



**Caracterização química e avaliação da atividade biológica do extrato da raiz da *Zanha  
golungensis* (Sapindaceae).**

**Issa Munateca Horta**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para  
obtenção do Grau de Mestre em Produtos Naturais e Bioaplicações*

Orientado por

**Manuel Ricardo Costa Calhela**

**Custodio Miguel Lobo de Freitas Roriz**

**Bragança**

**2024**

## **Agradecimentos**

Deus em primeiro lugar pela saúde que tem me proporcionado e que me conduziu durante todo esse processo da minha formação.

Ao meu prezado orientador Dr. Ricardo Calhella, que me orientou ao longo deste trabalho, teve a paciência, compreensão, dedicação, ensinamentos e incentivo ao longo deste processo.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Custodio Miguel Lobo de Freitas Roriz, pelos ensinamentos e apoio nas questões que sempre coloquei durante a realização do ensaio antioxidante e na interpretação dos resultados.

À Doutora Tayse Ferreira Ferreira da Silveira, pela realização dos ensaios de composto fenólicos do extrato em análise. À Yara Goulart de Aquino, doutoranda da universidade de Salamanca (Espanha), pela ajuda na realização da atividade antimicrobiana do extrato em estudo. À Ana Borges estudante de doutoramento, pela colaboração na realização dos ensaios antiproliferativo e anti-inflamatórios.

Ao meu colega, amigo Neivaldo Murrube, pela ajuda incondicional prestado durante todo esse período de formação, que Deus lhe retribui o melhor.

A Faculdade de Ciências de Saúde, em particular Dr. Alarquia Ali Saide, pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Instituto Politécnico de Braganca em especial a Escola Superior Agraria pela oportunidade de realização do mestrado.

À toda minha família, os meus pais, Munateca Horta e Muahamisse Muze, aos meus irmãos: Abacar Amisse, Alima Munateca, Abdul e Nurdine, palavras encorajadoras nunca faltaram durante este período. Minha amada esposa, Fidencia Issufo Cabral Massaina, pela compreensão, paciência, incentivo, que cuidou dos nossos filhos durante esse período, aos meus queridos filhos: Amina Issa Munateca, Atija Issa Munateca, Rucaia Issa Munateca e Issufo Issa Munateca, o sorriso nunca lhes faltou e sempre me transmitiram energias positivas para seguir em frente e não desistir.

Aos meus amigos: Adelio Antonio Damas, Suleimane Ossufo, Orlando Neamite, Fulgêncio Benjamim e Ribeiro Vasco Ribeiro, pelo apoio prestado.

Aos meus companheiros da Domus, Armando Pedro Massaua, Edson Vilanculo, Ezar Alfredo, Angela Malovete, pelos belos momentos que partilhamos.

## Lista de símbolos, abreviaturas, siglas

ABTS	2,2-ácido azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
AGS	Linha celular de carcinoma gástrico
BHT	Hidroxitolueno butilado
C3	Carbono 3
C6	Carbono 6
CaCo-2	Linha celular de adenocarcinoma colorretal
CMB	Concentração mínima Bactericida
CMF	Concentração mínima fungicida
CMI	Concentração mínima inibitória
DAD	Detetor de dióxido
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EC <sub>50</sub>	Concentração da amostra que corresponde 50% da atividade
ESI	Ionização por electrospray
ESI/MS	Espectrometria de massa com ionização por electrospray
Fe	Ferro
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato de ferro
FRAP	Capacidade de redução férrica do plasma
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD-ESI/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de massa
IC <sub>50</sub>	Concentração responsável por 50% de atividade
IG <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
IIAM	Instituto de Investigação Agrária de Moçambique
IL-1 $\beta$	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
INT	Iodo nitrotetrazolium
LPS	Lipopolissacarídeo
MCF-7	Linha celular de adenocarcinoma da mama
MPO	Mieloperoxidase
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Espectrometria de massa
MRSA	<i>Stafilococcus aureus</i> resistentes a meticilina
m/z	Ião molecular
NCI-H460	Linha celular de adenocarcinoma do pulmão
NF-K $\beta$	Factor Nuclear kappa B
nm	Nanometro
NO	Óxido nítrico
PDA	Detetor de matriz de dióxidos
RAW 264.7	linha celular de macrófagos de rato
RPMI	Meio de cultura para células animais
Rt	Tempo de retenção

SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforrodamina B
STAT3	Transdutores de sinal e activadores de transição
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TNF- $\alpha$	Factor de necrose tumoral alfa
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)-propano-1,3-diol
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
TSB	Caldo de soja Trípico
UV	Ultravioleta
Vero	Rim de macaco verde africano
$\lambda_{max}$	Comprimentos de onda de absorção máxima na região visível

Índice	
Agradecimentos .....	ii
Lista de símbolos, abreviaturas, siglas.....	iii
Índice de figuras.....	vii
Índice de tabelas.....	viii
Resumo .....	ix
Abstract.....	x
1. Introdução.....	1
1.1 Matrizes naturais como fonte de moléculas bioativas.....	1
1.2 Caracterização da família Sapindaceae.....	4
1.3 Do género <i>Zanha</i> .....	5
1.4. Da espécie <i>Zanha golungensis</i> .....	6
1.5 Aplicações etnomedicinais da planta (das diversas partes em especial da raiz) .....	8
1.6 Composição química da <i>Z. golungensis</i> .....	9
1.7 Propriedades bioativas da <i>Z. golungensis</i> .....	11
2. Objetivos.....	
2.1 Objetivo Geral.....	12
2.2 Objetivo Específico .....	12
3. Materiais e Métodos .....	13
3.1.1 Recolha e identificação do material vegetal.....	13
3.1.2 Preparação da amostra .....	13
3.1.3 Extração .....	14
3.2 Compostos fenólicos .....	15
3.3. Atividade Antimicrobiana e Antifúngica.....	17
3.3.1 Atividade Antibacteriana.....	17
3.3.2 Atividade Antifúngica .....	19
3.4. Atividade Anti-inflamatória.....	20
3.5. Atividade Citotóxica.....	21
3.6. Atividade antioxidante.....	22
3.6.1. Inibição da peroxidação lipídica usando substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	22
4. Resultados e discussão.....	13

4.1. Identificação dos Compostos Fenólicos:.....	24
4.2. Atividade antimicrobiana e antifúngica.....	29
4.3. Atividade anti-inflamatória .....	32
4.4. Atividade citotóxica.....	33
4.5. Atividade antioxidante.....	35
5. Conclusão .....	13
6. Referências Bibliográficas.....	13

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Regiões da África onde predomina <i>Z. golungensis</i> .....	7
<b>Figura 2:</b> 1 flores e folhas, 2 frutos da <i>Z. golungensis</i> .....	8
<b>Figura 3:</b> Estrutura da aglicona das 6 saponinas da <i>Z. golungensis</i> .....	11
<b>Figura 4:</b> Secagem das folhas para identificação do nome científico da planta .....	13
<b>Figura 8:</b> Filtração do extrato da raiz da <i>Z. golungensis</i> .....	15
<b>Figura 10:</b> Estrutura básica de flavonoide .....	16
<b>Figura 11:</b> Microplaca usada no ensaio de repicagem das bactérias.....	18
<b>Figura 12:</b> Repicagem das bactérias na placa com meio do agar.....	18
<b>Figura 13:</b> Leitura do resultado das bactérias na microplaca. ....	18
<b>Figura 14:</b> Repicagem dos fungos na placa com meio do Malt agar.....	19
<b>Figura 15:</b> Leitura do resultado dos fungos na microplaca.....	19
<b>Figura 16:</b> Microplacas usadas em ensaio de citotoxicidade.....	22
<b>Figura 17:</b> Tubos de ensaios usados no ensaio de TBARS.....	23
<b>Figura 18:</b> Microplaca usada no ensaio de TBARS. ....	23
<b>Figura 19:</b> Leitura dos resultados no leitor de microplaca. ....	23
<b>Figura 20:</b> Estrutura química de crisoeriol. ....	24
<b>Figura 21:</b> Metilação da Luteolina em crisoeriol.....	24
<b>Figura 22:</b> Cromatograma a 370 nm, com os tempo de retenção dos compostos detetados. ....	25
<b>Figura 23:</b> Cromatograma a 370 nm, os números dos picos dos compostos tentativamente identificados.....	27
<b>Figura 24:</b> Estrutura química de criseorol glicosilado (criseorol 6-O-acetil-4'-β-D-glicosideo). .....	28

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Classificação taxonómica da <i>Z. golungensis</i> .....	6
<b>Tabela 2:</b> Uso medicinal da espécie da <i>Z. golungensis</i> .....	9
<b>Tabela 3:</b> Condições cromatográficas para os compostos fenólicos .....	16
<b>Tabela 4:</b> Cromatografia de compostos fenólicos identificados no extrato da raiz da <i>Z. golungensis</i> (media $\pm$ DP).....	26
<b>Tabela 5:</b> Atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir de <i>Z. golungensis</i> e os controlos positivos utilizados .....	30
<b>Tabela 6:</b> Atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir de <i>Z. golungensis</i> e o controlo positivo utilizado. ....	32
<b>Tabela 7:</b> Atividade anti-inflamatória do extrato da raiz da <i>Z. golungensis</i> .....	33
<b>Tabela 8:</b> Atividade citotóxica do extrato da raiz da <i>Z. golungensis</i> . ....	34
<b>Tabela 9:</b> Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólico obtidos a partir de <i>Z. golungensis</i> . .....	35

## Resumo

Desde os tempos antigos, o ser humano recorreu sempre aos produtos naturais como principal fonte primordial para a prevenção e tratamento de várias doenças. Estudos mostram que, nos países em desenvolvimento, 80% da população mundial recorre à medicina tradicional por ser considerada mais acessível, segura, eficaz e por apresentar menos reações adversas.

Em África, *Zanha golungensis* é utilizada tanto para fins alimentares como medicinais, nomeadamente no tratamento de várias enfermidades, como a malária, diarreia, dores de dentes, entorses, problemas respiratórios. O objectivo deste trabalho centra-se na caracterização do perfil químico e avaliação da atividade biológica do extrato da raiz da *Z. golungensis*, usada no tratamento da asma, segundo os praticantes da medicina tradicional em Nampula, na zona norte de Moçambique.

