frente a sementes de *Bidens pilosa* e *Urochloa decumbens*;
- Investigar a toxicidade dos extratos frente a espécie de *Danio rerio*.

## 3 MÉTODOS

### 3.1 ETAPA BOTÂNICA

A coleta dos galhos e folhas de *Machaerium acutifolium* Vogel foi realizada pela taxonomista Profa. Dra. Ângela Lúcia Bagnatori Sartori nas proximidades do Instituto de Química da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). O espécimen encontra-se localizado nas seguintes coordenadas geográficas 20°30'18.0"S 54°37'02.0"W, região Pioneiros, na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul – Brasil. A exsicata se encontra depositada no Herbário CGMS/UFMS com a identificação CGMS 78108 e o material vegetal encontra-se registrado junto ao SisGen sob o protocolo AAC0301.

### 3.2 ETAPA QUÍMICA

#### 3.2.1 Extração

O material vegetal foi seco em estufa de ventilação a 40 °C durante o período de 15 dias. Em seguida, galhos e folhas foram separados, cortados em pedaços menores e pulverizados separadamente em moinho de facas, a um tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm.

O pó de cada órgão vegetal separadamente foi submetido ao processo de extração por percolação exaustiva empregando-se etanol 70 % (Prista, 1995; Migliato et al., 2011). O processo teve início com o intumescimento prévio de aproximadamente 510 g do pó das folhas e 300 g do pó dos galhos – cada um deles com 1,0 L de etanol 70 % (v/v), em seguida o percolador foi empacotado com a mistura (pó + etanol 70 %). A coleta da solução extrativa foi iniciada após 48 h. O processo foi feito da forma mais homogênea possível, respeitando a proporção 4:1 (cada 4 referentes ao percolador e 1 do pó vegetal) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador foi ajustada para aproximadamente 30 gotas/min de material vegetal. Após extração, a solução extrativa foi rotaevaporado sob pressão reduzida em temperatura de 40 °C, o extrato foi armazenado em frasco âmbar, previamente pesado e identificado. Após a evaporação total do solvente, foram obtidos 106,0 g de extrato das folhas de *M. acutifolium* (**Macf**) e 48,0 g de extrato dos galhos de *M. acutifolium* (**Macg**) o que corresponde a 21 % e 16 % de rendimento, respectivamente.

### 3.2.2 Triagem cromatográfica: Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Os extratos passaram inicialmente por uma triagem por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), empregando diferentes misturas de fases móveis e reveladores, a fim de se avaliar e identificar a classe de produtos naturais presentes (Wagner; Bladt, 1996).

Para a análise das classes de compostos químicos, os extratos das folhas e dos galhos de *M. acutifolium* foram solubilizados com metanol e posteriormente aplicados em cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 com indicador de fluorescência UV 20 x 20 cm (Sigma-Aldrich). A fase móvel com melhor resolução para as substâncias ali presentes foi empregando-se a mistura dos solventes acetato etila/ácido acético/ácido fórmico/água nas proporções de 100:11:11:26 (v/v). As placas foram visualizadas sob radiação ultravioleta (254 nm e 365 nm) após a aplicação dos seguintes reveladores: anisaldeído sulfúrico modificado ou NP/PEG (difetilboriloxietilamina /polietilenoglicol) (Wagner; Bladt, 1996).

### 3.2.3 Doseamento dos fenóis totais dos extratos de folhas e galhos de *M. acutifolium*

Foi empregado o método de Folin-Ciocalteu para determinação de fenóis totais (Silva et al., 2020). A curva de calibração, construída utilizando 8 diluições da concentração de ácido gálico, variando de 87,5 mg. L<sup>-1</sup> a 700 mg. L<sup>-1</sup>, a partir de uma solução estoque de 875 mg. L<sup>-1</sup>. Os extratos das folhas e galhos de *M. acutifolium* foram preparados na concentração de 1 mg. mL<sup>-1</sup>.

Para a determinação do doseamento dos fenóis totais foram adicionados em microtubos 1.560 µL de água Milli-Q, 40 µL dos extratos de *M. acutifolium*, 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 300 µL de uma solução saturada de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Após 2 horas de reação, foram adicionadas alíquotas de 200 µL de cada microtubo em uma placa de 96 poços para a realização da leitura em 760 nm.

Os valores das absorvâncias das amostras dos extratos foram extrapolados na curva padrão de ácido gálico, obtendo-se os valores em massa equivalentes ao ácido gálico (EAG).

### 3.2.4 Doseamento dos flavonoides totais dos extratos de folhas e galhos de *M. acutifolium*

A determinação dos flavonoides totais foi realizada utilizando a reação com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) (Alves; Kubota, 2013; Bezerra, 2018). Para tanto, foi empregada uma solução de concentração  $50 \text{ mg. mL}^{-1}$  de cloreto de alumínio.

A curva padrão de rutina foi elaborada a partir de 10 diluições nas concentrações de  $3,0 \text{ } \mu\text{g. mL}^{-1}$  a  $60 \text{ } \mu\text{g. mL}^{-1}$  a partir de uma solução estoque de  $0,1 \text{ mg. mL}^{-1}$ . Os extratos foram preparados na concentração de  $1 \text{ mg. mL}^{-1}$ .

O doseamento dos flavonoides totais foi adicionado em microtubos  $0,5 \text{ mL}$  da amostra dos extratos de *M. acutifolium* e  $0,5 \text{ mL}$  da solução de cloreto de alumínio. Após 15 minutos de reação, as alíquotas de  $200 \text{ } \mu\text{L}$  de cada microtubo foram adicionadas em uma placa de 96 poços para a realização da leitura em  $420 \text{ nm}$ . Os valores das absorbâncias das amostras foram extrapolados na curva padrão de rutina, obtendo-se os valores em massa equivalentes a rutina.

As leituras de fenóis totais e flavonoides totais foram realizadas usando um espectrofotômetro para microplacas (Elisa) da Synergy™ H1. Cada ensaio foi executado em triplicata, e os resultados tratados e representados com média  $\pm$  desvio padrão no programa Origin Pro 8.5.

### 3.2.5 Análises dos extratos por HPLC-DAD-UV

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fotodiodos de varredura do espectro no ultravioleta (HPLC-DAD-UV) foram desenvolvidas em um Cromatógrafo Agilent 1260 equipado com célula de fluxo de  $60 \text{ mm}$  com velocidade de detecção em  $80 \text{ Hz}$  e detector por arranjo de fotodiodos de varredura de espectro no ultravioleta e visível ( $200 - 600 \text{ nm}$ ). Para as análises em escala analítica foi empregado como fase estacionária uma coluna Zorbax Eclipse plus de fase reversa  $\text{C}_{18}$  ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ) e  $3,5 \text{ } \mu\text{m}$  de diâmetro de partícula mantida a  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , com um fluxo de fase móvel de  $1,0 \text{ mL. min}^{-1}$  e  $3 \text{ } \mu\text{L}$  de volume de injeção de amostras, preparadas na concentração de  $1 \text{ mg. mL}^{-1}$ . Os comprimentos de onda utilizados para registro dos cromatogramas foram em  $254, 280, 325$  e  $352 \text{ nm}$ . O sistema de eluição em modo gradiente consistiu em água acidificada com  $0,1 \%$  de ácido acético (eluente A; Synth) e acetonitrila (ACN) (eluente B; Merck) na seguinte programação: 0 a 6 min,

10 % B, de 6 a 7 min, 10 a 15 % B, de 7 a 22 min, 15 % B, de 22 a 23 min, 15 a 20 % B, 23 a 33 min, 20 % B, 33 a 34 min, 20 a 25 % B, 34 a 44 min, 25 % B, 44 a 54 min, 25 a 50 % B, 54 a 60 min, 50 a 100 % B, 60 a 65 min, 100 % B.

### 3.2.6 Análise dos extratos de *M. acutifolium* por UHPLC-ESI-IT-MS/MS

As análises dos espectros de massas foram realizadas em um espectrômetro de massas LCQ FLEET (UHPLC-PDA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, Thermo Scientific®). Para a separação cromatográfica foi utilizado o sistema UHPLC-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, coluna de fase reversa Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm 1,7 µm). A separação cromatográfica foi realizada em modo gradiente: 0-1,5 min (12-15 % ACN); 1,5-4 min (15-25 % ACN); 4-5,5 min (25-29 % ACN); 5,5-7 min (29-32 % ACN); 7-8,5 min (32-50 % ACN); 8,5-10 min (50-65 % ACN); 10-12,5 min (65-70 % ACN); 12,5-14 min (70 % ACN); 14-17min (70-100 % ACN) e 17-20 min (100 % ACN) sob uma vazão de 0,350 mL. min<sup>-1</sup>, temperatura capilar 350°C, nitrogênio como gás de névoa e vácuo de 1,14 Torr. As fases móveis utilizadas foram: água (A) e acetonitrila (B) ambas acidificada com ácido fórmico a 0,1%. As matrizes estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS<sup>2</sup>, MS<sup>3</sup> e MS<sup>n</sup>) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios (MS<sup>n</sup>), nas seguintes condições: voltagem do capilar -4 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 350°C e gás de arraste (N<sub>2</sub>) com o fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ.

O primeiro evento se deu através da varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos de MS<sup>n</sup> foram realizados a partir dos dados dessa primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão de 25 e 30 % da energia total do instrumento. Para aquisição e processamentos dos dados espectrométricos foi utilizado o software *Xcalibur* (Thermo Scientific®).

### 3.2.7 Quantificação de flavonoides

Para a construir curva de calibração, o padrão de quercetina foi solubilizado em metanol grau HPLC (2 mg. mL<sup>-1</sup>) e filtrada com filtro de seringa de 0,45 µm. A solução obtida foi diluída em uma faixa de concentração de 2 - 1600 µg. mL<sup>-1</sup>, resultando em dez soluções padrão. As amostras foram analisadas em triplicata por HPLC–DAD-UV, com um volume de injeção de 3 µL. A temperatura da coluna fixada em 45°C e o método cromatográfico constituído por uma mistura de solventes A (0,1 % ácido acético em água) e B (acetonitrila) de: 0–6 min (10 % B); 6–7 min (10–15 % B); 7–22 min (15 % B); 22–23 min (15–20 % B); 23–33 min (20 % B); 33–34 min (20–25 % B); 34–44 min (25 % B); 44–54 min (25–50 % B); 54–60 min (50–100 % B). As áreas médias dos picos *versus* a concentração de cada analito foram usadas para construir a curva de calibração para cada substância.

Equação obtida para quercetina:  $y = 16733 x - 58,90$ ;  $R^2 = 0,9990$

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados respectivamente para quercetina como 0,061 e 0,185 µg. mL<sup>-1</sup>.

## 3.3 ETAPA BIOLÓGICA

### 3.3.1 Ensaio Fitotóxico

O extrato hidroetanólico das folhas e dos galhos de *M. acutifolium* foram submetidos ao ensaio de fitotoxicidade para avaliar seus efeitos sobre a taxa de germinação, comprimento do hipocótilo (ou parte aérea) e comprimento da raiz de duas espécies de plantas daninhas alvo: *Bidens pilosa* (picão preto) e *Urochloa decumbens* (sinonímia *Brachiaria decumbens*) (capim-braquiária). O comprimento do hipocótilo foi avaliado para *B. pilosa*, enquanto o comprimento da parte aérea foi medido para *U. decumbens* (Novaes; Torres; Santos, 2016).

Foram utilizados microplacas de seis poços, cada um deles foi forrado com papel filtro e adicionado dez sementes em cada um deles. Posteriormente, 1,0 mL das soluções dos extratos de *M. acutifolium* nas concentrações de 0,2 mg. mL<sup>-1</sup>, 0,4 mg. mL<sup>-1</sup> e 0,8 mg. mL<sup>-1</sup> em solução tampão MES/NaOH (ácido 2-[*N*-morfolino] etanossulfônico e hidróxido de sódio a 1M) (pH 6,0) contendo 0,5 % de DMSO foi incorporado em cada poço. Além disso, foi incluído um

controle negativo adicionando 1 mL da solução tampão. Para cada concentração foram realizadas seis repetições.

Por fim, as microplacas foram fechadas com Parafilm<sup>®</sup>, na sequência incubadas em câmara de cultivo em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), sob fotoperíodo de 12 horas a 25 °C. O período de incubação durou 7 dias para *B. pilosa* e 8 dias para *U. decumbens*. Após este período, as microplacas foram transferidas para um freezer e mantidas por 24 horas para interromper o crescimento das mudas. Posteriormente, as mudas contidas nas microplacas foram descongeladas, cuidadosamente esticadas e digitalizadas. O *software* ImageJ foi utilizado para medir o comprimento do hipocótilo (ou parte aérea) e o comprimento da raiz, enquanto a taxa de germinação foi avaliada pela contagem do número de plântulas germinadas.