Para a caracterização dos compostos fenólicos foi usado o método HPLC-DAD-ESI/MS, onde foram identificados três compostos fenólicos com a mesma estrutura principal de crisoeriol, nomeadamente Crisoeriol-rhamnosyl-dirutinosideo, crisoeriol-dirhamnosyl-rutinosideo e crisoeriol-rhamnosyl-rutinosideo.

Verificou-se que o extrato apresentou atividade com a CMI de 10 mg/mL frente as bactérias Gram-negativo de origem clínica, e de origem alimentar, com CMI de 5mg/mL frente a *Escherichia coli* e CMI de 10mg/mL frente *Pseudomona aeruginosa* e *Salmonella enterocolítica*.

No que respeita à capacidade anti-inflamatória, o extrato apresentou um IC<sub>50</sub> de 231,76±8,44 µg/mL, inibindo a produção de óxido nítrico (NO). Em relação à atividade antiproliferativa, o extrato demonstrou capacidade de inibir a proliferação de todas as linhas celulares tumorais em estudo. Contudo, o extrato não apresentou atividade antiproliferativa frente as linhas celulares não tumorais Vero.

No que concerne à atividade antioxidante, o extrato revelou capacidade de inibir a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Os resultados obtidos indicam que a raiz da *Z. golungensis* possui atividade biológicas, o que comprova os seus efeitos benéficos no contexto da medicina tradicional em Moçambique.

## Abstract

Since ancient times, human beings have resorted to natural products as the primary source for the prevention and treatment of various diseases. Studies show that, in developing countries, 80% of the world's population resorts to traditional medicine because it is considered more accessible, safe, effective and presents fewer adverse reactions.

In Africa, *Zanha golungensis* is used for both food and medicinal purposes, particularly in treating various illnesses, such as malaria, diarrhea, toothaches, sprains, and respiratory problems. The objective of this work focuses on characterizing the chemical profile and evaluating the biological activity of *Z. golungensis* root extract, used to treat asthma, according to traditional medicine practitioners in Nampula, in the north of Mozambique.

For the characterization of phenolic compounds, the HPLC-DAD-ESI/MS method was used, where three phenolic compounds with the same main structure of chrysoeriol were identified, namely Chrysoeriol-rhamnosyl-dirutinoside, chrysoeriol-dirhamnosyl-rutinoside and chrysoeriol-rhamnosyl-rutinoside.

It was found that the extract showed activity with a MIC of 10 mg/mL against Gram-negative bacteria of clinical origin and food origin, with a MIC of 5 mg/mL against *Escherichia coli* and a MIC of 10 mg/mL against *Pseudomonas aeruginosa* and enterocolitic *Salmonella*.

Regarding anti-inflammatory capacity, the extract presented an  $IC_{50}$  of  $231.76 \pm 8.44$   $\mu\text{g/mL}$ , inhibiting the production of nitric oxide (NO). Regarding antiproliferative activity, the extract demonstrated the ability to inhibit the proliferation of all tumor cell lines under study. However, the extract did not show antiproliferative activity against Vero non-tumor cell lines.

Regarding antioxidant activity, the extract revealed the ability to inhibit the formation of substances reactive to thiobarbituric acid.

The results obtained indicate that the root of *Z. golungensis* has biological activity, which proves its beneficial effects in the context of traditional medicine in Mozambique.

# **1.Introdução**

## **1.1 Matrizes naturais como fonte de moléculas bioativas**

As plantas medicinais têm sido utilizadas como fonte de fitoterápicos no tratamento de diversas doenças ao longo de milhões de anos em todo mundo (Canga et al., 2022). Desde os tempos antigos o ser humano recorre a produtos naturais para a prevenção e tratamento de doenças. Atualmente, esta prática tornou-se uma alternativa promissora no desenvolvimento de novos medicamentos, sendo os produtos naturais considerados, em muitos casos, mais acessíveis, eficazes e seguros, com menos efeitos adversos (Naeem et al., 2022; Qadri et al., 2024). Há um crescente interesse na exploração de compostos bioativos de matrizes vegetais, devido ao seu potencial nutricional, propriedades tecnológicas e capacidade de promover a saúde. (Domínguez et al., 2021)

Os produtos naturais constituem um vasto grupo de compostos químicos produzidos por organismos como bactérias, fungos, vegetais e animais, desempenhando diversas atividades biológicas e efeitos farmacológicos (Rente et al., 2021). Estes compostos são uma fonte importante para a descoberta e desenvolvimento de novos produtos com atividade biológica. Atualmente, há um interesse crescente tanto por parte dos investigadores como de diferentes sectores, farmacêutico, alimentar, cosmético, agrícola e de embalagens, nos quais os produtos naturais são utilizados das mais diversas formas (Ekiert & Szopa, 2020; Rente et al., 2021)

O reino vegetal, com cerca de 350.000 espécies registradas, oferece uma vasta oportunidade para a pesquisa de novas substâncias com propriedades terapêuticas, como alcalóides, terpenóides, compostos fenólicos, saponinas e flavonoides (Naeem et al., 2022), bem como pigmentos, esteroides, taninos. (Mbokane & Moyo, 2022) Produtos naturais de origem vegetal e microbiana desempenham atualmente um papel crucial na pesquisa e desenvolvimento de compostos com potencial terapêutico (Singla & Dubey, 2019).

As plantas medicinais são ricas em substâncias bioativas que possuem várias propriedades, como antioxidante, antimicrobiana, cicatrizante, antidiarreica, analgésica, anti-inflamatória, hepatoprotetora (Sasidharan et al., 2010; Ekiert & Szopa, 2020), anti-stress, estimulante de apetite, imunoestimulante e afrodisíaca, entre outras (Mbokane & Moyo, 2022). Os bioativos dividem-se em dois grupos principais: compostos lipofílicos, como óleos essenciais e carotenoides, extraídos com solventes apolares, e compostos hidrofílicos, como os polifenóis, extraídos com solventes

polares. Estes extratos possuem misturas de fitoquímicos que resultam em diferentes atividades bioativas, podendo exercer efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (Domínguez et al., 2021).

As diversas atividades biológicas dos produtos naturais relacionam-se com as suas estruturas químicas complexas e são geralmente caracterizadas por baixa toxicidade e menos efeitos adversos em comparação com os compostos sintéticos, que estão sujeitos à resistência microbiana e apresentam elevada toxicidade (Sasidharan et al., 2010; Naeem et al., 2022). Fitoquímicos, compostos químicos não essenciais encontrados nas plantas, subdividem-se em seis categorias principais: hidratos de carbono, lípidos, polifenóis, terpenoides, alcaloides e canabinoides. As propriedades biológicas, farmacocinéticas e efeitos terapêuticos dos fitoquímicos puros são investigados para determinar as doses seguras para administração (Rente et al., 2021). Estas características tornam-nos adequados para o desenvolvimento de medicamentos com propriedades farmacológicas, incluindo atividades anticancerígenas (Deng et al., 2020). Estudos indicam que os produtos naturais podem prevenir várias doenças malignas, como o cancro do pulmão, cólon, estômago, esófago e próstata (Kallifatidis et al., 2016).

Os produtos naturais possuem uma vasta gama de atividades biológicas, desde a captura de radicais livres até ações mais complexas, como a indução de apoptose, inibição de metástase, angiogénese e proliferação celular, demonstrando capacidade de eliminar células cancerígenas e inibir enzimas modificadoras do ADN. São considerados candidatos promissores para a quimioprevenção devido aos seus mínimos efeitos adversos (Kallifatidis et al., 2016); (Naeem et al., 2022).

Nos países desenvolvidos, a fitoterapia é considerada uma parte complementar e alternativa da medicina, e têm sido registados avanços significativos no desenvolvimento de novos produtos à base de plantas, cujos extratos são utilizados como medicamentos prescritos (Hlashwayo et al., 2020; Ndhlovu et al., 2023). Contudo, aproximadamente 80% da população mundial ainda recorre à medicina tradicional, e entre 50.000 a 70.000 espécies de plantas são utilizadas para fins medicinais (Reimers et al., 2019; Turpin et al., 2022). Nos países em desenvolvimento, a medicina tradicional é frequentemente a primeira opção de tratamento devido ao seu baixo custo e à limitada disponibilidade de medicamentos sintéticos (Reimers et al., 2019).

Na Austrália, 1.511 espécies de plantas são conhecidas pelas suas propriedades medicinais, sendo que a sua utilização varia entre as comunidades urbanas e rurais. Os nativos são considerados

os principais detentores deste conhecimento, que é transmitido de geração em geração através de histórias, danças, cantos e artes (Turpin et al., 2022). No continente africano, estima-se que 5.400 espécies de plantas medicinais sejam usadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças, afetando milhões de pessoas (Otieno et al., 2015). Na África Subsariana, os produtos naturais desempenham um papel fundamental na sociedade, tanto como fonte de fitoterápicos como de subsistência, sendo uma importante fonte de rendimento (Catarino et al., 2019). Apesar do seu valor cultural e importância na saúde pública, especialmente em áreas rurais, as plantas medicinais africanas carecem de um conhecimento científico aprofundado (Romeiras et al., 2023).

Em alguns países africanos, como a África do Sul, Etiópia e Uganda, os produtos naturais à base de plantas são utilizados para tratar problemas de saúde em crianças, como tosse, dor de estômago, vermes intestinais, dores no peito e diarreia (Ndhlovu et al., 2023). Na Etiópia, cerca de 80% da população rural recorre às plantas medicinais para tratar doenças, devido ao elevado custo dos medicamentos convencionais e ao difícil acesso aos cuidados de saúde (Ceravolo et al., 2021). Em Angola, grande parte das doenças infecciosas e parasitárias é tratada com recurso à medicina tradicional (Canga et al., 2022), e no Malawi, cerca de 33% dos pacientes com problemas oculares recorrem à medicina tradicional (Maregesi et al., 2017). Na Tanzânia, estima-se que 25% das úlceras cornoas resultem da utilização de medicina tradicional, especialmente nas áreas rurais, onde esta prática é comum devido à crença nos seus poderes sobrenaturais (Maregesi et al., 2017).

Em Moçambique, onde cerca de 70% da população vive em áreas rurais, a dependência de produtos naturais é significativa para a sobrevivência (Bruschi et al., 2014; Barbosa et al., 2020). Estima-se que existam cerca de 5.500 espécies de plantas no país, mas apenas 10% são utilizadas com fins medicinais (Barbosa et al., 2020).

Moçambique, com uma vasta biodiversidade de recursos florestais, ainda mantém práticas medicinais empíricas, e faltam estudos fitoquímicos detalhados sobre as plantas medicinais locais. Esta falta de conhecimento sobre os metabólitos secundários limita a compreensão dos seus efeitos biológicos e dos seus possíveis efeitos adversos. Um exemplo é a *Z. golungensis*, amplamente distribuída em Moçambique e em grande parte da África Austral, e utilizada no tratamento de várias doenças. Relatos de praticantes da medicina tradicional em Nampula indicam o uso da raiz desta planta no tratamento da asma. Neste contexto, surge a necessidade urgente de identificar os seus compostos químicos e avaliar as suas atividades biológicas.

## 1.2 Caracterização da família Sapindaceae

A família Sapindaceae conhecida popularmente como saboneteira abrange entre 140 a 150 gêneros e cerca de 1.400 a 2.000 espécies. Esta família inclui plantas de porte variado, desde árvores de médio a grande porte, arbustos até trepadeiras. As plantas da família Sapindaceae predominam em regiões subtropicais e tropicais quentes, sendo a maioria das espécies originária da Ásia. No entanto, algumas podem ser encontradas em outras partes do mundo, incluindo a América do Sul, África e Austrália. Esta família tem recebido crescente atenção devido à sua importância múltipla para a comunidade, não só como fonte de madeira para construção, mas também pelos seus compostos com valor medicinal e os seus frutos de interesse alimentar (Temitope, 2012; Onuminya, & Ogundipe, 2014; Muftaudeen et al., 2023).

Segundo El Mokni & Iamónico, (2023) a família Sapindaceae pode ser dividida em quatro subfamílias: Sapindoideae, Xanthoceroideae, Dodonaeoideae e Hippocastanoideae. Uma característica marcante desta família é a presença de saponinas moderadamente tóxicas nas folhas, sementes e raízes. Os caules apresentam poros difusos, placas de perfuração simples e células de raios sem andares (Nigeria et al., 2021). As folhas são, na sua maioria, paripinadas ou trifolioladas, com arranjo oposto, subposto ou alternado, possuindo pecíolos curtos e bulbosos, sendo algumas trepadeiras dotadas de gavinhas. As flores são geralmente de cor branca cremosa ou branco-rosada, e os frutos, inicialmente verdes, mudam para vermelho ou laranja com o amadurecimento, contendo sementes pretas. A polinização é realizada por agentes como o vento, aves e insetos (Temitope, 2012; Muftaudeen et al., 2023).

Na África, particularmente na Nigéria, a Sapindaceae está representada por 27 gêneros e 47 espécies, que crescem tanto em forma de árvores como de arbustos em florestas (Muftaudeen et al., 2023). Adeyemi et al. (2012) classificaram as plantas desta família em três categorias principais: árvores (como *Aporrhiza*, *Atalaya*, *Blighia*, *Chytranthus*, *Deinbollia*, *Dodonaea*, *Eriocoelum*, *Ganophyllum*, *Lecaniodiscus*, *Lepisanthes*, *Litchi*, *Lychnodiscus*, *Majidea*, *Melicoccus*, *Nephelium*, *Placodiscus*, *Radlkofera*, *Sapindus*, *Schleichera* e *Zanha*), arbustos (*Allophylus*, *Glennia*, *Haplocoelum*, *Harpullia*, *Laccodiscus* e *Pancovia*) e trepadeiras (*Cardiospermum* e *Paullinia*).

As espécies da família Sapindaceae são amplamente reconhecidas na África Ocidental pela sua utilidade para a comunidade, seja como alimentos ou fitoterápicos. Um exemplo notável é o caso

de *Blighia sapida*, cujos frutos não devem ser consumidos verdes devido à toxicidade. No entanto, quando maduros, têm uso alimentar e medicinal. Muitas espécies desta família são reconhecidas pelas suas propriedades medicinais, com efeitos antimaláricos, antioxidantes, anticancerígenos, antimicrobianos, hepatoprotetores, antidiabéticos, anti-inflamatórios, analgésicos, entre outros (Maroyi, 2019b).

Estudos fitoquímicos realizados em membros da família Sapindaceae revelaram a presença de compostos bioativos em concentrações elevadas, como saponinas, polifenóis, taninos, terpenos, flavonóides e catequinas. (Cardoso et al., 2013; Maroyi, 2019a). Estes compostos são responsáveis pelas diversas atividades biológicas associadas a essas plantas.

Um estudo de Ndiaye et al., (2022), realizado no Benim, revelou que todas as partes da planta *Blighia sávida*, incluindo folhas, cascas, frutos e raízes, são amplamente utilizadas pela comunidade para fins alimentares, medicinais e cosméticos. Este uso versátil deve-se à rica composição química da planta e às suas propriedades terapêuticas, como o tratamento de problemas de pele, disenteria e cicatrização (Margaret O. Sofidiya, 2012).

Algumas espécies desta família têm sido extensivamente estudadas pelo seu potencial antimicrobiano e pesticida. Por exemplo, *Serjania erecta* demonstrou atividade antimicrobiana significativa em estudos com extratos de folhas e raízes (Cardoso et al., 2013). Já a espécie *Allophylus africanus* é utilizada na fitoterapia tradicional para o tratamento de diarreia e pneumonia, apresentando atividade contra *Escherichia coli* (Muftaudeen et al., 2023).

Além das propriedades medicinais, algumas espécies de Sapindaceae também apresentam potencial no controlo de pragas. O estudo de Díaz et al., (2014) sobre o extrato etanólico de *Allophylus edulis* demonstrou que ele é eficaz contra insetos como os pulgões (*Myzus persicae*) e o besouro *Epilachna paenulata*, sendo uma alternativa interessante para o controlo de pragas em culturas agrícolas.

### **1.3 Do género Zanha**

A família Sapindaceae é composta por diversos géneros e espécies, entre os quais se destaca o género Zanha, que inclui três espécies principais, *Z. golungensis* Hiern, *Z. africana* (Radlk) Exell e *Z. suaveolens* Capuron. Destas, a espécie *Zanha golungensis* Hiern é a mais comum em toda África (Onuminya et al., 2020; Lemmens & Louppe, 2012).

O nome "Zanha" possivelmente homenageia o professor Karl Hermann Zahn (1865-1940), um botânico e colecionador de plantas medicinais. A *Z. africana*, descoberta em África, é também conhecida pelo nome sinónimo "Dialiopsis africana", sendo popularmente designada em inglês por "velvet-fruited zanha" (Zanha de fruto aveludado).

Embora os frutos de todas as espécies do género *Zanha* sejam considerados fontes alimentares, as suas sementes são venenosas devido à presença de saponinas ácidas, o que desaconselha o seu consumo (Maroyi, 2019a).

**Tabela 1:** Classificação taxonómica da *Z. golungensis*

Reino	<i>Plantae</i>
Divisão	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Subclasse	<i>Rosidae</i>
Ordem	<i>Sapindales</i>
Família	<i>Sapindaceae juss</i>
Género	<i>Zanha Hiern</i>
Espécie	<i>Z. golungensis Hiern</i>
(Temitope Olabisi Adeyemi, 2012)	

#### 1.4. Da espécie *Zanha golungensis*

A *Z. golungensis* é uma planta que cresce em diversas regiões da África, abrangendo ao sul de Moçambique, Zâmbia, Zimbabwe, Angola, estendendo-se ainda pelo Leste Africano em países como Etiópia, Quênia e Senegal (**Figura 1**). Esta planta pode apresentar-se como uma árvore, atingindo entre 6 e 25 metros de altura, ou como um arbusto, particularmente quando cresce em altitudes que variam entre 300 e 1700 metros. O seu habitat é preferencialmente em florestas densas, ricas em recursos hídricos (Lavaud et al., 2015; Onuminya et al., 2020).

O nome "golungensis" tem origem na cidade de Golungo-alto, localizada na Província do Cuanza, no norte de Angola, onde a espécie foi inicialmente identificada. Em inglês, é referida como "Smooth-fruit zanha" (Zanha de frutos lisos), uma vez que os seus frutos e folhas carecem

de pelos. Os frutos da *Z. golungensis* são ovoides, carnudos, de cor laranja brilhante e, tal como as folhas, não possuem pelos (**Figura 2**). A produção destes frutos é abundante, a ponto de muitas vezes dobrar os ramos devido ao seu peso. As folhas são alternadas ou subpostas, de cor verde brilhante, também sem pelos, com extremidades que podem ser afiladas ou arredondadas (Maroyi, 2019b). Esta planta é amplamente utilizada em várias regiões de África, tanto para fins alimentares, como medicinais, ornamentais e de construção (Lavaud et al., 2015) Os frutos frescos da *Z. golungensis* são comestíveis, contendo cerca de 67% de água. Em termos nutricionais, os frutos fornecem 1449kj (347kcal) de energia, 2.1g de proteína, 1.5g de gordura, 3.2g de fibras, minerais como Cálcio (140 mg), Fosforo (60mg) e Ferro (5mg). (Lemmens & Louppe, 2012) No campo da medicina fitoterápica, as folhas e raízes da *Z. golungensis* são amplamente utilizadas em países como a República Democrática do Congo, Togo, Malawi e Uganda, sendo reconhecidas pelas suas propriedades terapêuticas (Maroyi, 2019b).



**Figura 1:** Regiões da África onde predomina *Z. golungensis*

**Fonte:** (Lemmens & Louppe, 2012)



**Figura 2:** 1 flores e folhas, 2 frutos da *Z. golungensis*

**Fonte:** (Lemmens & Louppe, 2012)

### **1.5 Aplicações etnomedicinais da planta (das diversas partes em especial da raiz)**

A planta *Z. golungensis* é amplamente valorizada pela medicina tradicional africana, sendo considerada medicinal em quase todas as suas partes, incluindo as folhas, casca do caule, ramos e, especialmente, as raízes. Estas últimas são as que apresentam as atividades terapêuticas mais evidentes e são amplamente utilizadas no tratamento de uma variedade de condições de saúde. As raízes da *Z. golungensis* são tradicionalmente utilizadas no combate a edema, inchaço, gota e hidropisia (Lavaud et al., 2015).

Adicionalmente, a planta é empregue em tratamentos etnomedicinais para lidar com diversos problemas de saúde que afetam as populações locais. Entre os principais usos estão o alívio de distúrbios durante a gravidez, dores de dentes, inflamações, entorses, e problemas gastrointestinais, respiratórios, cutâneos e até hérnias (Maroyi, 2019b).