O GraphPad Prism 8 foi usado para processamento de gráficos e análises estatísticas. Os dados obtidos foram expressos em porcentagem do controle negativo. O cálculo consistia em subtrair a medida da amostra tratada da medida do controle negativo, dividir o resultado pela medida do controle negativo e multiplicar por 100. Zero representa o controle negativo, enquanto valores negativos indicavam inibição do crescimento e valores positivos indicavam estimulação do crescimento. As médias foram comparadas exclusivamente com o grupo controle para determinar as diferenças significativas nos efeitos fitotóxicos dos extratos Macf e Macg nas espécies de plantas daninhas em estudo.

### 3.3.2 Teste de toxicidade aguda

Os indivíduos de peixe-zebra (*Danio rerio*) jovens/adultos de ambos os sexos com tamanho e peso semelhantes, foram adquiridos do mercado de peixes de Santo André (São Paulo, Brasil).

Os ensaios de toxicidade dos extratos de folhas e galhos de *Machaerium acutifolium* foram preparados de acordo com a metodologia proposta em OECD 203 (2019). Para isso, os peixes foram distribuídos em aquários de vidro de 22 litros contendo água da torneira sem cloro e uma bomba de ar com filtro submerso a 26 °C, sob ritmo circadiano (12:12h claro/escuro).

O experimento foi feito em triplicata, os peixes (n = 10/grupo) tratados via oral, com 20 µL de solução do extrato bruto de *M. acutifolium* e veículo (DMSO 10 %), nas concentrações



de 0,1 mg. mL<sup>-1</sup>, 0,5 mg. mL<sup>-1</sup> e 1,0 mg. mL<sup>-1</sup>) ou 20 µL do veículo (controle, água destilada). Os indivíduos foram expostos as soluções dos extratos das folhas e galhos de *M. acutifolium* ou controle durante um período de 96 h (OECD, 2019; Lira et al, 2020). A mortalidade em cada grupo registradas nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 h. Sempre que possível, determinou-se a concentração letal capaz de ocasionar a morte de 50 % dos peixes (LC<sub>50</sub>). O procedimento foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso Animais – CEUA, do Instituto de Biociências do Câmpus Litoral Paulista (UNESP-IB-CLP) (protocolo nº 07/2022-CEUA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

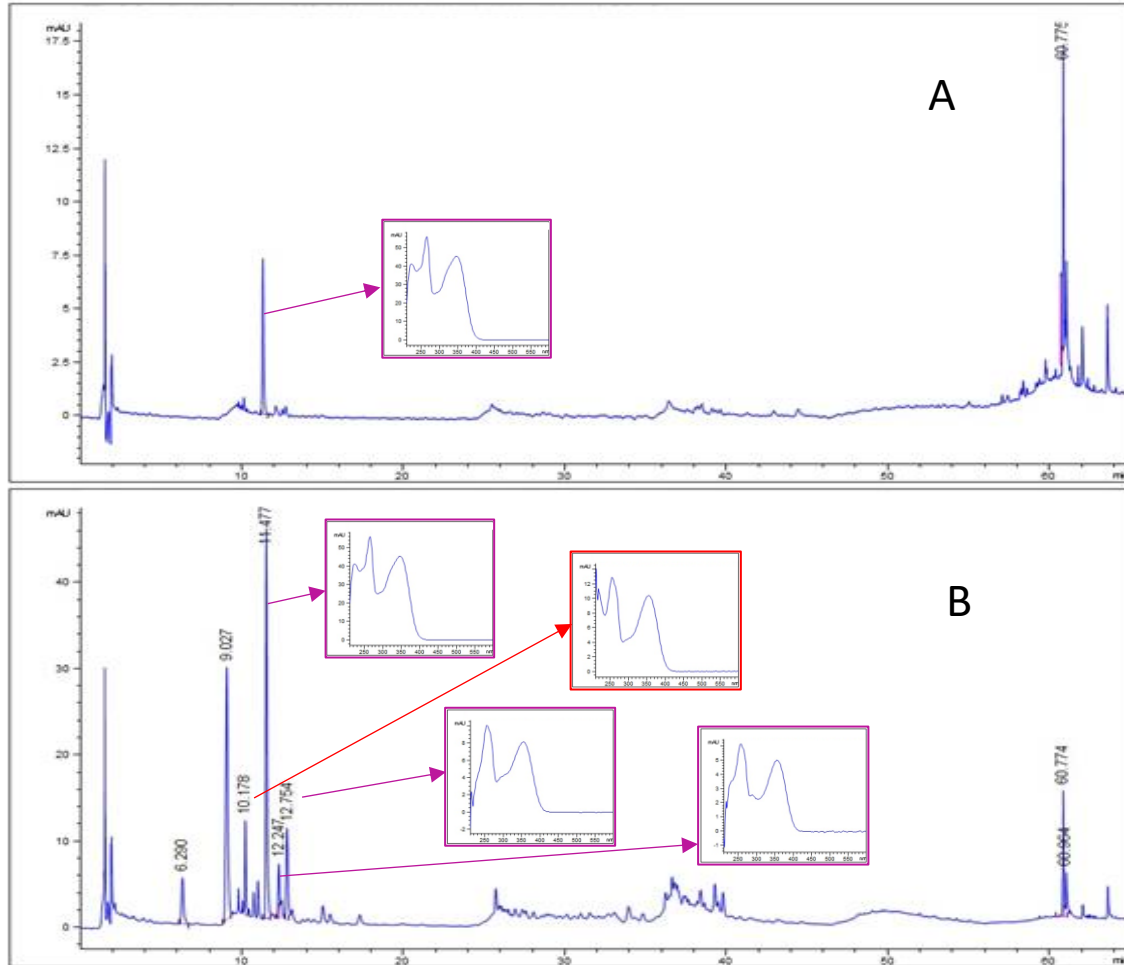
### 4.1 TRIAGEM CROMATOGRAFIA E ANÁLISE POR HPLC-DAD-UV

Para avaliar o perfil cromatográfico dos extratos hidroetanólicos das folhas (Macf) e galhos (Macg) de *Machaerium acutifolium*, estes foram submetidos a várias análises em Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) em diferentes fases móveis. Uma das fases móveis que apresentou boa separação entre as substâncias polares presentes nos extratos foi empregando a mistura de solventes acetato etila/ácido acético/ácido fórmico/água nas proporções de 100:11:11:26 (v/v). A presença de manchas amarelas/douradas com Rf de 0,2 e 0,5, após revelação das placas cromatográficas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm, seguida da pulverização com anisaldeído sulfúrico modificado, pode ser um indicativo da presença de flavonoides de alta e média polaridade (Magozwi et al., 2021). Enquanto manchas de coloração roxa e Rfs de 0,1 e 0,25 após revelação com anisaldeído sulfúrico modificado, e sem absorção nos dois comprimentos de onda, pode sugerir a presença de saponinas (Stochmal et al., 2008). A presença de uma mancha marrom em anisaldeído sulfúrico com Rf 0,15 indica a presença de açúcares nos dois extratos estudados (Paul et al., 2012). De acordo com a placa cromatográfica comparativa destas análises, indica que o extrato dos galhos apresenta uma maior diversidade de saponinas do que o extrato das folhas.

Outra fase móvel que apresentou boa separação entre as substâncias polares presentes nos extratos foi a mistura de solventes acetato etila/ácido fórmico/água nas proporções de 9:1:1 (v/v). Para efeitos comparativos aplicou-se ao lado dos extratos Macf e Macg o padrão de quercetina-3-*O*-galactosídeo (Q<sub>3</sub>Ogal).

Para confirmar a presença dos flavonoides e quais subclasses eles pertenciam, os extratos de folhas (Macf) e galhos (Macg) foram analisados por HPLC-DAD-UV. De acordo com os cromatogramas, é possível observar uma maior diversidade de moléculas com absorção nos comprimentos de onda de 352 nm em Macf quando comparado com Macg (Figura 3).

Figura 3 – A: Perfil cromatográfico da análise por HPLC-DAD-UV em 352 nm do extrato hidroetanólico dos galhos (Macg) de *M. acutifolium* e B: Perfil cromatográfico da análise por HPLC-DAD-UV do extrato hidroetanólico das folhas (Macf) de *Machaerium acutifolium* em 352 nm



- Espectro UV característico de esqueleto básico de flavona
- Espectro UV característico de esqueleto básico de flavonol

Fonte: autor, 2022.

A substância com tempo de retenção em 10,2 min pôde ser detectada no extrato de folhas. De acordo com o espectro de absorção na região do ultravioleta com duas bandas de absorção na faixa de 320-385 nm para a Banda I e 250-285 nm para a Banda II, referente ao anel A. Esses dados sugerem a presença de esqueleto de uma flavona (Figura 3B) (Ferreira, 2018). O estudo químico dos extratos hidroetanólicos de folhas e galhos de *M. eriocarpum* e *M. hirtum* e folhas de *M. amplum* ocorrem a presença de flavonas C-glicosiladas derivadas da apigenina e luteolina (Bento et al., 2018; Ribeiro et al., 2016; Sannomiya et al., 2020; Lopes et al., 2020; Tahira, 2021b).

Já os picos com tempo de retenção em 11,5 min, 12,2 min e 12,7 min apresentam espectros de ultravioletas característicos de flavonóis, através da presença das bandas de absorção em 256 e 354 nm (Figura 3A e 3B) (Santos; Schripsema; Kuster, 2005). No entanto, análises cromatográficas por UHPLC-ESI-IT-MS/MS foram realizadas para obtenção de maiores informações a respeito das classes de produtos naturais presentes nos extratos das folhas e galhos de *M. acutifolium*.

#### 4.2 DOSEAMENTO DE FENÓIS TOTAIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Para se avaliar o teor destes flavonoides nos extratos estudados, foram realizados os ensaios de doseamento de flavonoides totais e bem como de fenólicos totais.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 2), os extratos de galhos e folhas de *M. acutifolium* apresentam um teor de fenólicos totais similares. Na análise de flavonoides totais usando como padrão a rutina, o extrato Macf apresenta um valor 13 vezes maior do que o extrato Macg.

Tabela 2 - Resultados obtidos a partir do doseamento de fenóis totais e flavonoides totais nos extratos de folhas (Macf) e galhos (Macg) de *Machaerium acutifolium*

Amostras	Fenóis totais	Flavonoides totais
	(mg EAG/ g de extrato)	(mg Rutina/ g de extrato)
Macf	185 ± 14	78,2 ± 6,9
Macg	188 ± 16	6,0 ± 1,6

Fonte: autor, 2022.

De acordo com a quantificação realizada por HPLC-DAD-UV, o extrato Macf apresenta um teor de flavonoides maior que o extrato Macg (Tabela 3). Vale ressaltar que esses dados confirmam os dados observados previamente no perfil químico dos extratos por HPLC-DAD-UV (Figura 3).

Tabela 3 – Quantificação de flavonoides (quercetina) presentes nos extratos de folhas (Macf) e galhos (Macg) de *M. acutifolium*

Amostras	Flavonoides (mg quercetina. g extrato <sup>-1</sup> )
Macf	8,42
Macg	0,54

Fonte: autor, 2023.

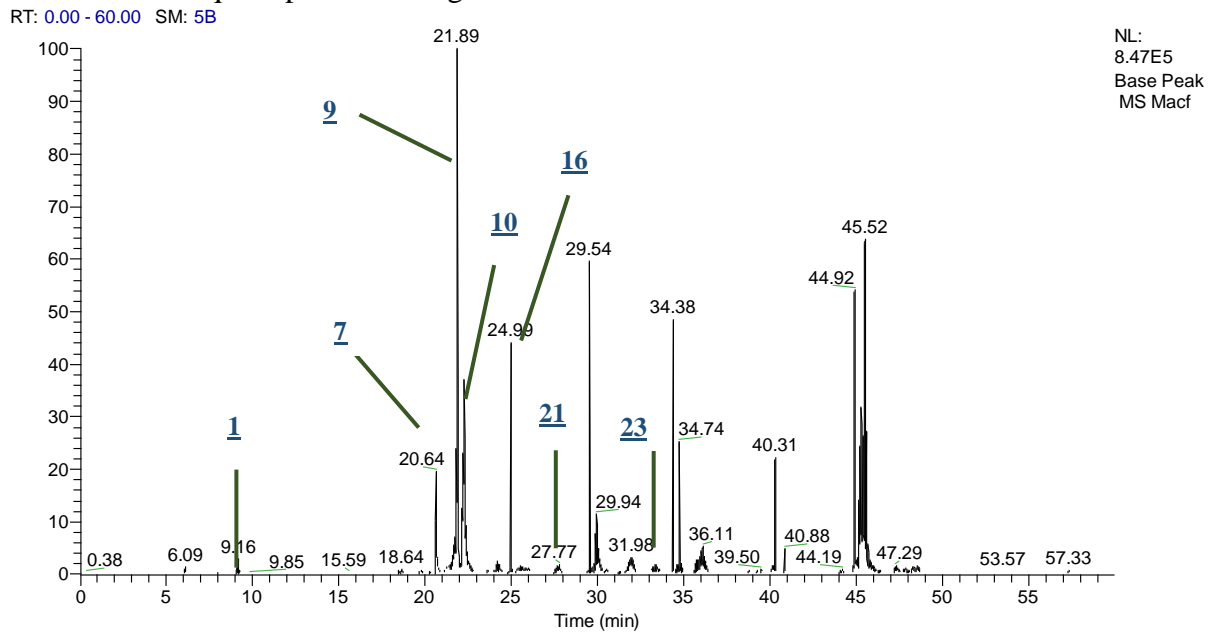
### 4.3 ANÁLISE DOS EXTRATOS DE FOLHAS E GALHOS POR UHPLC-ESI-IT-MS/MS

As análises UHPLC-IT-ESI-MS/MS foram aplicadas para identificar a composição química dos extratos de *M. acutifolium*. No total, foram identificadas 45 substâncias nas folhas e galhos. Os resultados sugeriram a presença de flavonas e glicosídeos flavonóis, e saponinas com esqueleto do tipo soyasapogenol e hederagenina.

#### 4.3.1 Identificação putativa do perfil químico dos extratos hidroetanólico das folhas de *M. acutifolium*

Para obter mais informações sobre os constituintes químicos presentes nos extratos das folhas, com os estudos dos íons precursores e seus íons produtos foi possível indicar trinta metabólitos secundários no extrato das folhas de *M. acutifolium* (Figura 4) sendo 3 ácidos (**2-4**), o dímero de proantocianidina tipo B (**1**), uma cumarina (**6**), uma chalcona (**29**), duas isoflavonas (**15** e **21**), quinze flavonóis (**5**, **7-20** e **23**), quatro flavonas (**22**, **24-26**) e duas saponinas (**27** e **28**) (Tabela 4). Alguns deles estão indicados na Figura 4.

Figura 4 - Cromatograma de pico base (BPC) do extrato de folhas de *M. acutifolium* obtido por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massa tandem de ionização por *electrospray* (UHPLC-IT-ESI-MS/MS). Os picos de destaque representam algumas substâncias listadas na Tabela 4



Fonte: autor, 2023.

Tabela 4 – Substâncias identificadas pela análise UHPLC-IT-ESI-MS/MS do extrato hidroetanólico das folhas de *M. acutifolium*

Número substância	Tempo de retenção (min)	[M-H] -	Fragmento de íons (m/z)	Substância identificada	Referências
<u>1</u>	9,17	557	289, 267	dímero de proantocianidina tipo B	Amico et al., 2004; Pati et al., 2006
<u>2</u>	9,19	191	173, 171, 155, 127, 111, 93, 85	ácido quínico	Liu et al., 2021
<u>3</u>	9,19	267	249	ácido 4-aminobutírico	Song et al., 2005
<u>4</u>	9,20	353	353, 191, 173	ácido monocateoilquínico	Lin; Harnly, 2008
<u>5</u>	19,74	771	609	quercetina- <i>O</i> -Hex-dHex- <i>O</i> -Hex	Vallverdú-Queralt et al., 2010
<u>6</u>	19,83	205	205, 187, 173, 143, 131, 111, 87	limetina (5,7-dimetoxicumarina)	El-Sayed et al., 2017
<u>7</u>	20,6	755	737, 609, 591, 429, 300, 271, 255	quercetina- <i>O</i> -dHex-Hex-dHex	Li et al., 2009

<b><u>8</u></b>	21,4	739	593, 575, 473, 285, 255	kaempferol- <i>O</i> - dHex-Hex- <i>O</i> -dHex	Ghareeb et al., 2018
<b><u>9</u></b>	21,91	755	737, 609, 445, 301	quercetina- <i>O</i> -Hex- dHex-dHex	Ghareeb et al., 2018
<b><u>10</u></b>	22,18	593	447, 285, 284, 255, 227	kaempferol- <i>O</i> -Hex- dHex (isômero 1)	Inbaraj et al., 2010
<b><u>11</u></b>	22,24	739	593, 285	kaempferol- <i>O</i> - dHex-Hex-dHex	Carvalho et al., 2022
<b><u>12</u></b>	23,59	741	609, 301	quercetina- <i>O</i> -Hex- dHex- <i>O</i> -pent	Simirgiotis et al, 2015
<b><u>13</u></b>	23,98	623	315, 314, 300, 271, 255	isorhamnetina- <i>O</i> - dHex-Hex	Zhuan-Hong et al, 2016
<b><u>14</u></b>	24,04	769	623	kaempferol- <i>O</i> - feruloil-Hex-dHex	Lin et al., 2014
<b><u>15</u></b>	24,21	285	285, 270, 267, 257	prunetina (isômero 1)	Madeira; Borges; Florêncio, 2010
<b><u>16</u></b>	24,93	725	593, 285	kaempferol- <i>O</i> - (Pent- <i>O</i> -dHex)-Hex	Roriz et al, 2014



<b><u>17</u></b>	25,44	301	273, 257, 229, 179, 151	quercetina	Pascale et al., 2020
<b><u>18</u></b>	25,45	609	301, 179	quercetina- <i>O</i> -Hex- dHex	Teixeira et al., 2020
<b><u>19</u></b>	25,99	609	301, 179	quercetina- <i>O</i> -Hex	Gu et al., 2012
<b><u>20</u></b>	27,65	593	447, 285, 284, 255, 227	kaempferol- <i>O</i> - dHex-Hex-Hex (isômero 2)	Zhuan-Hong et al., 2016
<b><u>21</u></b>	27,67	285	285, 270, 267, 257	Prunetina (isômero 2)	Madeira; Borges; Florêncio, 2010
<b><u>22</u></b>	29,08	607	487, 461, 447, 443, 341, 300, 299, 284	diosmetina- <i>O</i> -Hex	Brito et al., 2014
<b><u>23</u></b>	31,86	593	447, 285, 284, 255, 227	kaempferol- <i>O</i> - dHex-Hex-Hex (isômero 3)	Zhuan-Hong et al, 2016
<b><u>24</u></b>	33,54	283	283, 268, 240, 239, 223, 212, 196, 163	wogonina (isômero 1)	Han et al., 2007

<u>25</u>	33,74	283	283, 268, 240, 239, 223, 212, 196, 163	wogonina (isômero 2)	Han et al., 2007
<u>26</u>	35,65	283	283, 268, 240, 239, 223, 212, 196, 163	wogonina (isômero 3)	Han et al., 2007
<u>27</u>	35,95	941	923, 879, 733	Soyasapogenol B- AHex-Hex-dHex (isômero 1)	Pollier et al., 2011; Tahira, 2021
<u>28</u>	39,62	941	923, 879, 733	Soyasapogenol B- AHex-Hex-dHex (isômero 2)	Pollier et al., 2011; Tahira, 2021
<u>29</u>	57,47	255	256, 238, 228, 211, 187, 167, 127	chalcona	Raslan et al., 2021

---

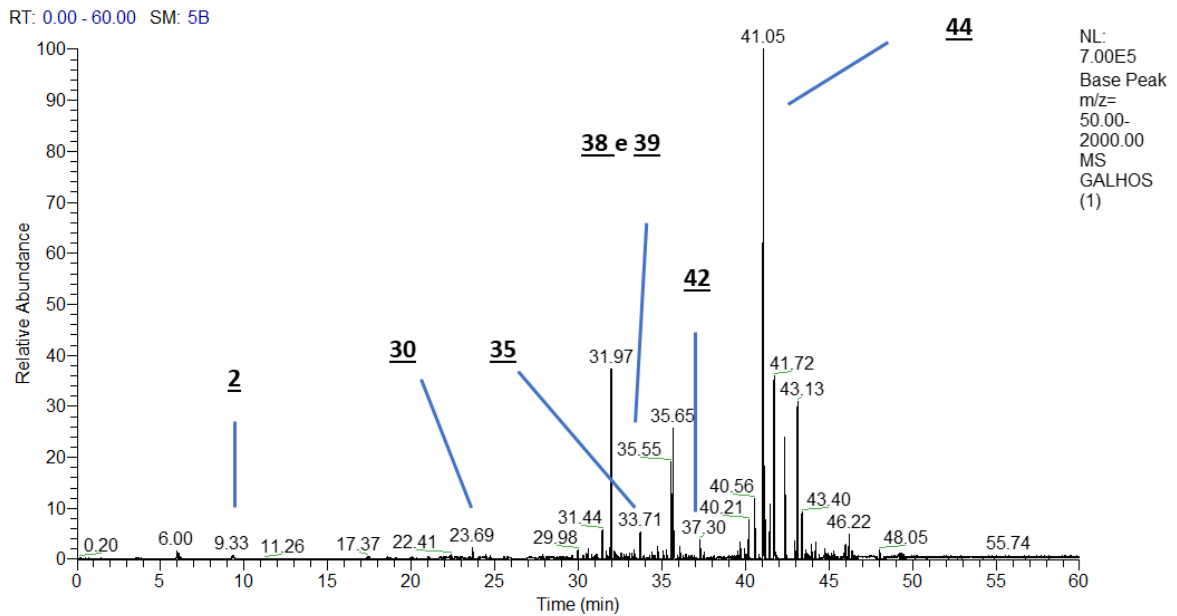
Fonte: autor, 2023.

#### 4.3.2 Identificação putativa do perfil químico dos extratos hidroetanólico dos galhos de *M. acutifolium*

A fim de obter maiores informações das classes de substâncias presentes no extrato bruto dos galhos (Macg) de *M. acutifolium*, realizou-se experimentos por UHPLC-IT-ESI-MS/MS, foi possível detectar dezenove metabólitos secundários, sendo eles, ácido quínico (2), oito derivados C-glicosilados da apigenina (30-36), quatro saponinas do esqueleto de Soyasapogenol A (37, 38, 39 e 41), três esqueletos de Soyasapogenol B (27, 28 e 44), dois

esqueletos de Soyasapogenol E (**42** e **45**) e três esqueletos de Hederagenina (**40** e **43**) (Tabela 5). Algumas delas estão indicadas na figura 5.

Figura 5 - Cromatograma de pico base (BPC) do extrato de galhos de *M. acutifolium* obtido por cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas tandem de ionização por *electrospray* (UHPLC-IT-ESI-MS/MS). Os picos de destaque representam algumas substâncias listados na Tabela 5



Fonte: autor, 2023.

Tabela 5 – Substâncias identificadas pela análise UHPLC-IT-ESI-MS/MS do extrato hidroetanólico de galhos de *M. acutifolium*

Número substância	Tempo de retenção (min)	[M-H] <sup>-</sup>	Fragmento de íons (m/z)	Substância Identificada	Referências
<u>2</u>	9,3	191	173, 147, 85	ácido quínico	Chansrinoyom et al., 2021
<u>30</u>	21,8	593	575, 503, 473, 383, 353	apigenina-C-Hex-C-Hex (isômero 1)	Liang et al., 2019; Ferreres et al, 2003; Ferreres et al, 2018
<u>31</u>	22,3	593	575, 503, 473, 383, 353	apigenina-C-Hex-C-Hex (isômero 2)	Liang et al., 2019; Ferreres et al, 2003; Ferreres et al, 2018
<u>32</u>	23,7	563	545, 473, 443, 383, 353	apigenina-C-Hex-C-Pent (isômero 1)	Wang et al., 2019
<u>33</u>	24,5	563	545, 473, 443, 383, 353	apigenina-C-Hex-C-Pent (isômero 2)	Wang et al., 2019

<b><u>34</u></b>	25,6	563	545, 473, 443, 383, 353	apigenina-C-Hex- C-Pent (isômero 3)	Wang et al., 2019
<b><u>35</u></b>	29,1	769	679, 649, 709, 593, 575, 473, 353, 325	apigenina-C-Hex- C-Hex-O-AHex	de Camargo et al., 2021
<b><u>36</u></b>	31,0	739	679, 649, 563, 545, 443, 383, 353	apigenina-C-Pent- C-(feruloil)-Hex	Wang et al., 2019
<b><u>37</u></b>	33,7	957	939, 895, 811, 767, 749, 631, 613, 541, 473, 453	Soyasapogenol A- AHex-Hex-dHex (isômero 1)	Pollier et al., 2011; Llorent - Martínez et al., 2015
<b><u>38</u></b>	35,1	811	793, 749, 649, 473	Soyasapogenol A- AHex-Hex (isômero 1)	Nascimento et al., 2019
<b><u>27</u></b>	34,7	941	923, 879, 795, 751, 733, 633, 615, 597, 525, 457	Soyasapogenol B- AHex-Hex-dHex (isômero 1)	Pollier et al., 2011; Tahira et al., 2022

<b><u>39</u></b>	35,6	957	939, 895, 811, 649, 473	Soyasapogenol A- AHex-Hex-dHex (isômero 2)	Pollier et al., 2011; Llorent - Martínez et al., 2015
<b><u>40</u></b>	35,6	955	937, 911, 893, 809, 747, 629, 611, 539, 471	Hederagenina- AHex-Hex-dHex	Pollier et al., 2011
<b><u>41</u></b>	35,1	811	793, 749, 649, 473	Soyasapogenol A- AHex-Hex (isômero 2)	Nascimento et al., 2019
<b><u>42</u></b>	44,2	939	921, 877, 793, 731, 613, 595, 523, 465, 455	Soyasapogenol E (isômero 1)	Pollier et al., 2011; Negri;Tabach, 2013; Nascimento et al., 2019
<b><u>43</u></b>	37,3	809	747, 647, 629, 585, 567, 471, 451	Hederagenina- AHex-Hex	Pollier et al., 2011