Essas aplicações sublinham a importância da *Z. golungensis* na medicina tradicional africana, onde o conhecimento sobre as suas propriedades terapêuticas tem sido transmitido de geração em geração, desempenhando um papel crucial no tratamento de várias enfermidades.

**Tabela 2:** Uso medicinal da espécie da *Z. golungensis*

Uso medicinal	Órgão da planta	País	Referência
Tratamento de feridas	Folhas	Nigéria	(Maroyi, 2019b)
Analgésico, membros quebrados, malária, dores no peito, dor de cabeça, catarro, feridas e úlceras	Casca, folhas	Senegal, Nigéria	(Lemmens & Louppe, 2012); (Margaret O. Sofidiya, 2012)
Abcesso, hérnia, amenorreia,	Raiz	Tanzânia	(Lemmens & Louppe, 2012)
Febre	Galhos folhosos	Tanzânia	(Lemmens & Louppe, 2012)
Febre, convulsões, dor de cabeça	Casca	Tanzânia	(Ruffo et al., 2002)
Convulsões, impotência, vermes intestinais, dor de estomago, hérnia, constipação, doença mental, disenteria.	Raiz	Tanzânia, Angola, Zimbabwe, Moçambique.	(Ruffo et al., 2002)
Tontura, elefantíase	Casca, Raiz	Tanzânia, Zimbabwe	(Maroyi, 2019a)
Edema, hidropisia, inchaço, gota	Casca, raiz, folhas, galhos.	República Democrática de Congo	(Lavaud et al., 2015)

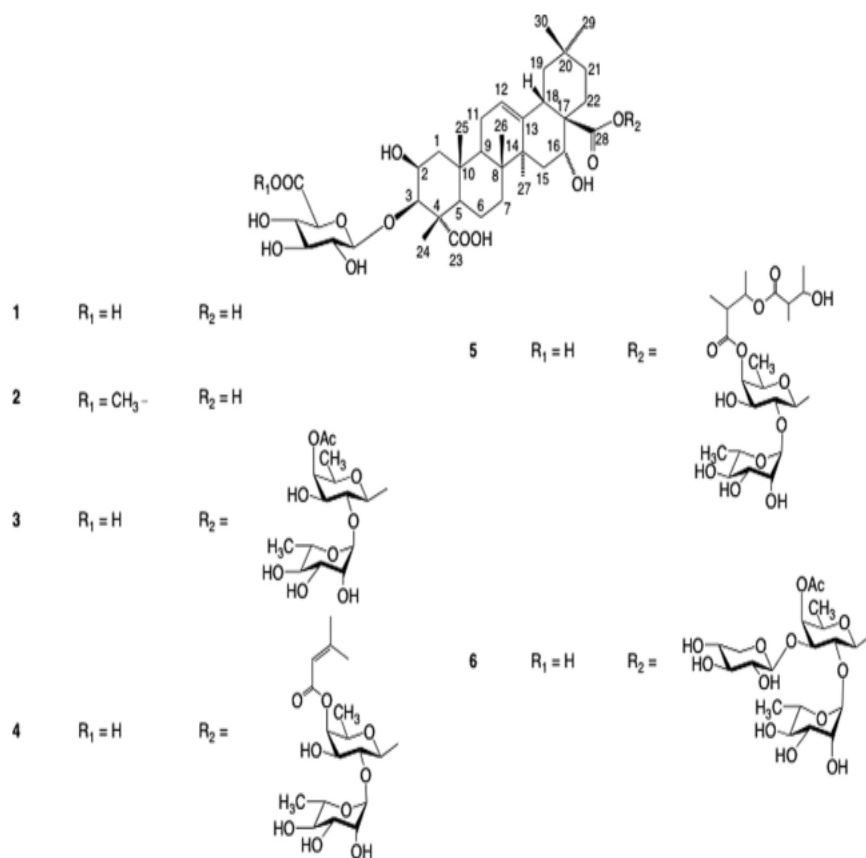
### 1.6 Composição química da *Z. golungensis*

A *Z. golungensis* apresenta uma vasta gama de compostos bioativos que variam conforme a parte da planta analisada, incluindo folhas, casca e raízes. Essas substâncias químicas são responsáveis pelas propriedades terapêuticas da planta e sua ampla utilização em diversas práticas medicinais.

A análise dos extratos aquosos das folhas de *Z. golungensis* revelaram a presença de alcaloides, fenóis, saponinas, açúcares redutores, glicosídeos cardíacos e terpenóides. Em relação às cascas, foram identificados alcaloides, fenóis, saponinas, açúcares redutores e taninos. Quando os extratos etanólicos foram analisados, tanto para as folhas quanto para as cascas, foram encontrados compostos adicionais, incluindo alcalóides, fenóis, flavonóides, taninos, terpenóides, açúcares redutores e glicosídeos. Entre os triterpenóides presentes, destacam-se o ácido zânico, o ácido zânico- $\gamma$ -lactona, a medicagina e a prosapogenina zânghina. Esses compostos têm um papel

fundamental nas propriedades medicinais da planta, como atividades anti-inflamatórias e antioxidantes (Lemmens & Louppe, 2012).

Lavaud et al., (2015) , estudaram, com recurso a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), o extrato metanólico da raiz da *Z. golungensis* e identificaram de seis saponinas (**Figura 3**), em que todas apresentavam ácido zânico como aglicona. Cinco dessas saponinas foram classificadas como novas (zanhasaponinas D-H). Podendo-se destacar: **zanhasaponina D(1)** ácido O- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-zânico; **zanhasaponina E(2)** ácido 3-O-(6-O-metil),  $\beta$ -D-glucuronopiranosil-zânico; **zanhasaponina E(3)** ácido 3-O- $\beta$ -D glucuronopiranosil-28-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1,2)- $\beta$ -D -(4-O-acil-fucopiranosil)] zânico, **zanhasaponina G(4)** 3-O- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-28-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1,2)- $\beta$ -D-(4-O-3,3-dimetil ilacriloil - fucopiranosil]-ácido Zânico, **zanhasaponina H(5)** 3-O- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-28-O-[  $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 ácido,2 )- $\beta$ -D-(4-O-[30-S-hidroxi-20-S-metil-butiroiloxi]-3-S-metil-butiroiloxi)-fucopiranosil]-zânico, **saponina (6)** 3-O- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-28-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1,2)[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1,3)] - $\beta$ -D- (ácido-4-O-acetil fucopiranosil)]-zânico. A hidrólise ácida do extrato revelou a presença de cinco açúcares, a *D*-glucose, *L*-ramnose, *D*-fucose, *D*-glucurónico e *D*-xilose.



**Figura 3:** Estrutura da aglicona das 6 saponinas da *Z. golungensis*

**Fonte:** Lavaud et al., (2015)

### 1.7 Propriedades bioativas da *Z. golungensis*

O estudo conduzido por Lavaud et al., (2015) revelou que os extratos das raízes de *Z. golungensis* possuem propriedades bioativas relevantes, evidenciando atividades anti-inflamatórias, antivirais, antitumorais, antibacterianas e antifúngicas. Outro estudo, realizado por Maroyi, (2019b) observou que o extrato da casca de *Z. golungensis* apresentou atividade moluscicida, enquanto o extrato metanólico das folhas demonstrou atividade antioxidante e antibacteriana. Estes resultados sublinham o potencial terapêutico da *Z. golungensis* e justificam o seu uso tradicional para diferentes aplicações medicinais.

## **2.Objetivos**

## **2.1 Objetivo Geral**

Caracterizar o perfil químico e avaliação da atividade biológica do extrato da raiz da *Z. golungensis* (*Sapindaceae*).

## **2.2 Objetivo Específico**

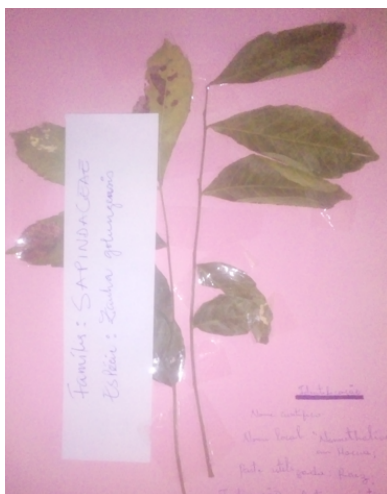
- ✓ Obter extrato hidroetanólico da raiz da *Z. golungensis*;
- ✓ Determinar teor dos compostos fenólicos do extrato da raiz da *Z. golungensis*;
- ✓ Caracterizar os compostos isolados empregando os métodos HPLC/MS;
- ✓ Realizar ensaios de atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e citotóxica.

### **3. Materiais e Métodos**

### 3.1.1 Recolha e identificação do material vegetal

As raízes e folhas de *Z. golungensis* foram recolhidas em setembro de 2022, no distrito de Murrupula, a aproximadamente 75 km da cidade de Nampula, em Moçambique. Esta colheita contou com a participação de praticantes de medicina tradicional, que forneceram informações sobre o uso comunitário da planta. Foi utilizada uma amostragem não probabilística por acessibilidade para a recolha das folhas, com o objetivo de identificar o nome científico da planta, e das raízes, destinadas ao estudo posterior.

Dado que o nome científico não estava inicialmente disponível, as folhas foram submetidas a secagem em prensa (**Figura 4**), processo que permitiu a sua conservação e posterior envio para identificação no Herbário do Instituto de Investigação Agrária de Moçambique (IIAM), em Maputo, onde foi confirmada a classificação taxonómica da espécie.



**Figura 4:** Secagem das folhas para identificação do nome científico da planta

### 3.1.2 Preparação da amostra

Para facilitar uma secagem mais rápida, as raízes foram cortadas em pedaços menores e deixadas a secar durante aproximadamente 21 dias à sombra (**Figura 5**), no Laboratório de Etnobotânica e Fitoquímica da Faculdade de Ciências de Saúde da Universidade Lúrio, em Nampula, Moçambique. Após o período de secagem, as raízes foram pulverizadas e armazenadas

à temperatura ambiente (**Figura 6**), protegidas da radiação solar para evitar a degradação dos compostos bioativos.

Parte do pó obtido foi posteriormente liofilizada no Laboratório de Biologia e Biotecnologia da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, em Portugal, de modo a garantir a preservação das propriedades químicas para análises subsequentes.