<u>28</u>	40,0	941	923, 879, 733	Soyasapogenol B- AHex-Hex-dHex (isômero 2)	Pollier et al., 2011; Tahira, 2021
<u>44</u>	41,1	941	923, 879, 733	Soyasapogenol B- AHex-Hex-dHex (isômero 3)	Pollier et al., 2011; Tahira, 2021
<u>45</u>	44,2	939	921, 877, 793, 631, 455	Soyasapogenol E (isômero 2)	Pollier et al., 2011; Negri; Tabach, 2013; Nascimento et al., 2019

---

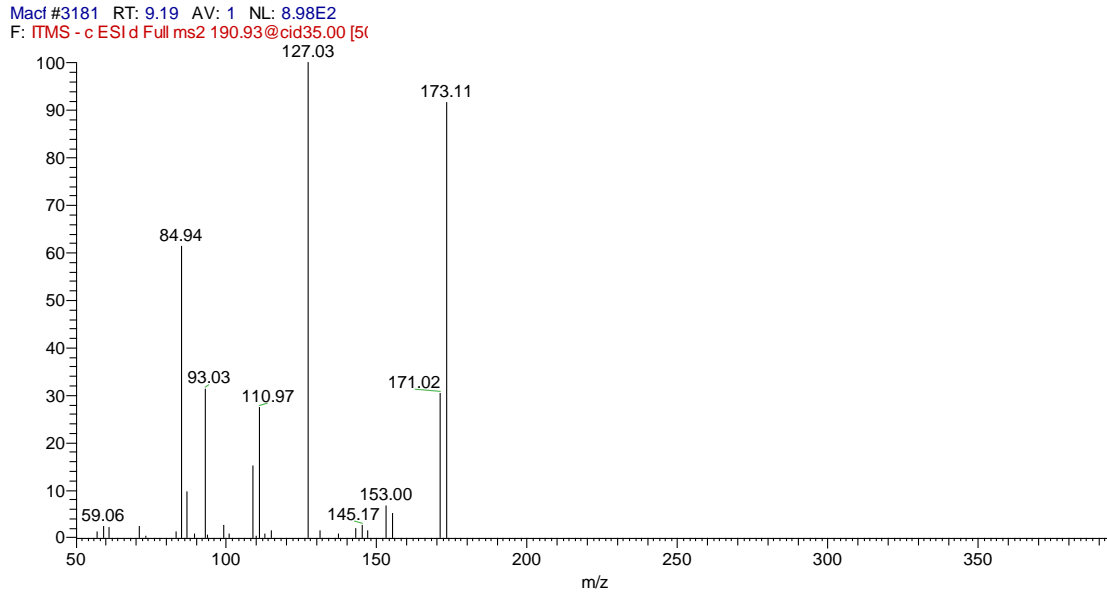
Fonte: autor, 2023.

### 4.3.3 Caracterização das substâncias por UHPLC-IT-ESI-MS/MS

A fim de ilustrar, será apresentado uma descrição de como ocorreu o processo de identificação de algumas das substâncias listadas nas tabelas 4 e 5, baseando-se nas informações dos espectros de massas, levando-se em conta o íon precursor e os íons fragmentos gerados, bem como as informações disponíveis na literatura.

O ácido quínico foi identificado pela presença de  $[M-H]^-$  191 (Masike et al., 2017; Hernandez et al., 2018). No experimento MS<sup>2</sup> a partir do íon precursor de  $m/z$  191, foram gerados os fragmentos de  $m/z$  173  $[M-H_2O-H]^-$  e  $m/z$  147  $[M-H_2O-CO_2-H]^-$ , que correspondem à perda de H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>, respectivamente (Figura 6). Esta molécula é observada nos extratos de folhas e galhos (Tabela 4 e 5).

Figura 6 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  191 em modo negativo (35 eV), identificado como ácido quínico. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental



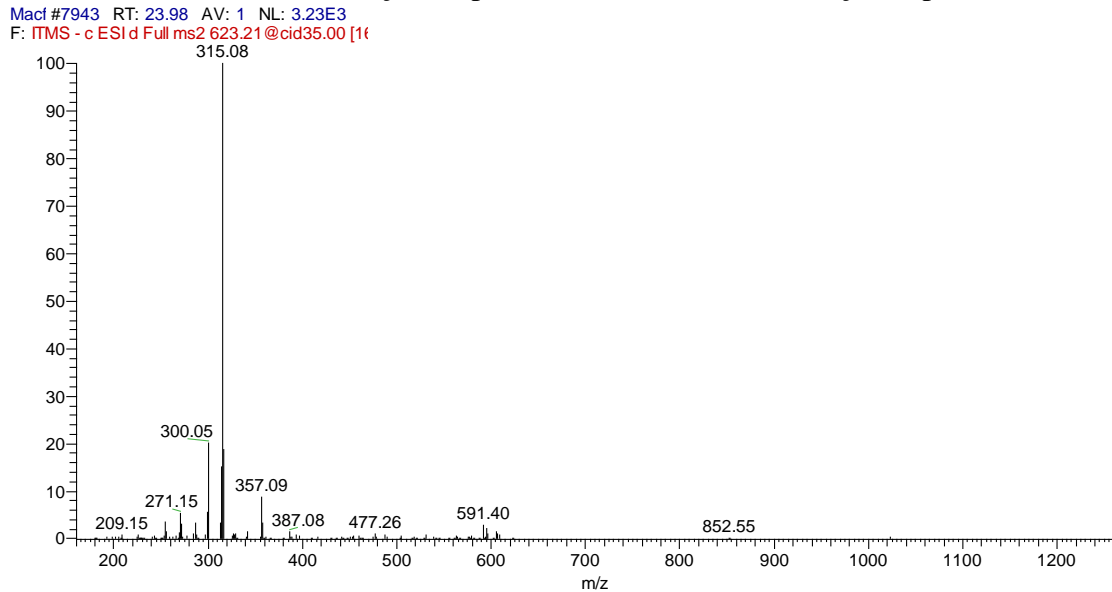
Fonte: autor, 2023.

### Flavonoides: identificação

As substâncias (**5**, **7**, **9**, **12**, **18** e **19**) foram identificados como derivados da quercetina, com base nas informações espectrais ultravioleta e na análise dos fragmentos MS, levando a identificação da aglicona de quercetina em  $m/z$  301 no modo negativo. Enquanto as substâncias **8**, **10**, **11**, **14**, **16** e **23** são derivados de kaempferol com base em seus dados espectrais ultravioleta e fragmentação de MS com base na aglicona de kaempferol em  $m/z$  285 no modo negativo. A substância **13** apresentou um íon  $[M-H]^-$  em  $m/z$  623 e um íon  $MS^2$  em  $m/z$  315 (isorhamnetina) foi identificado como isorhamnetina-*O*-deoxihexose-hexose (Figura 7).



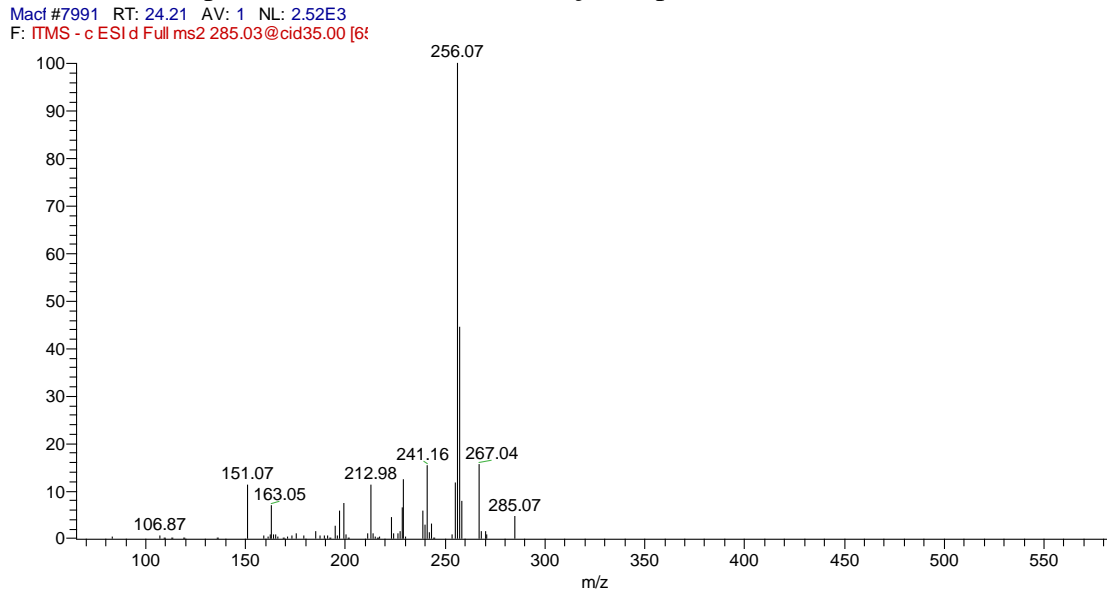
Figura 7 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  623 em modo negativo (35 eV) - identificado como isorhamnetina-*O*-deoxihexose-hexose. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental



Fonte: autor, 2023.

A substância **22** apresentou uma  $[M-H]^-$  em  $m/z$  607 e a presença dos íons fragmentos em  $m/z$  563 e 299 no experimento  $MS^2$ , refere-se a diosmetina-*O*-hexose e diosmetina aglicona, respectivamente (Brito et al., 2014). Segundo Madeira e colaboradores (2010), a prunetina apresenta a partir do íon precursor de  $[M-H]^-$  285 a perda de uma molécula de água, gerando o fragmento de íons de  $m/z$  267, e os fragmentos de íons de  $m/z$  257 e 229, que são a perda de -CO e  $2x$  -CO, respectivamente. Assim, neste trabalho foram detectados íons precursores  $[M-H]^-$  285 que a presença de dois isômeros de prunetina **15** e **21** (Figura 8).

Figura 8 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  285 em modo negativo (35 eV) - identificado como prunetina. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental



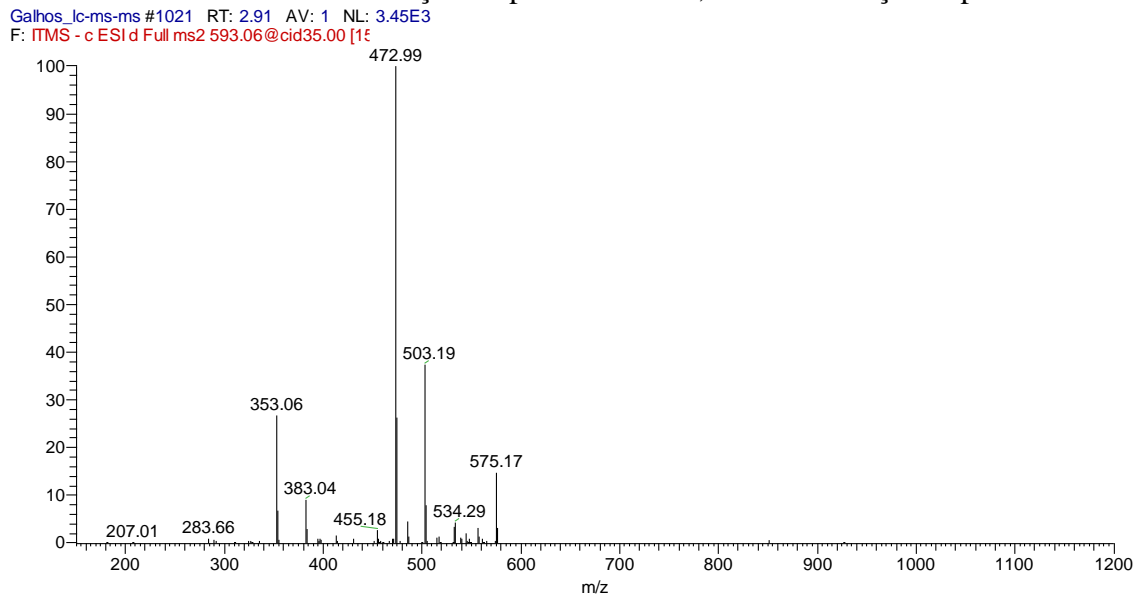
Fonte: autor, 2023.

As espécies do gênero *Machaerium* apresentam na constituição dos extratos polares a presença de flavonas-C-glicosiladas, conforme observado em *M. amplum*, *M. hirtum* e *M. eriocarpum* (Tahira et al., 2022; Lopes et al., 2020; Bento et al., 2018). A glicosilação dessas flavonas ocorre por meio de ligações C-C nas posições C-6 e C-8 da aglicona, onde os açúcares mais observados são glicose, ramnose, arabinose e xilose (Cuyckens; Clayes, 2004). As perdas de 120 Da e 90 Da são indicativas da presença de substituintes hexose enquanto as de 90 Da e 60 Da, são de substituintes pentose de C-glicosídeos (Cuyckens; Clayes, 2004). De acordo com os estudos de Wu e colaboradores (2016), os C-glicosídeos nas posições 6 e 8 de uma aglicona diferem entre si, portanto é possível inferir o tipo e a posição dos açúcares no esqueleto da flavona.

O íon molecular desprotonado de  $m/z$  593, que corresponde às substâncias **30** e **31**, presentes no extrato dos galhos (Macg). O experimento de MS/MS a partir do íon precursor de  $m/z$  593, houve a produção dos íons fragmentos de  $m/z$  575  $[M-H_2O-H]^-$ ,  $m/z$  503  $[M-90-H]^-$  e  $m/z$  473  $[M-120-H]^-$ , os quais correspondem à perda de  $H_2O$  e quebras internas de uma hexose, respectivamente (Figuras 9; Tabela 5). Estas perdas anteriormente mencionadas indicam que a hexose está diretamente ligada ao esqueleto flavonóides na forma de um C-glicosídeo (Ferrerres et al, 2003; Ferreres et al, 2018). Por outro lado, a partir do íon fragmento de  $m/z$  473, foram gerados os íons fragmentos de  $m/z$  383 e  $m/z$  353, os quais indicam a perda de outra unidade de hexose, e que, portanto, esta unidade está ligada em outra porção do esqueleto de uma

apigenina. Estes dados permitem a confirmação de uma de apigenina-*C*-hexose-*C*-hexose, identificada anteriormente em *Machaerium*.

Figura 9 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  593 em modo negativo (35 eV) - identificado como apigenina-*C*-hexose-*C*-hexose. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental



Fonte: autor, 2023.

Os demais flavonoides observados neste extrato possuem suas identificações de modo similar ao anteriormente descrito.

### **Saponinas: identificação**

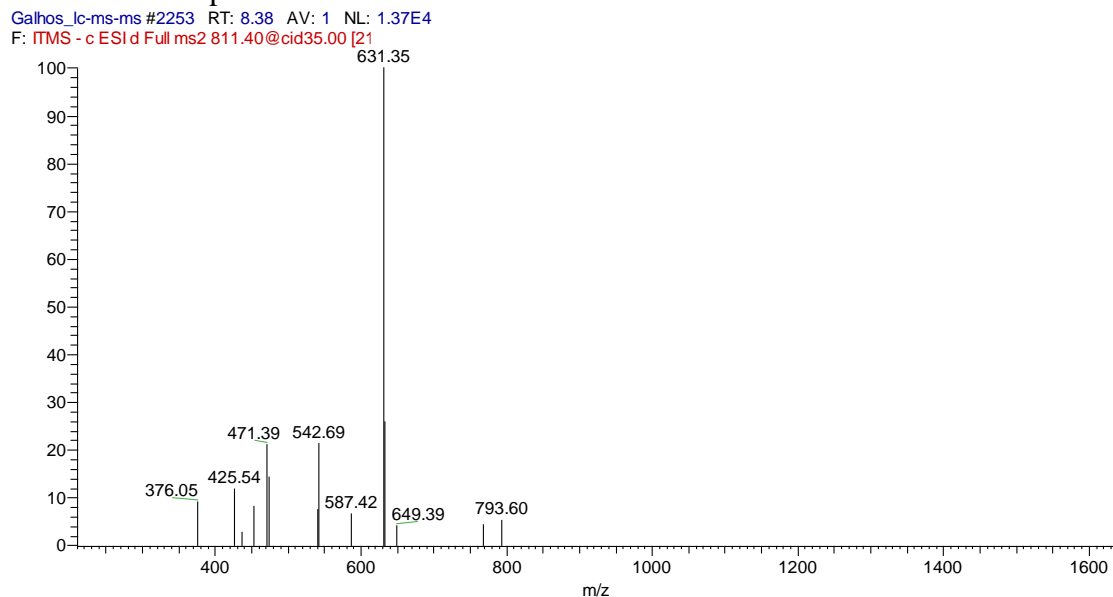
As saponinas triterpenos (**27**, **28**, **37**- **45**, Tabelas 4 e 5) estão presentes nas folhas e galhos de *M. acutifolium* e foram identificadas provisoriamente. De acordo com Pollier e colaboradores (2011), as clivagens glicosídicas das saponinas obtidas no espectro MS/MS fornecem informações sobre os resíduos de açúcar e a aglicona da saponina. Normalmente, os resíduos de açúcar são hexoses (glicose e galactose), deoxihexose (ramnose), pentoses (xilose e arabinose) e ácido urônico (ácido glicurônico). Os espectros de MS/MS mostram perdas típicas como água (-18 Da), resíduo de galactosídeo/glicosídeo (-162 Da), resíduo de ramosídeo (-146 Da), arabinose (-150 Da) e ácido glicurônico (-176 Da).

Nos espectros de fragmentação MS/MS para as saponinas foram detectados os íons fragmentos de  $m/z$  453-473 Da, que são característicos de agliconas de triterpenos. Doze dessas

agliconas (Soyasapogenol A, B e E; Hederagenina) são do tipo oleanano. A literatura indica que apenas a saponina **27** foi previamente observada no extrato hidroetanólico das folhas de *M. amplum* (Tahira et al., 2022), enquanto as demais estão sendo descritas pela primeira vez no gênero *Machaerium*.

O íon precursor  $m/z$  811 referente à substância **38** e **41**, presentes no extrato dos galhos (Macg). O experimento de  $MS^2$  a partir do íon precursor de  $m/z$  811, gerou os fragmentos de  $m/z$  793  $[M-H_2O-H]^-$  e 749  $[M-H_2O-CO_2-H]^-$ , os quais correspondem às perdas de água e água com  $CO_2$ , respectivamente (Figura 10; Tabela 5). A perda de 162 unidades a partir do íon molecular de  $m/z$  811, promove a formação do fragmento de  $m/z$  649  $[M-Hex-H]^-$ , indicando assim a presença de uma hexose. Este fragmento por sua vez, sofre uma clivagem perdendo 176 Da, indicando à perda sequencial de uma unidade de ácido glicurônico, ligado diretamente ao esqueleto da saponina do tipo Soyasapogenol A, gerando o fragmento de  $m/z$  473  $[Aglicona-H]^-$ . Esta saponina Soyasapogenol A-AHex-Hex foi identificada em folhas de *Zornia brasiliensis* que pertence à família Fabaceae (Nascimento et al., 2019).

Figura 10 - Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  811 em modo negativo (35 eV) - identificado como Soyasapogenol A-AHex-Hex. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental

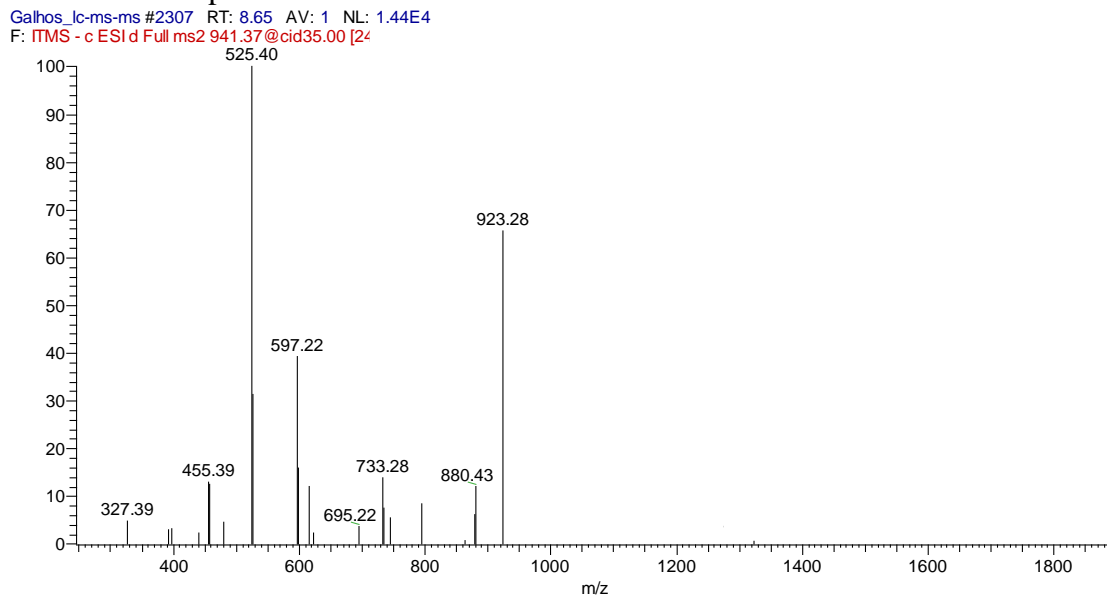


Fonte: autor, 2023.

A substância **27**, **28** e **44**, presentes em Macf e Macg. O experimento de  $MS^2$  a partir do íon precursor em  $m/z$  941, originou os fragmentos de  $m/z$  923 e 879, os quais correspondem às perdas de água  $[M-H_2O-H]^-$  e água com  $CO_2$   $[M-H_2O-CO_2-H]^-$ , respectivamente (Figura 11;

Tabela 4 e 5). A perda de 146 Da a partir do íon molecular de  $m/z$  941, origina o fragmento de  $m/z$  795 [M-dHex-H]<sup>-</sup>, indicando a presença de um deoxihexose terminal. Este fragmento, por sua vez, sofre uma clivagem perdendo 162 unidades, referente à perda sequencial de uma hexose, dando assim, origem ao fragmento de  $m/z$  633 [M-dHex-Hex-H]<sup>-</sup>. Por fim, este fragmento perde 176 Da, indicando que uma unidade de ácido glicurônico ligado diretamente ao esqueleto da saponina do tipo soyasapogenol B, gerando o fragmento de  $m/z$  457 [Aglicona-H]<sup>-</sup>. Esta saponina Soyasapogenol B-AHex-Hex-dHex já foi anteriormente identificada em raízes de *Medicago truncatula* e no extrato hidroetanólico das folhas de *M. amplum* (Pollier et al., 2011, Tahira et al., 2022).

Figura 11 – Espectro de massas de segunda-ordem do íon precursor de  $m/z$  941 em modo negativo (35 eV) – identificado como Soyasapogenol B-AHex-Hex-dHex. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental

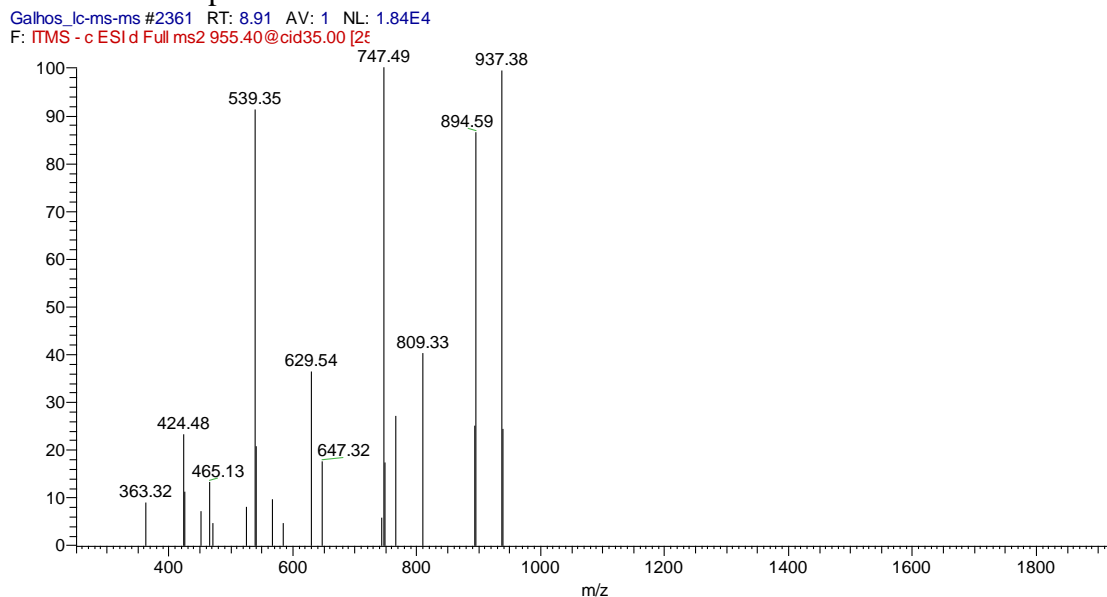


Fonte: autor, 2023.