**Figura 5:** Secagem de tamanho reduzido da Raiz da *Z. golungensis*      **Figura 6:** Pulverizado da raiz da *Z. golungensis*

### 3.1.3 Extração

Para a preparação dos extratos hidroetanólicos, 1 g das raízes em pó de *Z. golungensis* foi adicionado a 30 mL de uma solução de etanol/água (80:20 v/v), sendo a mistura submetida a agitação magnética durante uma hora à temperatura ambiente (**Figura 7**). O extrato foi então filtrado utilizando papel de filtro (Whatman nº 4; **Figura 8**), e o resíduo foi extraído novamente sob as mesmas condições. Em seguida, os extratos foram evaporados num evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça) a 40 °C até à evaporação completa do etanol (**Figura 9**) e, posteriormente, liofilizados para remover a parte residual de água. Os extratos liofilizados foram então armazenados, protegidos da luz e da humidade, para análises futuras.



**Figura 7:** Extração do extrato da raiz da *Z. golungensis*



**Figura 8:** Filtração do extrato da raiz da *Z. golungensis*



**Figura 9:** Evaporação do solvente de extração

### 3.2 Compostos fenólicos

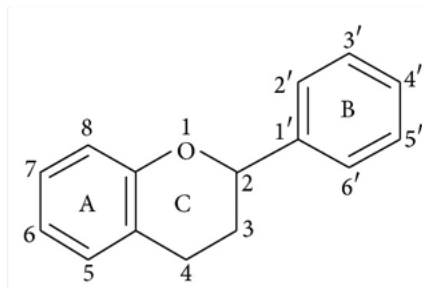
A detecção dos compostos fenólicos foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), equipada com um detetor de díodos (PDA), acoplado a um sistema de ionização por eletrospray (ESI) e espectrometria de massa (MS). Esta análise foi aplicada aos extratos obtidos da amostra de *Z. golungensis*.

Os reagentes e materiais utilizados incluíram acetonitrilo (Fisher Scientific, Porto Salvo, Portugal), ácido fórmico (Panreac, Barcelona, Espanha) e padrões de compostos fenólicos (Extrasynthese, Genay, França). A água utilizada foi purificada pelo sistema Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, EUA). Todos os outros solventes e reagentes foram obtidos em fornecedores científicos especializados.

A metodologia seguiu os passos descritos: adicionaram-se 10 mg de cada extrato a 1 mL de uma solução hidrometanólica (80/20), alcançando uma concentração final de 10 mg/mL. Os extratos foram dissolvidos por ultrassons e filtrados através de um filtro Whatman (0,2  $\mu$ m) antes de serem transferidos para vials de HPLC. A metodologia cromatográfica adotada foi descrita previamente por Barros et al. (2013), e as condições específicas encontram-se detalhadas na **Tabela 3**.

A detecção foi realizada com o PDA a 280 nm e 370 nm, juntamente com um espectrómetro de massa ligado ao sistema HPLC através da célula de saída do PDA. O sistema de espectrometria de massa, com um ion-trap quadrupolo API 3200 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha), operou em modo de ião negativo, com um intervalo de  $m/z$  entre 100 e 1700. Os compostos fenólicos (**Figura 10**) foram caracterizados com base nos seus espectros de UV, espectros de massa, tempos de retenção e comparações com padrões autênticos, quando disponíveis.

Para a análise quantitativa, foi aplicada a integração da linha de base com projeção para cálculo das áreas dos picos. As quantificações foram realizadas através de retas de calibração construídas por injeção de concentrações conhecidas de compostos padrão, e os resultados foram expressos em mg de composto por g de extrato.



**Figura 10:** Estrutura básica de flavonoide

Fonte: (Kumar & Pandey, 2013)

**Tabela 3:** Condições cromatográficas para os compostos fenólicos (Barros et al., 2013)

**HPLC-DAD-ESI/MS condições operacionais para compostos fenólicos**

Sistema	Dionex Ultimate 3000 UPLC instrument (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA)
Coluna	Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18, (3 µm, 4.6 mm× 150 mm, Waters, Milford, MA, USA)
Detectores	DAD acoplado ao MS equipado como fonte ESI; utilizando um espectrômetro de massa Linear Ion Trap LTQ XL (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA)
Fase movel/Gradiente	A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi de 10% B a 15% B durante 5 min, 15-25% B durante 5 min, 25-35% B durante 10 min, isocrático 50% B durante 10 min e reequilíbrio da coluna
Fluxo	0.5 mL/min
Comprimento de onda	280, 330 e 370 nm
Temperatura	35°C
Software	Xcalibur® data system (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA)

### 3.3. Atividade Antimicrobiana e Antifúngica

#### 3.3.1 Atividade Antibacteriana

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos extratos, foram utilizadas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas de origens clínica e ATCC. As estirpes clínicas incluíram:

Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Morganella morganii*.

Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

As amostras clínicas foram fornecidas pelo Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro (Vila Real, Portugal).

Adicionalmente, foram testadas estirpes ATCC de referência adquiridas da Frilabo (Porto, Portugal), incluindo:

Gram-negativas: *Enterobacter cloacae* (ATCC 49741), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella enterica* (ATCC 13076) e *Yersinia enterocolitica* (ATCC 8610).

Gram-positivas: *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

As culturas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas em meio fresco apropriado para garantir a fase de crescimento exponencial antes da análise (**Figura 11**).

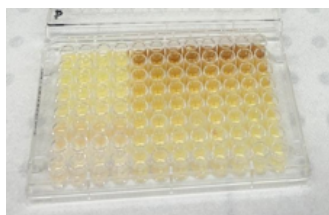
Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

De acordo com Pires et al., (2018) as amostras foram inicialmente dissolvidas em uma solução de Dimetilsulfóxido (DMSO) 5% (v/v) em caldo Mueller-Hinton (MHB) ou caldo Tryptic Soy (TSB), para obter uma concentração final de 20 mg/mL como solução estoque. Em seguida, 190 µL dessa concentração foram distribuídos no primeiro poço de uma microplaca de 96 poços, em duplicado. Nos poços subsequentes, foram adicionados 90 µL de MHB ou TSB, e as amostras foram diluídas em série, alcançando uma faixa de concentração de 100 a 0,15 mg/mL (**Figura 12**). Em cada poço da microplaca, foram adicionados 10 µL do inóculo, padronizado para uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

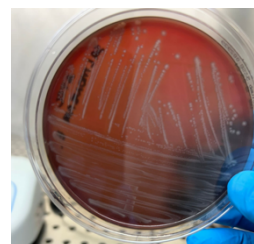
Três controles negativos foram preparados: um com MHB ou TSB, outro apenas com o extrato, e um terceiro contendo meio, antibiótico e bactérias. Como controlo positivo, utilizaram-se Estreptomicina e Ampicilina para todas as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas testadas, exceto para *Bacillus cereus*, para a qual Ampicilina não foi utilizado. Além disso, Meticilina foi usada como controlo positivo para *Staphylococcus aureus*. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada após a adição de 40 µL de p-iodonitrotetrazólio (INT) a 0,2 mg/mL, um corante que indica crescimento bacteriano pela mudança de coloração de amarelo para rosa na presença de microrganismos viáveis (**Figura 13**). A MIC foi definida como a menor concentração de extrato capaz de inibir o crescimento bacteriano visível.

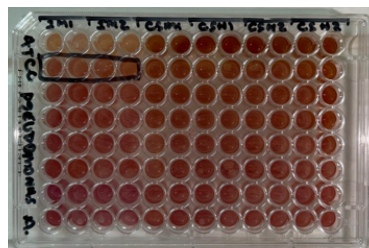
Para determinar a concentração mínima bactericida (CMB), 10 µL de líquido dos poços que não apresentaram mudança de cor foram novamente colocados a crescer em meio sólido (Agar-sangue com 7% de sangue de carneiro) e incubados a 37 °C por 24 horas. A menor concentração que não apresentou crescimento bacteriano foi considerada como a CMB.



**Figura 11:** Microplaca usada no ensaio de repicagem das bactérias



**Figura 12:** Repicagem das bactérias na placa com meio do agar.



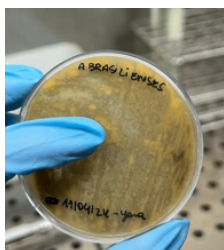
**Figura 13:** Leitura do resultado das bactérias na microplaca.

### 3.3.2 Atividade Antifúngica

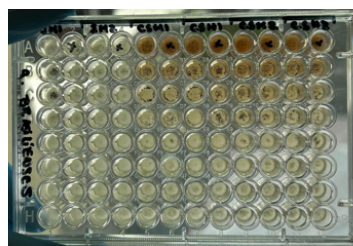
Para a avaliação da atividade antifúngica, foram utilizados dois fungos, *Aspergillus fumigatus* (ATCC 204305) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), também obtidos da Frilabo (Porto, Portugal). Conforme descrito por (Heleno et al., 2013) os esporos fúngicos foram coletados das superfícies das placas de ágar com solução salina estéril a 0,85%, contendo Tween 80 a 0,1% (v/v). A suspensão de esporos foi ajustada para uma concentração de aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  esporos/mL, em um volume final de 100  $\mu$ L por poço. Os inóculos foram armazenados a 4 °C, e diluições foram cultivadas em ágar-malte (MA) (**Figura 14**) sólido para verificar a ausência de contaminação.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada através do método de diluição em série em microplacas de 96 poços. Os extratos foram adicionados ao meio de cultura de malte junto com o inóculo do fungo, e as microplacas foram incubadas a 28 °C por 72 horas. A CMI foi definida como a menor concentração sem crescimento visível (**Figura 15**).

As concentrações mínimas fungicidas (CMF) foram determinadas por inoculação de 2  $\mu$ L de cada poço que não apresentava alteração de cor para microplacas contendo 100  $\mu$ L de caldo de malte em cada poço. A incubação foi realizada a 28 °C por 72 horas, sendo a menor concentração sem crescimento visível definida como a CMF, indicando 99,5% de morte do inóculo original. O controlo positivo foi realizado com Cetoconazol, e o controlo negativo utilizou DMSO 5%. Os resultados de CMI e CMF foram expressos em mg/mL.