A substância **40** o íon molecular desprotonado de  $m/z$  955, presentes no extrato dos galhos (Macg). O experimento de MS/MS a partir do íon precursor de  $m/z$  955, formando os seguintes íons de fragmentos de  $m/z$  937 [M-H<sub>2</sub>O-H]<sup>-</sup> e 893 [M-H<sub>2</sub>O-CO<sub>2</sub>-H]<sup>-</sup>, referente às perdas de água e água com CO<sub>2</sub>, respectivamente (Figura 12; Tabela 5). A perda de 146 unidades a partir do íon molecular de  $m/z$  955, origina o íon fragmento de  $m/z$  809 [M-dHex-H]<sup>-</sup>, indicando a presença de um deoxihexose terminal. Este fragmento, por sua vez, sofre uma clivagem perdendo 162 unidades, referente à perda sequencial de uma hexose, dando assim,

origem ao íon fragmento de  $m/z$  647. A partir deste fragmento, houve a perda de 176 unidades, indicando que uma unidade de ácido glicurônico está ligada diretamente ao esqueleto da aglicona da saponina, e que esta tem esqueleto do tipo hederagenina, gerando assim, o fragmento de  $m/z$  471 [Aglicona-H]<sup>-</sup>. Esta saponina Hederagenina-AHex-Hex-dHex foi identificada anteriormente em raízes de *Medicago truncatula*, que pertence à família Fabaceae (Pollier et al., 2011).

Figura 12 – Espectro de massas de primeira-ordem do íon precursor de  $m/z$  955 em modo negativo (35 eV) – identificado como Hederagenina-AHex-Hex-dHex. Para informações referentes às condições espectrométricas, consulte a seção experimental



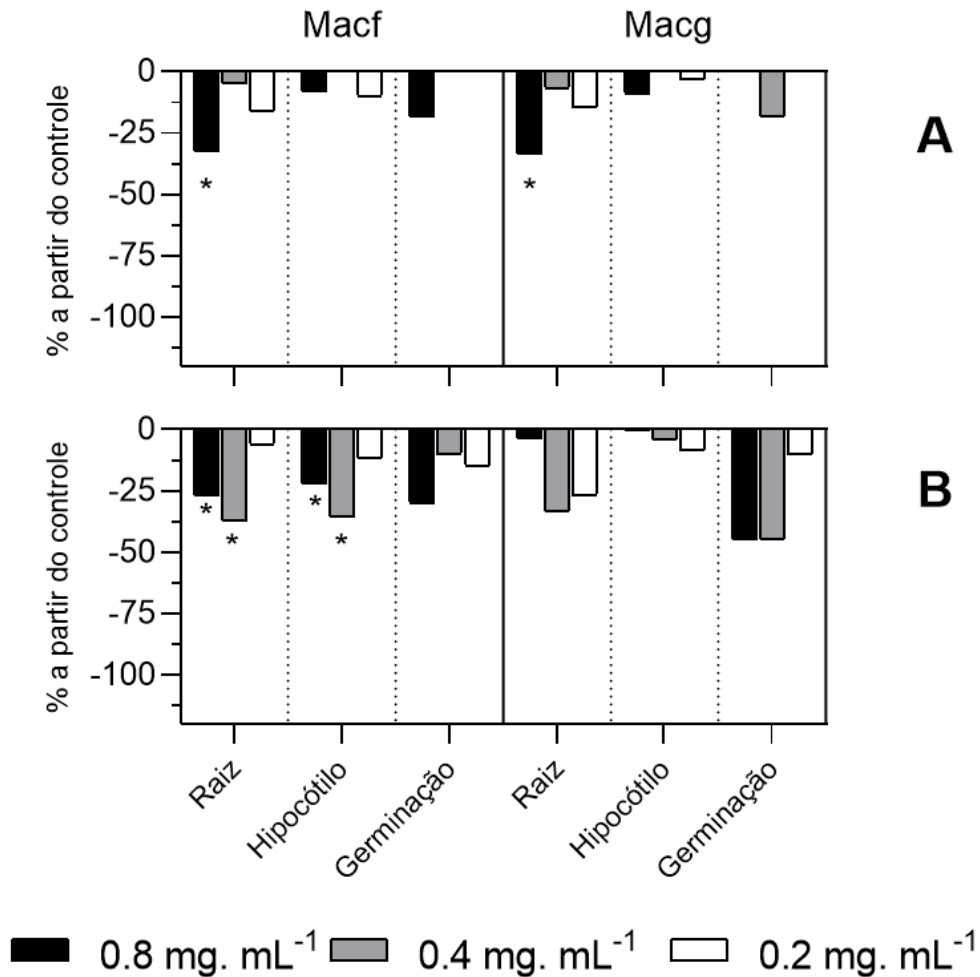
Fonte: autor, 2023.

A identificação das demais saponinas ali detectadas, se deram de modo similar a esta anteriormente descrita.

#### 4.4 ENSAIO FITOTÓXICO

A espécie *Bidens pilosa* é considerada uma planta daninha muito agressiva e competitiva, amplamente disseminada nos campos agrícolas por todo o Brasil (Mondin et al., 2015). Enquanto *Urochloa decumbens* (capim-braquiária) é uma forrageira utilizada como pastagem e cobertura de solo, considerada uma espécie daninha pela sua difícil erradicação e agressiva que invadir áreas agrícolas (Queiroz et al., 2014). A aplicação de agroquímicos para o controle dessas espécies em lavouras tem apresentado resistência aos herbicidas convencionais (Ribeiro et al., 2019). Dessa forma os extratos Macf e Macg foram submetidos ao teste de fitotoxicidade com sementes de *B. pilosa* e *U. decumbens*, com base nos indicadores de taxa de germinação, comprimento do hipocótilo (ou parte aérea) e comprimento da raiz. Os resultados dos ensaios fitotóxicos são apresentados na Figura 13A e 13B.

Figura 13 – Efeitos inibitórios (%) dos extratos de folhas (Macf) e galhos (Macg) na taxa de germinação, comprimento do hipocótilo (ou parte aérea) e comprimento da raiz em *Biden pilosa* (A) ou *Urochloa decumbens* (B). O controle negativo é representado por zero, enquanto valores negativos indicam inibição do crescimento. Um asterisco indica uma diferença significativa quando comparado com o controle negativo ( $p < 0,05$ ). Os valores foram expressos como uma diferença em porcentagens do controle



Fonte: autor, 2022.

No ensaio envolvendo *B. pilosa*, o parâmetro mais afetado pelos extratos das folhas e dos galhos foi o comprimento da raiz. A inibição foi significativa na concentração de 0,8 mg mL<sup>-1</sup> com valores próximos a 35 % (Figura 13A). A similaridade na atividade fitotóxica com ambos os extratos indica que a utilização do extrato bruto com os diversos compostos presentes apresenta uma importante inibição no crescimento da raiz.

Para os ensaios envolvendo sementes de *Urochloa decumbens*, o extrato das folhas



(Macf) apresentou a mesma inibição para o comprimento do hipocótilo e comprimento de raiz nas concentrações de 0,4 e 0,8 mg. mL<sup>-1</sup> (Figura 13B). Esses resultados destacam a maior eficácia do extrato Macf, sugerindo que maior diversidade das classes de flavonoides concomitantemente com as saponinas presentes nesse extrato pode ser responsável pela ação fitotóxica.

Outras espécies de *Machaerium* apresentaram atividade fitotóxica, como é o caso do extrato hidroetanólico de folhas de *M. eriocarpum* frente às sementes de sorgo e pepino na concentração de 0,5 e 1,0 mg. mL<sup>-1</sup>, esse estudo indica estar relacionada à presença da flavona C-glicosilada isovitexina (Bento et al., 2018). A fração enriquecida em flavonoides C-glicosilados derivados de apigenina presentes no extrato das folhas de *M. amplum* apresentou ação fitotóxica no crescimento de raízes de cebola na concentração de 0,2 mg. mL<sup>-1</sup> (Tahira, 2021a).

De acordo com Mierziak e colaboradores (2014), os flavonóides podem atuar na modulação da resposta da planta a estresses, controlando assim o processo de transporte de auxinas, que é um dos mais importantes fitormônios que influenciam os processos de desenvolvimento radicular, transição mitótica e transcrição gênica. As saponinas isoladas das partes aéreas de *Trifolium argutum* Sol. apresentou atividade de fitotoxicidade superior a 60 % de inibição do crescimento radicular de *L. sativa* na concentração de 333 µM (Pérez et al., 2015). Saponinas isoladas de raízes de alfafa, como Hederagenina e Soyasapogenol tipos B mostraram atividade contra ervas daninhas específicas do trigo (Waller et al., 1993). Assim, o efeito dos flavonoides e saponinas no extrato das folhas de *M. acutifolium*, pode ter constituintes com potencial fitotóxico nas sementes do capim-braquiária.

#### 4.5 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA EM PEIXE-ZEBRA

O *Danio rerio* (peixe-zebra) foi o organismo modelo escolhido para o teste ecotoxicológico, avaliando a taxa de mortalidade dos indivíduos a exposição as soluções dos extratos de folhas (Macf) e galho (Macg) nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mg. mL<sup>-1</sup>. Monitorando os indivíduos a cada 24 h durante um período de 96 h.

Após a exposição dos peixes, por via oral, aos extratos Macf e Macg, e o controle negativo nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1 mg. mL<sup>-1</sup>. Os resultados observados mostram que a exposição

nas concentrações indicadas não foi letal para os indivíduos estudados (Tabela 6). A ocorrência da letalidade de um único indivíduo do grupo Macg a 0,1 mg. mL<sup>-1</sup> no período de 24 h, provavelmente se deve a erro no manuseio do material.

Tabela 6 – Taxa de mortalidade (%) do peixe-zebra a partir de diferentes concentrações dos extratos de folhas (Macf) e galhos (Macg) no período de 96 h

	Concentração (mg. mL <sup>-1</sup> )	Nº de peixe-zebra	Total de mortes				Mortalidade (%)	LC <sub>50</sub> (mg. mL <sup>-1</sup> )
			24 h	48 h	72 h	96 h		
<b>Macf</b>	Controle	10	0	0	0	0	0	>1,0
	0,1	10	0	0	0	0	0	>1,0
	0,5	10	0	0	0	0	0	>1,0
	1	10	0	0	0	0	0	>1,0
<b>Macg</b>	0,1	10	1	0	0	0	10	>1,0
	0,5	10	0	0	0	0	0	>1,0
	1	10	0	0	0	0	0	>1,0

Fonte: autor, 2023.

O *Danio rerio* tem sido amplamente empregado como ferramenta biológica associada a substâncias químicas. Alguns estudos destacam que em ambientes aquáticos contendo agroquímicos como atrazina e glifosato são observadas alterações neurológicas que afeta o comportamento e a morfologia dos peixes expostos (Zhu et al., 2010; Bridi et al., 2017; Rodrigues et al., 2019; Lopes-Ferreira et al., 2021). Essa abordagem é fundamental para compreender os riscos ambientais e promover práticas mais seguras e sustentáveis no uso de agroquímicos.

## 5 CONCLUSÃO

O estudo químico do extrato hidroetanólico dos galhos e folhas de *M. acutifolium* por UHPLC-IT-ESI-MS/MS indicou a presença de C-flavonas, isoflavonas e, as saponinas com esqueleto do tipo Hederagenina e Soyasapogenol E são observadas exclusivamente no extrato dos galhos. A análise do extrato hidroetanólico das folhas permitiu identificar putativamente vinte e sete metabólitos secundários, sendo catorze flavonóis, uma cumarina e uma chalcona. No extrato do galho foram identificadas dezenove substâncias, sendo oito flavonas C-glicosiladas e dez saponinas. Apenas uma saponina (Soyasapogenol B) foi previamente observada no gênero. De acordo com a quantificação por HPLC-DAD-UV, Macf possui maior teor de flavonoides que Macg. Os constituintes flavonoides e saponinas podem estar relacionados com a ação fitotóxica observada. O ensaio ecotóxico revelou que ambos os extratos de folhas e galhos não são capazes de provocar alterações no *Danio rerio*, nas concentrações testadas.

Estes dados podem indicar o potencial do extrato das folhas para o desenvolvimento de um herbicida natural, entretanto, outros testes devem ser realizados, como antimicrobiano para verificar a toxicidade destes extratos em outros organismos modelo.