**Figura 14:** Repicagem dos fungos na placa com meio do Malt agar



**Figura 15:** Leitura do resultado dos fungos na microplaca.

### 3.4. Atividade Anti-inflamatória

Para a realização do ensaio da atividade anti-inflamatória, os extratos foram dissolvidos em H<sub>2</sub>O para obtenção da concentração final de 8mg/mL. A partir do qual foram realizadas diluições sucessivas, obtendo-se as concentrações a serem testadas (0,125-8mg/mL). A linhagem celular de macrófagos de camundongos RAW 264.7, obtida de DMSMZ–Leibniz–Instituto DSMZ–Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, foi cultivada em meio DMEM, suplementado com soro fetal inativado por calor (SFB) (10%), glutamina e antibióticos e mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e sob atmosfera húmida.

As células foram destacadas com um raspador de células. Uma alíquota de suspensão celular de macrófagos (300 µL) com densidade celular de 5x10<sup>5</sup> células/mL e com proporção de células mortas inferior a 5% de acordo com o teste de exclusão do azul de trypan, foi colocada em cada poço. A microplaca foi incubada por 24 horas na incubadora com as condições previamente indicadas para permitir uma adequada aderência e multiplicação das células. Após esse período, as células foram tratadas com diferentes concentrações de extrato (15 µL, 0.125 – 8mg/ml) e incubada por uma hora, sendo a faixa de concentração testadas de 6.25 – 400 µg/mL.

A estimulação foi realizada com adição de 30 µL, da solução de lipopolissacarídeo – LPS (1 mL/mL) e incubada por mais de 24 horas. A dexametasona (50 mM) foi utilizada como controlo positivo e amostras na ausência de LPS foram utilizadas como controlo negativo. A quantificação do óxido nítrico (NO) foi realizada utilizando kit de sistema de reagentes de Griess (soluções de nitrofenamida, etilenodiamina e nitrito) e através da curva de calibração de nitrito (nitrito de sódio 100 Mm a 1.6mM) preparada em placa de 96 poços.

O NO produzido foi determinado pela leitura de absorbância a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek, Bio- Tek instruments, Inc, Winooski, VT, EUA) e por comparação com a linha de calibração padrão. Os resultados foram calculados através da representação gráfica do percentual de inibição da produção de óxido nítrico versus a concentração da amostra e expressos em relação a concentração de cada um dos extratos que provoca a inibição de 50% da produção de óxido nítrico – IC<sub>50</sub>. (Valores de IC 50% em µg/mL)

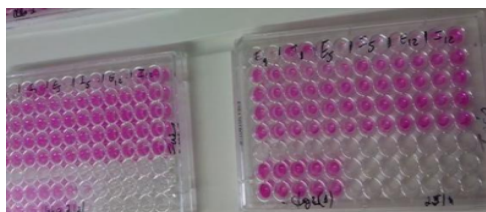
### 3.5. Atividade Citotóxica

Para o teste de citotoxicidade, foram utilizadas linhas celulares tumorais humanas. AGS (carcinoma gástrica), CaCo-2 (adenocarcinoma colorretal), MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (adenocarcinoma do pulmão), mas também foram testadas linhas celulares não tumorais: Vero (rim de macaco verde africano), todos mantidos em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino a 10% glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) exceto Vero, mantido em meio DMEM, suplementado com soro fetal bovino 10% glutamina e antibióticos.

Os fracos de cultura foram incubados em estufa a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>, sob atmosfera húmida. As células foram utilizadas somente quando apresentavam 70 a 80% de confluência. Uma massa conhecida de extrato de (8mg) foi dissolvida em H<sub>2</sub>O (1 mL), para obter soluções estoque com concentração de 8 mg/mL. A partir do qual foram feitas diluições sucessivas, obtendo-se as concentrações a serem testadas (0,125-8 mg/mL).

Cada uma das concentrações de extrato (10 µL), foi incubada com a suspensão celular (190 µL) das linhas celulares testadas em microplacas de 96 poços por 72 horas. As microplacas foram incubadas a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub> atmosfera húmida após a verificação da aderência das células. Todas as linhas celulares foram testadas a uma concentração de 10.000 células/poços, exceto Vero em que foi utilizada uma densidade de 19.000 células/poços.

Após o período de incubação, as células foram corrigidas: o TCA (10% m/v, 100 µL) foi previamente resfriado e as placas foram incubadas por 1 hora a 4°C, lavadas com água e após a secagem, solução de SRB (0,057%, m/v, 100 µL) foi adicionado, deixando em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos (**Figura 16**). Para a remoção de SRB não aderido, as placas foram lavadas três vezes com solução do ácido acético (1% v/v) e colocadas para secar. Finalmente, um SRB aderido foi solubilizado com tris (10 mM 200 µL) e a absorvância a um comprimento de onda de 540 nm foi lida no leitor de microplacas Biotek ELX800. Os resultados são expressos em termos de concentração de extrato com capacidade de inibir o crescimento celular em 50%-GI<sub>50</sub>. Como controlo positivo do uso de uma elipticina.



**Figura 16:** Microplacas usadas em ensaio de citotoxicidade.

## 3.6. Atividade antioxidante

### 3.6.1. Inibição da peroxidação lipídica usando substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

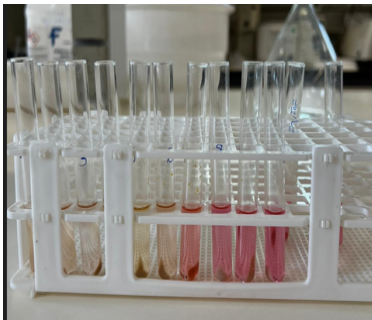
O método de TBARS foi realizado de acordo com o protocolo descrito por (Sarmiento et al., 2015). Os extratos liofilizados foram dissolvidos em água (20 mg/mL) para obter uma solução-mãe, a qual foi diluída sucessivamente para obter dez concentrações inferiores. Além disso, foi preparada uma suspensão de cérebro suíno (*Sus scrofa*): uma porção do cérebro foi adicionada a um tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7.4) numa proporção de 1:2 (m/v), seguido de centrifugação a 3500 rpm por 10 minutos a uma temperatura de 10 °C para evitar a rancificação da mistura.

Em seguida, foram colocados 200 µL de cada solução diluída em tubos de ensaio (**Figura 17**), aos quais se adicionaram 100 µL de ácido ascórbico (0,1 mM), 100 µL de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 10 \text{ mM}$ ) e 100 µL da solução de cérebro suíno, sendo a mistura incubada em banho-maria a 37,5 °C durante 1 hora. Após a incubação, foram adicionados 500 µL de ácido tricloroacético (28% m/v) para interromper a reação, bem como 380 µL de ácido tiobarbitúrico (2% p/v, TBA). Os tubos foram novamente colocados em banho-maria a 80 °C durante 20 minutos para promover a reação entre o TBA e o malondialdeído (MDA) – espécies reativas de oxigênio resultantes da peroxidação lipídica que ocorre no tecido cerebral suíno. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos para separar os resíduos do sobrenadante, e posteriormente passados para uma placa, para subsequente leitura (**Figura 18**).

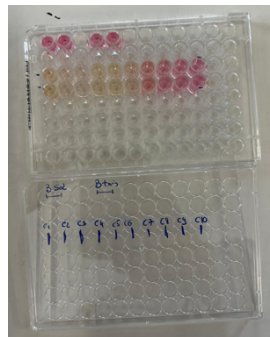
A intensidade da cor do complexo MDA-TBA foi medida a 532 nm (**Figura 19**). Para calcular a percentagem de inibição da peroxidação lipídica, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição da peroxidação lipídica} = (A - B) / A \times 100$$

onde A e B correspondem à absorbância do controle (água) e da solução de extrato, respectivamente. A concentração do extrato que corresponde a 50% de inibição da peroxidação lipídica ( $EC_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração do extrato. O controle positivo utilizado foi o Trolox e os resultados foram expressos como  $EC_{50}$  em  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 17:** Tubos de ensaios usados no ensaio de TBARS.



**Figura 18:** Microplaca usada no ensaio de TBARS.



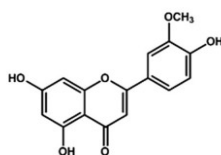
**Figura 19:** Leitura dos resultados no leitor de microplaca.

## **4. Resultados e discussão**

#### 4.1. Identificação dos Compostos Fenólicos:

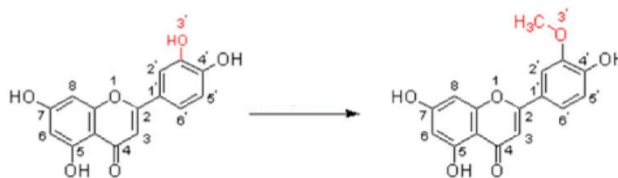
Com base na análise realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector de Díodos, Ionização por Electrospray e Espectroscopia de Massas (HPLC-DAD-ESI/MS), foram identificados, de forma tentativa, três compostos fenólicos no extrato de *Z. gologensis*. Estes compostos apresentam uma estrutura base de crisoeriol, uma flavona com propriedades reconhecidas antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas.

O crisoeriol (**Figura 20**) conhecido quimicamente como 5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil) cromen-4-ona, (Kim et al., 2021; Wang et al., 2023), é um flavonoide encontrado em diversas espécies de plantas medicinais tropicais como *Cardiospermum halicacabum* L, *Crisantemo indicum* L, (Wu et al., 2022);(Song et al., 2022) *Coronopus didymus* L, *Capsico sp*, *Eurya cilliata* Merr, *Eremosparton songoricum* Vass, *Medicago sativa*. (Aboulaghras et al., 2022). Derivado do 3'-O-metil da luteolina, o crisoeriol pertence ao grupo dos flavonoides metilados, com uma atividade semelhante à luteolina (**Figura 21**) (Law et al., 2024).