## REFERÊNCIAS

- ABE, F. R. et al. Early life stage assays in zebrafish. **Toxicity Assessment: Methods and Protocols**, p. 77-92, 2021.
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Ministério da Agricultura do Governo Federal. Disponível: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 06 abr. 2022.
- AL-HUQAIL, A. et al. Antifungal, Antibacterial, and Antioxidant Activities of *Acacia Saligna* (Labill.) H. L. Wendl. Flower Extract: HPLC Analysis of Phenolic and Flavonoid Compounds. **Molecules**, v. 24, n. 4, p. 700, 2019.
- ALVES, E.; KUBOTA, E.H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 2013.
- AMBRÓSIO, M. M. DE Q. et al. Sobrevivência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, em microcosmo, simulando solarização com prévia incorporação de materiais orgânicos. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 1, p. 20–25, 2009.
- AMEN, Y. M. et al. The genus *Machaerium* (Fabaceae): taxonomy, phytochemistry, traditional uses and biological activities. **Natural Product Research**, v. 29, n. 15, p. 1388–1405, 2015.
- AMICO, V. et al. Constituents of grape pomace from the Sicilian cultivar ‘Nerello Mascalese’. **Food Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 599–607, 2004.
- ASHMAWY, N. A. et al. Eco-friendly wood-biofungicidal and antibacterial activities of various *Coccoloba uvifera* L. leaf extracts: HPLC analysis of phenolic and flavonoid compounds. v. 15, n. 2019, p. 4165–4187, 2020.
- BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N. Documentação e valorização da fitoterapia tradicional Kayapó nas aldeias A’Ukre e Pykanu - sudeste do Pará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 47–49, 2003.
- BASTOS, M. N. C. Contribuição ao estudo sistemático de algumas espécies do gênero *Machaerium Persoon* (Leguminosae-Papilionoideae) ocorrentes na Amazônia Brasileira. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. Série Botânica, Belém, v. 3, p. 183-278, 1987.
- BEHIRY, S. I. et al. Antifungal and Antibacterial Activities of Wood Treated with *Musa paradisiaca* L. Peel Extract: HPLC Analysis of Phenolic and Flavonoid Contents. **Processes**, v. 7, n. 4, p. 215, 2019.
- BENTO, C. C. et al. Chemical constituents and allelopathic activity of *Machaerium eriocarpum* Benth. **Natural Product Research**, v. 34, n. 6, p. 884–888, 2018.
- BENTO, C. C. et al. Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Ultravioleta de Arranjo de Diodos (CLAE-UV-DAD) de Extratos de *Machaerium*

- Acutifolium* Vogel e o seu Potencial Antioxidante. In: **Agendas Locais e Globais da Sustentabilidade: Ciência, Tecnologia, Gestão e Sociedade**. São Paulo: Blucher, 2022. p. 129–142.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle biológico de doenças de plantas do Brasil. BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). *Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.
- BEZERRA, J. J. L. et al. Análise da composição fitoquímica e doseamento de flavonoides totais dos extratos hidroalcoólicos de *Cyperus iria* L. e *Cyperus articulatus* L. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 228-238, 2018.
- BHARDWAJ, R.; SHARMA, R. A. Flavonoids of *Boerhavia diffusa* - GC-MS analysis and inhibitory activity against pathogenic microbes. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 8, p. 3905-3914, 2019.
- BOHNER, T. O.; ARAÚJO, L. E. B.; NISHIJIMA, T. O impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 8, p. 329, 2013.
- BONFIM, F. P. G. et al. Alelopatia: o potencial das plantas medicinais no controle de espécies espontâneas. **Centro Agrícola**, Santa Clara, v. 45, n. 1, p. 78-87, 2018.
- BRIDI, D. et al. Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. **Toxicology**, v. 392, p. 32–39, 2017.
- BRITO, R. S. et al. Transgenic zebrafish (*Danio rerio*) as an emerging model system in ecotoxicology and toxicology: Historical review, recent advances, and trends. **Science of The Total Environment**, v. 848, p. 157665, 2022.
- BRITO, A. et al. HPLC-UV-MS Profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in northern Chile. **Molecules**, v. 19, n. 11, p. 17400–17421, 2014.
- CARVALHO, A. A. et al. Identificação de flavonoides das folhas de *Machaerium acutifolium* (Papilionoideae-Fabaceae) por espectrometria de massas. In: **Ciências Biológicas: Campo Promissor em Pesquisa 2**. [s.l.] Atena Editora, 2019. p. 118–129.
- CARVALHO, A. A. et al. First report of flavonoids from leaves of *Machaerium acutifolium* by DI-ESI-MS/MS. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 103765, 2022.
- CHANSRINIYOM, C. et al. Tandem mass spectrometry of aqueous extract from *Ficus dubia* sap and its cell-based assessments for use as a skin antioxidant. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 16899, 2021.
- COSTA, J. C. et al. Controle biológico de vassoura de bruxa do cacauzeiro na Bahia, Brasil. BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). *Biocontrole de doenças de plantas: Uso e perspectivas*. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2009. p. 245-266.
- COSTA, N. V. et al. Métodos de controle de plantas daninhas em sistemas orgânicos: breve revisão. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 1, p. 25-44, 2018.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

DE CAMARGO, A. C. et al. Do Flavonoids from Durum Wheat Contribute to Its Bioactive Properties? A Prospective Study. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 463, 2021.

DE CARVALHO, A. T. et al. Ethnopharmacology of Fruit Plants: A Literature Review on the Toxicological, Phytochemical, Cultural Aspects, and a Mechanistic Approach to the Pharmacological Effects of Four Widely Used Species. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3879, 2020.

DE SOUZA, L. M. et al. Structural Characterization and Anti-HSV-1 and HSV-2 Activity of Glycolipids from the Marine Algae *Osmundaria obtusiloba* Isolated from Southeastern Brazilian Coast. **Marine Drugs**, v. 10, n. 12, p. 918–931, 2012.

DE SOUZA, L. P. Características epidemiológicas e clínicas de vítimas intoxicadas pelo herbicida Paraquat no cone sul da Amazônia Legal-Brasil. **InterAmerican Journal of Medicine and Health**, v. 4, 2021.

DEMARTELAERE, A. C. F. et al. Danos causados ao meio ambiente, animais e ao homem com a utilização de agrotóxico: revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 94668–94695, 2021.

DIAS, L. P. et al. *Machaerium acutifolium* lectin alters membrane structure and induces ROS production in *Candida parapsilosis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 19–25, 2020.

DIAS, P. P. Controle Biológico de Fitopatógenos de Solo por Meio de Isolados de Fungos do Gênero *Trichoderma* e sua Contribuição no Crescimento de Plantas. 2011. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal rural do Rio de Janeiro –Instituto de Agronomia, Rio de Janeiro, 2011.

DÍAZ L., et. al. Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium floribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. **Revista Peruana de Biología**. v.18, p.153–158, 2011.

EL-NAHHAL, Y. Toxicity of some aquatic pollutants to fish. **Environmental monitoring and assessment**, v. 190, p. 1-15, 2018.

EL-SAYED, M. A. et al. Phytoconstituents, LC-ESI-MS Profile, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Citrus x limon* L. Burm. f. Cultivar Variegated Pink Lemon. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 4, p. 375, 2017.

FAROOQ, N.; ABBAS, T.; TANVEER, A.; JABRAN, K. Allelopathy for Weed Management. **Co-Evol. Second. Metab.**, p. 505–519, 2020.

FERREIRA, G. M. **Caracterização fitoquímica de frações enriquecidas com flavonoides e proantocianidinas por CLUE-DAD-ESI/EM de espécies medicinais do gênero *Ouratea***. 2018. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

FERRERES, F. et al. Leaves and stem bark from *Allophylus africanus* P. Beauv.: An approach to anti-inflammatory properties and characterization of their flavonoid profile. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 430–438, 2018.

FERRERES, F. et al. Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). **Phytochemical Analysis**, v. 14, n. 6, p. 352–359, 2003.

FILARDI, F.L.R.; CARDOSO, D.B.O.S.; LIMA, H.C. *Machaerium* in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB29759>. Acesso em: 08 abr. 2022.

FLORA DO BRASIL – Re flora: Flora e Funga do Brasil. *Machaerium* Pers. 2020. Disponível em: <https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB23055>. Acesso em: 07 abr. 2022.

GENG, P. et al. Comprehensive characterization of C-glycosyl flavones in wheat (*Triticum aestivum* L.) germ using UPLC-PDA-ESI/HRMS n and mass defect filtering. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 51, n. 10, p. 914–930, 2016.

GHAREEB, M. et al. HPLC-DAD-ESI-MS/MS characterization of bioactive secondary metabolites from *Strelitzia nicolai* leaf extracts and their antioxidant and anticancer activities *In vitro*. **Pharmacognosy Research**, v. 10, n. 4, p. 368, 2018.

GHOSH, D.; MONDAL, S.; RAMAKRISHNA, K. Spectroscopic Characterization of Phytoconstituents Isolated From A Rare Mangrove *Aegialitis rotundifolia* Roxb., Leaves And Evaluation Of Antimicrobial Activity Of The Crude Extract. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 12, n. 9, p. 220-224, 2019.

GU, D. et al. Characterization and identification of chemical compositions in the extract of *Artemisia rupestris* L. by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, n. 1, p. 83–100, 2012.

HAN, J. et al. Analysis of multiple constituents in a Chinese herbal preparation Shuang-Huang-Lian oral liquid by HPLC-DAD-ESI-MSn. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 2, p. 430–438, 2007.

HERNANDEZ, J. et al. Energy resolved mass spectrometry of chlorogenic acids and its application to isomer quantification by direct infusion tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 4, p. 406–412, 2018.

IBAMA – Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2022. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Boletim Anual 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>. Acesso em: 28 fev. 2023.

INBARAJ, B.S, et al. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC–DAD–ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n.3, p. 549-556, 2010.

KNOGGE, W. Fungal infection of plants. **The Plant Cell**, 1996. vol. 8, p.1711-1722.

KOOLEN, H. H. F. et al. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 467–473, 2013.

KRENCHINSKI, F. H. et al. Allelopathic Potential of ‘*Cymbopogon Citratus*’ Over Beggarticks (*Bidens* sp.) Germination. **AJ Crop Sci.**, v. 11, n. 3, p. 277-283, 2017.

LI, H. et al. Screening and structural characterization of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MS<sup>n</sup> and SORI-CID FTICR MS. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 8, p. 1496–1503, 2009.

LIANG, Z. et al. Identification of flavonoids in *Dendrobium huoshanense* and comparison with those in allied species of *Dendrobium* by TLC, HPLC and HPLC coupled with electrospray ionization multi-stage tandem MS analyses. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 5, p. 1088-1104, 2019.

LIMA, T. ODS 2 “Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável”. In: MENEZES, H. R. *Os objetivos do desenvolvimento sustentável e as relações internacionais*. Editora UFPB. João Pessoa, 2019. p. 43-62.

LIN, L.-Z.; HARNLY, J. M. Identification of Hydroxycinnamoylquinic Acids of Arnica Flowers and Burdock Roots Using a Standardized LC-DAD-ESI/MS Profiling Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10105–10114, 2008.

LIN, L.-Z. et al. Profiling of Glucosinolates and Flavonoids in *Rorippa indica* (Linn.) Hiern. (Cruciferae) by UHPLC-PDA-ESI/HRMS n. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 26, p. 6118–6129, 2014.

LIRA, S. M. et al. Metabolic profile of pitaya (*Hylocereus polyrhizus* (F.A.C. Weber) Britton & Rose) by UPLC-QTOF-MS<sup>E</sup> and assessment of its toxicity and anxiolytic-like effect in adult zebrafish. **Food Research International**, v. 127, p. 108701, 2020.

LIU, Y. et al. Acyl Quinic Acid Derivatives Screened Out from *Carissa spinarum* by SOD-Affinity Ultrafiltration LC–MS and Their Antioxidative and Hepatoprotective Activities. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1302, 2021.

LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. et al. HPLC-ESI-MS<sup>n</sup> characterization of phenolic compounds, terpenoid saponins, and other minor compounds in *Bituminaria bituminosa*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 80–90, 2015.

LOPES, J. A. et al. *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld Alleviates Acute Pain and Inflammation: Potential Mechanisms of Action. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 590, 2020.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

LOPES-FERREIRA, M. et al. O Modelo Zebrafish e sua Contribuição ao Meio Ambiente. In: **RECURSO ÁGUA - Tecnologias e pesquisas para o uso e a conservação de ecossistemas aquáticos**. Editora Cubo, 2021. p. 188–219.

MADEIRA, P. J. A.; BORGES, C. M.; FLORÊNCIO, M. H. Electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric and semi-empirical calculations study



of five isoflavone aglycones. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 23, p. 3432–3440, 2010.

MAGOZWI, D. K. et al. Flavonoids from the Genus *Euphorbia*: Isolation, Structure, Pharmacological Activities and Structure–Activity Relationships. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 5, p. 428, 2021. DOI:10.3390/ph14050428

MARTÍNEZ, R., et al. Acute and long-term metabolic consequences of early developmental Bisphenol A exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 256, p. 127080, 2020.

MASIKE, K. et al. Highlighting mass spectrometric fragmentation differences and similarities between hydroxycinnamoyl-quinic acids and hydroxycinnamoyl-isocitric acids. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 29, 2017.

MATTHEWS, G. et al. Status of Legislation and Regulatory Control of Public Health Pesticides in Countries Endemic with or at Risk of Major Vector-Borne Diseases. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 11, p. 1517–1522, 2011.

MELO, S. J. et al. *Machaerium acutifolium* compounds with larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Pest Management Science**, v. 77, n. 3, p. 1444–1451, 14 mar. 2021. DOI:10.1002/ps.6163.

MENEZES, H. R. Apresentando os objetivos de desenvolvimento sustentável. In: MENEZES, H. R. *Os objetivos do desenvolvimento sustentável e as relações internacionais*. Editora UFPB. João Pessoa, 2019. p. 11-19, 2019.

MENEZES, H.Z., BORGES, L.C., PRANDI, D. ODS 3 “Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todas e todos, em todas as idades”. In: MENEZES, H. R. *Os objetivos do desenvolvimento sustentável e as relações internacionais*. Editora UFPB. João Pessoa, 2019. p. 63-78.