**Figura 20:** Estrutura química de crisoeriol.

**Fonte:** (Aboulaghras et al., 2022)



**Figura 21:** Metilação da Luteolina em crisoeriol.

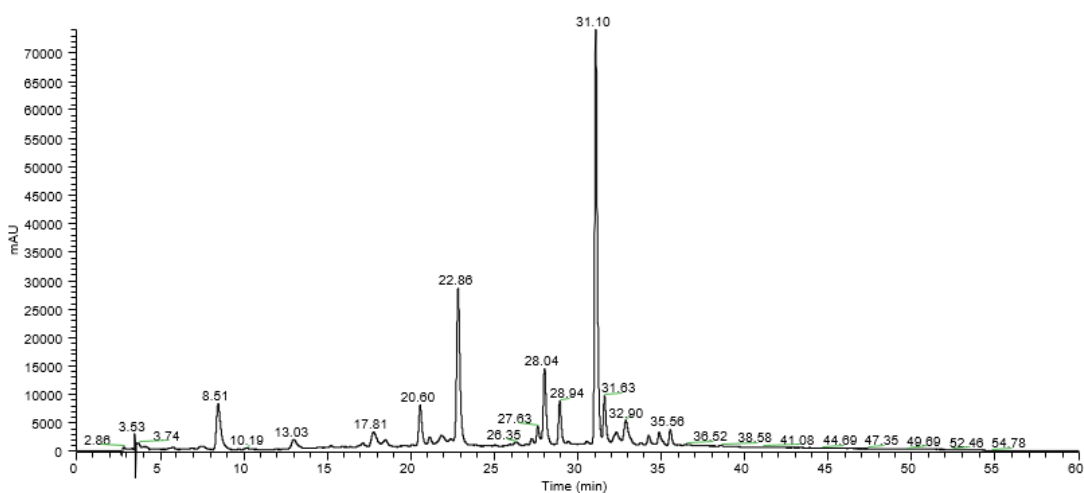
**Fonte:** (Law et al., 2024)

Na **tabela 4**, observa-se que o primeiro composto identificado foi o crisoeriol-rhamnosil-dirutinosídeo, com um tempo de retenção de 20,6 minutos (**Figura 22**) e um íon molecular  $[M-H]^-$  de  $m/z$  1061. O padrão de fragmentação ( $MS^2$ ) mostrou íões filhos em  $m/z$  753, 299 e 284, sugerindo a perda progressiva de açúcares (rhamnose e rutinosídeo), consistentes com uma estrutura de glicosídeo. Este pico apresentou uma concentração de  $0,396 \pm 0,002$  mg/g de extrato, sugerindo uma quantidade relativa baixa no extrato total.

O segundo composto, identificado como crisoeriol-dirhamnosil-rutinosídeo, apresentou um tempo de retenção de 22,86 minutos e um íon molecular de  $m/z$  899. Os íões filhos observados

em m/z 753 e 299 indicam uma estrutura rica em açúcares. Este composto, com uma concentração de  $0,396 \pm 0,002$  mg/g de extrato, mostrou-se igualmente presente em quantidade modesta.

O terceiro composto, um derivado de crisoeriol-rhamnosil-rutinosídeo, teve um tempo de retenção mais longo (31,1 minutos) e um íon molecular de m/z 1055. Os íões filhos em m/z 753 e 299, semelhantes aos picos anteriores, sugerem uma estrutura relacionada, mas com pequenas modificações na composição de açúcares. Este foi o composto mais abundante, com uma concentração de  $2,866 \pm 0,001$  mg/g de extrato, significativamente superior aos dois primeiros.



Cromatograma a 370 nm

Activate Winc

**Figura 22:** Cromatograma a 370 nm, com os tempos de retenção dos compostos detetados.

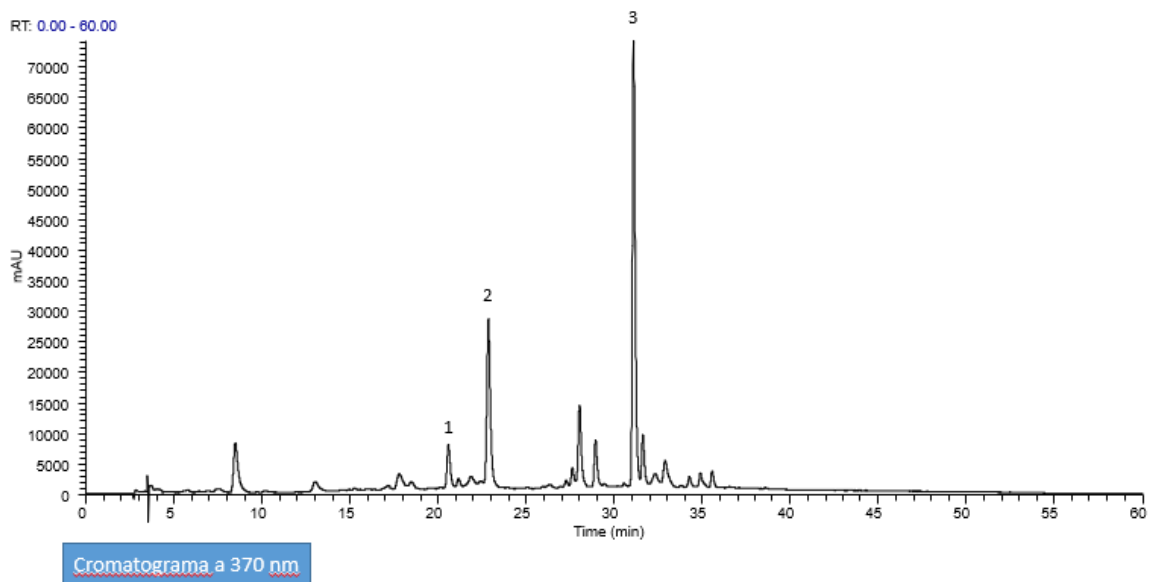
**Tabela 4:** Cromatografia de compostos fenólicos identificados no extrato da raiz da *Z. golungensis* (media  $\pm$  DP)

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	[H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup>	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/ g de extrato)
1	20,6	370	1061	753, 299, 284	Chrysoeriol-rhamnosyl-dirutinosídeo	0,396 $\pm$ 0,002
2	22,86	370	899	753, 299	Chrysoeriol-dirhamnosyl-rutinosídeo	0,396 $\pm$ 0,002
3	31,1	370	1055	753, 299	Derivado de Chrysoeriol-rhamnosyl-rutinosídeo	2,866 $\pm$ 0,001
<b>Total</b>						4,66 $\pm$ 0,03

(tempo de retenção (Rt); comprimentos de onda de absorção máxima na região visível ( $\lambda_{\max}$ ); dados espectrais de massa (MS))

A análise dos dados indica que o composto mais abundante (pico 3) (**Figura 23**) pode ter um papel importante, dada a sua maior concentração, o que sugere uma contribuição significativa para as atividades biológicas do extrato em estudo. A presença destes três derivados glicosilados de crisoeriol aponta para uma diversidade de flavonoides no extrato de *Z. golungensis*.

A variação nos tempos de retenção e nas massas moleculares dos compostos sugere pequenas modificações estruturais, como o tipo e o número de açúcares glicosilados, que podem influenciar as suas propriedades biológicas e estabilidade. A glicosilação é um fator que aumenta a complexidade química e a diversidade dos produtos naturais, alterando as propriedades físicas e biológicas dos flavonoides e favorecendo a regulação do metabolismo celular (Zha, 2019).

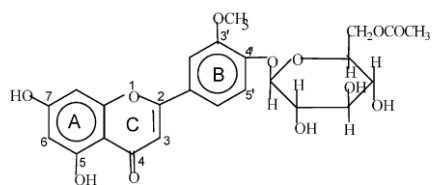


**Figura 23:** Cromatograma a 370 nm, os números dos picos dos compostos tentativamente identificados.

Os grupos hidroxilos dos flavonoides mais reactivos, quando glicosilados, aumentam a estabilidade e a solubilidade em água, o que melhora as suas propriedades biológicas, facilita a absorção e biodisponibilidade, e reduz a toxicidade aguda e efeitos prejudiciais para a saúde. Estas características podem abrir caminho para o desenvolvimento de potenciais terapias naturais (Kumar & Pandey, 2013); (Slámová et al., 2018)

Flavonóides glicosilados (**Figura 24**) são encontrados em vários glicosídeos, como glicosídeos, ramnosídeos, galactosídeos, arabinosídeos e rutinosídeos, comuns em compostos de origem natural (Slámová et al., 2018).

O facto de os três compostos identificados serem glicosídeos sugere que estas formas conjugadas podem funcionar como mecanismos de armazenamento e transporte de metabolitos secundários nas plantas. A glicosilação pode também influenciar a atividade antioxidante destes compostos, um aspeto que seria interessante explorar em estudos futuros.



**Figura 24:** Estrutura química de criseorinol glicosilado (criseorinol 6-O-acetil-4'- $\beta$ -D-glicosídeo).

**Fonte:** Mishra et al., 2003

Embora as identificações tenham sido realizadas com base nos dados de ESI/MS e em comparações com a literatura, estas são, por ora, identificações tentativas. Para uma confirmação estrutural definitiva, seria necessário o uso de padrões autênticos. Além disso, a quantificação baseou-se em métodos espectrofotométricos, úteis para uma análise preliminar, mas que podem apresentar limitações em termos de precisão absoluta.

Os resultados indicam que o extrato de *Z. golungensis* contém importantes derivados fenólicos de crisoeriol com potencial relevância biológica. A diversidade estrutural dos compostos glicosilados pode influenciar as propriedades farmacológicas e a sua aplicabilidade. Estudos futuros devem focar-se na confirmação estrutural, avaliação da bioatividade específica destes compostos e exploração do seu potencial terapêutico, especialmente em contextos de doenças inflamatórias ou de stress oxidativo.

O crisoeriol tem sido amplamente estudado pelas suas propriedades biológicas, incluindo atividades anti-inflamatória, anticancerígena, antitumoral, antidiabética, antioxidante, antibacteriana e antifúngica (Aboulaghras et al., 2022) (Wang et al., 2023) (Yoon & Park, 2021). Adicionalmente, crisoeriol tem mostrado efeitos benéficos em modelos de doenças cardiovasculares, anti-obesidade, anti-mutagénicos e antinociceptivos (Jain et al., 2014)

Num estudo de (Wei et al., 2019) a atividade anticancerígena do crisoeriol foi avaliada em células de cancro do pulmão (A549) *in vitro* e, em modelos de xenoenxerto de camundongos, observou-se uma inibição do crescimento tumoral com uma dosagem de 50 mg/kg. (Wu et al., 2020) relataram a atividade anti-inflamatória do crisoeriol, tendo constatado, em modelos de camundongos, uma redução da inflamação e da produção de NO, prostaglandinas e citocinas pró-

inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) em células RAW264.7 estimuladas por LPS, reguladas por NF-Kb e STAT3.