MIGLIATO, K. F. et al. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Szygium cumini* (L.) skeels. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 695–699, 2011.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16240–16265, 2014.

MODARRESI CHAHARDEHI, A.; ARSAD, H.; LIM, V. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1345, 2020.

MONDIN, C.A.; NAKAJIMA, J.N.; BRINGEL JR., J.B. A. 2015 *Bidens* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB103749>. Acesso em: 04 ago. 2023.

MORAES, R. F. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Texto para Discussão, Brasília, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2019.

MORANDI, M. A. B. & BETTIOL, W. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: MORANDI, M. A. B. & BETTIOL, W. Ed(s). *Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas*. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 2009. 1ªed., p. 7-14.

MOREIRA, H. M. ODS 12 “Tomar medidas urgentes para combater a mudança do clima e seus impactos” (ODS 12, ODS 14, ODS 15). In: MENEZES, H. R. *Os objetivos do desenvolvimento sustentável e as relações internacionais*. Editora UFPB. João Pessoa, 2019. p. 235-257.

MUHAMMAD, I. et al. Antimicrobial Constituents from *Machaerium* Pers.: Inhibitory Activities and Synergism of Machaeriols and Machaeridiols against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*, and Permeabilized Gram-Negative Pathogen. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 6000, 2020.

NASCIMENTO, Y. M. et al. Rapid Characterization of Triterpene Saponins from *Zornia brasiliensis* by HPLC-ESI-MS/MS. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2519, 2019.

NEGRI, G.; TABACH, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 6, p. 851–860, 2013.

NOVAES, P.; TORRES, P. B.; DOS SANTOS, D. Y. A. C. Biological activities of Annonaceae species extracts from Cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 1, p. 131–137, 2016.

OECD (2019), **Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>. Acesso em: 10 abr. 2023.

OLLIS, W. D. et al. Neoflavonoids and the cinnamylphenol kuhlmannistyrene from *Machaerium kuhlmannii* and *M. nictitans*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 8, p. 1383–1388, 1978.

OLLIS, W. D. et al. New neoflavanoids from *Machaerium kuhlmannii* and *Machaerium nictitans* and the recognition of a new neoflavanoid type, the neoflavenes. **Chemical Communications (London)**, n. 22, p. 1392, 1968.

OZAROWSKI, M. et al. Comparison of bioactive compounds content in leaf extracts of *Passiflora incarnata*, *P. caerulea* and *P. alata* and *in vitro* cytotoxic potential on leukemia cell lines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, n. 2, p. 179–191, 2018.

PASCALE, R. et al. Profiling of quercetin glycosides and acyl glycosides in sun-dried peperoni di Senise peppers (*Capsicum annum* L.) by a combination of LC-ESI(-)-MS/MS and polarity prediction in reversed-phase separations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 12, p. 3005–3015, 2020.

PATI, S. et al. Simultaneous separation and identification of oligomeric procyanidins and anthocyanin-derived pigments in raw red wine by HPLC-UV-ESI-MS<sup>n</sup>. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, n. 7, p. 861–871, 2006.

PATRÓN-GONZÁLEZ, D.; RIOS, M. Y. Monoterpene-stilbenes and other constituents from *Machaerium isadelphum*. **Phytochemistry Letters**, v. 45, p. 161–167, 2021.

PAUL, M. et al. A Thin-layer Chromatography Method for the Identification of Three Different Olibanum Resins (*Boswellia serrata*, *Boswellia papyrifera* and *Boswellia carterii*, respectively, *Boswellia sacra*). **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 2, p. 184–189, 2012.

PEREIRA, P. et al. HPLC/MS identification of the polyphenols present in an extract of *Myrtus communis* L. obtained by supercritical fluid extraction. **Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 14, n. 2, p. 195–203, 2017.

PÉREZ, A. J. et al. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Trifolium argutum* Sol. and their phytotoxic evaluation. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 165–170, 2015.

PIEROBON, F. **Avaliação do potencial bioherbicida de extratos de canjarana (*Cabralea canjerana* (Vell.) Mart.)**. 2017. 63f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2017.

PIRES, N.M; OLIVEIRA, V.R. Alelopatia. In: OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Omnipax, Curitiba, p. 95-123, 2011.

POLIDO, C. DO A.; SARTORI, Â. L. B. O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae) no Pantanal Brasileiro. **Rodriguésia**, v. 58, n. 2, p. 313–329, 2007.

POLIDO, C. D. A.; SARTORI, A. L. B. *Machaerium* (Leguminosae, Papilionoideae, Dalbergieae) nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguesia**. 62 (1):107–122, 2011.

POLLIER, J. et al. Metabolite Profiling of Triterpene Saponins in *Medicago truncatula* Hairy Roots by Liquid Chromatography Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1462–1476, 2011.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília Embrapa, p. 175-176, 1994.

POVH, J.A. et al. Atividade alelopática de *Machaerium acutifolium* Vog. na germinação de *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, supl. 2, p.447-449, 2007.

PRISTA, L.N. Tecnologia farmacêutica. V I e II, 5° ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

QUEIROZ, J. R. G. et al. Eficiência da aplicação da mistura de glyphosate com saflufenacil sobre plantas de *Brachiaria decumbens*. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 13, n. 1, p. 1, 2014.

QIONG, P. et al. Quinclorac Resistance in *Echinochloa crus-galli* from China. **Rice Science**, v. 26, n. 5, p. 300–308, 2019.

RASLAN, M. et al. Metabolomic profiling of *Sansevieria trifasciata* hort ex. Prain leaves and roots by HPLC-PAD-ESI/MS and its hepatoprotective effect via activation of the NRF2/ARE signaling pathway in an experimentally induced liver fibrosis rat model. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 6647-6671, 2021.

RIBEIRO, D. L. et al. Chemical and biological characterisation of *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld: absence of cytotoxicity and mutagenicity and possible chemopreventive potential. **Mutagenesis**, v. 31, n. 2, p. 147–160, 2016.

RIBEIRO, J. P. O. et al. Efeito alelopático do extrato aquoso das folhas de *Callistemon viminalis* (Sol. ex Gaertn.) G.Don sobre a germinação de picão-preto (*Bidens pilosa* L.). **Revista Fitos**, v. 13, n. 4, p. 270–277, 2019.

- RODRIGUES, E. et al. Agrotóxicos no Brasil: reflexões sobre seu uso e regulamentação. In: **Open Science Research III**. [s.l.] Editora Científica Digital, v. 3, n. 1, p. 443–449, 2022.
- RODRIGUES, L. B. et al. Impact of the glyphosate-based commercial herbicide, its components and its metabolite AMPA on non-target aquatic organisms. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 94–101, 2019.
- RORIZ, C. L. et al. *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. **Food Research International**, v. 62, p. 684–693, 2014.
- SALOMÃO, P. E. A.; FERRO, A. M. S.; RUAS, W. F. Herbicidas no Brasil: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 2, p. e32921990, 2020.
- SANNOMIYA, M. et al. Química e Avaliação das Atividades Anti-Inflamatória, Antiúlcera e Antimicrobiana: *Machaerium eriocarpum* BENTH. **Produção e Controle de Produtos Naturais 2**, p. 47–57, 2020.
- SANTOS, R. S. et al. Phytochemical prospecting, bixin content and allelopathic activity of *Bixa orellana* L. **Brazilian Journal of Science**, v. 1, n. 12, p. 96–107, 2022.
- SANTOS, R. G. et al. *Machaerium opacum* Vogel (Fabaceae): phytochemical study and toxicity to *Atta sexdens* Linnaeus (Hymenoptera: Formicidae). **Natural Product Research**, p. 1–4, 2021.
- SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. M. Flavonóides *O*-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 321-325, 2005.
- SARTORI, Â. L. B.; TOZZI, A. M. G. A. As espécies de *Machaerium* Pers. (Leguminosae - Papilionoideae - Dalbergieae) ocorrentes no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, n. 3, 1998.
- SEO, E.-K. et al. Macharistol, a New Cytotoxic Cinnamylphenol from the Stems of *Machaerium aristulatum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 11, p. 1483–1485, 2001.
- SILVA, A. C. A. et al. The poison is on the table: an analysis of the pesticides present in the food of Brazilians. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, 2021.
- SILVA, A. V. F. et al. Perfil fitoquímico, doseamento de fenóis, taninos, flavonoides totais, atividade antimicrobiana e antioxidante do palmito do pau-cardoso *Cyathea atrovirens*. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 1525–1535, 2020.
- SILVA, J. et al. Alelopatia de *Camelina sativa* Boiss. (Brassicaceae) sobre a germinação e desenvolvimento inicial de *Bidens pilosa* (L.) e *Glycine max* (L.) Merr. **Biotemas**, v. 24, n. 4, 2011.
- SILVA, L. J. da. **Controle biológico de *Botrytis cinerea* em pós-colheita de morango (*Fragaria x ananassa*) por linhagem *Streptomyces araujoniae* sp.** 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2013.

SIMIRGIOTIS, M. et al. Antioxidant Capacities and Analysis of Phenolic Compounds in Three Endemic Nolana Species by HPLC-PDA-ESI-MS. **Molecules**, v. 20, n. 6, p. 11490–11507, 2015.

SINCLAIR, J.B. Control of seed-borne pathogens and diseases of soybean seeds and seedlings. *Pesticide Science*, vol. 37, p. 15-19, 2003.

SONG, Y. et al. A capillary liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for the quantification of  $\gamma$ -aminobutyric acid in human plasma and cerebrospinal fluid. **Journal of Chromatography B**, v. 814, n. 2, p. 295–302, 2005.

SOUZA, M. et al. Phenolic Compounds with Allelopathic Potential of *Secale cereale* L. and *Raphanus sativus* L. Grown Under an Agroecological No-Tillage System. **Planta Daninha**, v. 37, p. e019193842, 2019.

STOCHMAL, A. et al. TLC of Triterpenes (Including Saponins). In: M. WAKSMUNDZKA-HAJNOS, J. SHERMA, T. K. (Ed.). **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. 1. ed. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. p. 519–542, 2008.

TAHIRA, L. S. et al. Phytotoxic action of *Machaerium Amplum* Benth. leaves extract. **International Journal of Agriculture and Environmental Research**, v. 08, n. 01, p. 46–62, 2022.

TAHIRA, L. S. et al. The lupeol content in *Machaerium* species by HPLC-APCI-MS/MS and the allelopathic action. **Journal of Horticulture and Forestry**, v. 13, n. 2, p. 44–50, 2021a.

TAHIRA, L.S. **Estudo químico e fitotóxico do extrato hidroetanólico das folhas de *Machaerium amplum* Benth.** 2021. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021b.

TANGERINA, M. M. P. **Extratos padronizados para o tratamento de doenças crônicas: *Machaerium hirtium*.** 2012. 83f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2012.

TEIXEIRA, F. M. et al. Oral treatments with a flavonoid-enriched fraction from *Cecropia hololeuca* and with rutin reduce articular pain and inflammation in murine zymosan-induced arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, p. 112841, 2020.

UNITED NATIONS (UN). **Sustainable development goals**. Take action for the sustainable Development goals. Disponível em: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

VALLVERDÚ-QUERALT, A. et al. Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 24, n. 20, p. 2986–2992, 22 set. 2010.

VASCONCELOS, C. F. B. et al. Chronic toxicological study of the stem bark aqueous extract from *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. **Biomedical and Biopharmaceutical Research Journal**, v. 17, n. 2, p. 1–17, 2020.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer, Ed. 2<sup>o</sup>, p. 384, 1996.

WALLER, G. R.; JURZYSTA, M.; THORNE, R. L. Z. Allelopathic activity of root saponins from alfalfa (*Medicago saliva* L.) on weeds and wheat. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 34, p. 1-11, 1993.

WANG, L. et al. The toxic effect of bisphenol AF and nanoplastic coexposure in parental and offspring generation zebrafish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 251, p. 114565, 2023.

WANG, Y. et al. Identification of C-glycosyl flavones by high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry and quantification of five main C-glycosyl flavones in *Flickingeria fimbriata*. **BMC Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 94, 2019.

WFO (2022). THE WORD FLORA ONLINE: *Machaerium acutifolium* Vogel. Disponível em: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000186947>. Acesso em: 17 abr. 2022.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Exposure to highly hazardous pesticides: a major public health concern. Geneva, 2019.

WU, C. et al. Characteristic fingerprint analysis of *Dendrobium huoshanense* by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 8, n. 18, p. 3802–3808, 2016.

ZHAO, C. et al. Hepatotoxicity evaluation of *Euphorbia kansui* on zebrafish larvae *in vivo*. **Phytomedicine**, v. 62, p. 152959, 2019.

ZHUAN-HONG, L. et al. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC–ESI–QTOF–MS–MS. **Journal of Chromatographic Science**, v. 54, n. 5, p. 805–810, 2016.

ZHU, L. et al. DNA damage and effects on glutathione-S-transferase activity induced by atrazine exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Toxicology**, v. 26, n. 5, p. 480–488, 2011.