No estudo de Bashyal et al., (2019), a atividade antimicrobiana do crisoeriol foi comparada com a luteolina contra *S. aureus* 3640 (MRSA) e *P. hauseri* (NBRC 3851). O crisoeriol apresentou valores de MIC mais baixos, revelando uma maior eficácia em relação à luteolina. Por fim, (Mishra et al., 2003), avaliaram a capacidade antioxidante do crisoeriol e crisoeriol glicosilado, verificando que o crisoeriol puro foi mais eficaz na inibição da peroxidação lipídica induzida por Fe(III) e Fe(II), enquanto o crisoeriol glicosilado foi mais eficiente na eliminação de radicais DPPH e na inibição de xantina/xantina oxidase.

## **4.2. Atividade antimicrobiana e antifúngica**

### **4.2.1. Atividade Antimicrobiana**

A **Tabela 5** apresenta os resultados obtidos no ensaio da atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico da raiz de *Z. golungensis*, contra várias bactérias de origem alimentar e clínica, incluindo tanto bactérias Gram-positivas como Gram-negativas.

Em relação às bactérias de origem clínica, o extrato da *Z. golungensis* não demonstrou atividade antimicrobiana contra as bactérias Gram-positivas, nem contra certas bactérias Gram-negativas, como, *Proteus mirabilis* e *klebsiella pneumoniae*, Contudo, observou-se uma ação inibitória contra *Escherichia coli*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas auriginosa* com uma Concentração Mínima Inibitória (CMI) de 10 mg/mL. Contudo, o extrato não exibiu ação bactericida contra qualquer das bactérias clínicas testadas.

No que respeita às bactérias de origem alimentar, o extrato de *Z. golungensis* mostrou atividade bacteriostática contra *Escherichia coli* (CMI de 5mg/mL), *Pseudomona aeruginosa* e *Salmonella enterocolitica* (ambas com CMI de 10 mg/mL). No entanto, não foi observada atividade inibitória contra *Enterobacter cloacae* e *Yersinia enterocolitica*. Além disso, o extrato não exibiu atividade bacteriostática contra as bactérias Gram-positivas de origem alimentar, nomeadamente *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

**Tabela 5:** Atividade antibacteriana dos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir de *Z. golungensis* e os controlos positivos utilizados

Atividade antimicrobiana (MIC & MBC, mg/mL)	Extrato de <i>Z. golungensis</i>		Controlo Positivo					
	CMI	CMB	Ampicilina (10 mg/mL)		Steptomicina (1 mg/mL)		Meticilina (1 mg/mL)	
			CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<b>Bactérias Clínicas</b>								
<b><i>Gram-negativas</i></b>								
<i>Escherichia coli</i>	10	-	0.15	0.15	0.0078	0.0078	n.t.	n.t.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	10	20	0.0078	0.0078	n.t.	n.t.
<i>Morganella morganii</i>	10	-	20	>20	0.0078	0.0078	n.t.	n.t.
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	0.15	0.15	0.0078	0.0078	n.t.	n.t.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	-	>20	>20	0.5	1	n.t.	n.t.
<b><i>Gram-positivas</i></b>								
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	0.15	0.15	n.t.	n.t.	0.0078	0.0078
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	0.15	0.15	0.0078	0.0078	n.t.	n.t.
MRSA	-	-	0.15	0.15	n.t.	n.t.	0.25	0.5
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	-	0.15	0.15	n.t.	n.t.	0.25	0.5
<b>Bactérias Alimentares</b>								
<b><i>Gram-negativas</i></b>								
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	0.15	0.15	0.0078	0.0078	n.t.	n.t.
<i>Escherichia coli</i>	5	-	0.15	0.15	0.01	0.01	n.t.	n.t.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	-	0.63	0.63	0.06	0.06	n.t.	n.t.
<i>Salmonella enterocolitica</i>	10	-	0.15	0.15	0.0078	0.0078	n.t.	n.t.
<i>Yersinia enterocolitica</i>			0.15	0.15	0.0078	0.0078	n.t.	n.t.
<b><i>Gram-positivas</i></b>								
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	n.t.	n.t.	0.0078	0.0078	n.t.	n.t.
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	0.15	0.15	0.0078	0.0078	n.t.	n.t.
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	0.15	0.15	0.0078	0.0078	0.0078	0.0078

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. CMI: concentração mínima; CMB: concentração mínima bactericida; nt: não testado

Um estudo de Maroyi, (2019b) investigou a atividade antimicrobiana do extrato metanólico das folhas de *Z. golungensis*, utilizando o método de microdiluição, com cloranfenicol e estreptomicina como controlos positivos. Este estudo revelou atividade contra *Bacillus cereus* (MIC de 1 mg/mL), mas não demonstrou atividade contra outras bactérias como *Staphylococcus*

*epidermidus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus kristinae*, *Streptococcus pyrogens*, *Escherichia coli*, *Salmonella pooni*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. A discrepância nos resultados pode estar associada ao facto de terem sido estudadas diferentes partes da planta e a outros fatores, como a época de colheita, o solvente utilizado na extração e o método de conservação das amostras.

Noutro estudo de Maroyi, (2019a) que avaliou o extrato metanólico da casca do caule de uma espécie relacionada,, *Z. africana* também pelo método de microdiluição, o extrato revelou atividade contra várias bactérias, incluindo *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus kristinae*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*, com valores de MIC entre 1 mg/mL e 5 mg/mL. No entanto, não foi observada atividade contra *Escherichia coli*. A divergência de resultados entre os estudos pode ser atribuída não só ao uso de espécies diferentes, mas também à parte da planta analisada (casca do caule vs. raiz neste estudo).

#### 4.2.2. Atividade Antifúngica

A **Tabela 6** apresenta os resultados obtidos no ensaio da atividade antifúngica do extrato hidroetanólico da raiz de *Z. golungensis*, O extrato não apresentou atividade inibitória nem fungicida contra os fungos *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*. Não foram encontrados estudos diretamente comparáveis que analisassem a atividade antifúngica do extrato hidroetanólico da raiz de *Z. golungensis*. No entanto, outros estudos do mesmo género (mas de espécies diferentes e com solventes e partes da planta distintas) indicam atividade antifúngica sob certas condições, sugerindo que os resultados divergentes neste estudo podem dever-se a essas diferenças experimentais.

**Tabela 6:** Atividade antifúngica dos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir de *Z. golungensis* e o controlo positivo utilizado.

Atividade antifúngica (MIC & MFC, mg/mL)	Extrato de <i>Z. golungensis</i>		Controlo Positivo	
	CMI	CMF	Ketaconazole	
			CMI	CMF
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	-	-	0.06	0,125
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	0.5	1

CMI: concentração mínima; CMF: concentração mínima fungicida;

Num estudo de Maroyi, (2019a), que investigou o extrato metanólico da casca do caule de *Zanha africana* contra uma série de fungos patogénicos (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliemandii* e *Candida krusei*), verificou-se atividade contra todos os fungos testados, com valores de MIC a partir de 0,3 mg/mL, e atividade fungicida com valores entre 1,0 mg/mL e 8 mg/mL. Estes resultados diferem dos obtidos neste estudo, que não demonstrou qualquer atividade contra *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus*. As discrepâncias podem estar relacionadas com a diferença nas espécies e partes das plantas analisadas, além de fatores como o clima, tipo de solo, métodos de colheita, secagem e armazenamento, e o próprio método de extração.

### 4.3. Atividade anti-inflamatória

A **Tabela 7** apresenta os resultados da atividade anti-inflamatória do extrato da raiz de *Z. golungensis* em células RAW264.7, uma linha de macrófagos de rato, com a dexametasona utilizada como controlo positivo. O extrato demonstrou atividade anti-inflamatória, com um IC<sub>50</sub> de 231,76 ± 8,44 µg/mL, através da inibição da produção de óxido nítrico (NO) nestas células.

Durante a pesquisa, não foi possível encontrar estudos específicos que avaliassem a atividade anti-inflamatória da espécie *Z. golungensis* em linhas de macrófagos. Assim, foi necessário recorrer a estudos realizados com outra espécie do mesmo género, *Z. africana*.

**Tabela 7:** Atividade anti-inflamatória do extrato da raiz da *Z. golungensis*

Atividade anti-inflamatória		
	Extrato	Dexametasona ( $\mu\text{g/mL}$ )
RAW264.7	231,76 $\pm$ 8,44	6.3 $\pm$ 1.4

IC<sub>50</sub> valores que correspondem à concentração que causa 50% de inibição da produção de NO; RAW264.7 – Célula de macrófago de rato.

Um estudo conduzido por (Cuéllar et al., 1997), investigou o efeito inibitório do extrato da casca da raiz de *Z. africana* em vários modelos de inflamação em ratos, utilizando a dexametasona como referência. Nesse estudo, o extrato metanólico da casca da raiz de *Z. africana* mostrou capacidade para reduzir o edema auricular em 26% em camundongos, numa concentração de 0,5 g/orelha, quando a inflamação foi induzida por ácido araquidônico. Num modelo de inflamação crônica da pele, induzido por éster de forbol (TPA) também em camundongos, o extrato metanólico conseguiu reduzir o edema auricular em 48% e diminuir a infiltração de leucócitos, com uma redução de 66% na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

#### 4.4. Atividade citotóxica

A **Tabela 8** apresenta os resultados da atividade anti proliferativa do extrato da raiz de *Z. golungensis* contra diversas linhas celulares tumorais — AGS (adenocarcinoma gástrico humano), CaCo-2 (adenocarcinoma de cólon humano), MCF-7 (adenocarcinoma da mama humano), NCI-H460 (carcinoma do pulmão humano) — e não tumorais (VERO, células de embrião de macaco verde africano). Observou-se que o extrato foi capaz de inibir o crescimento de todas as linhas celulares tumorais testadas, com os valores de GI<sub>50</sub> específicos:

- AGS: 183,04  $\pm$  3,66  $\mu\text{g/mL}$
- CaCo-2: 184,48  $\pm$  3,04  $\mu\text{g/mL}$
- MCF-7: 195,65  $\pm$  4,17  $\mu\text{g/mL}$
- NCI-H460: 133  $\pm$  6,53  $\mu\text{g/mL}$

Para a linha celular de carcinoma do pulmão (NCI-H460), o extrato demonstrou a maior capacidade inibitória, com o valor de GI<sub>50</sub> mais baixo entre as células tumorais avaliadas. Contrariamente, nas células não tumorais (VERO), o extrato, mesmo na concentração máxima

testada, não mostrou atividade anti proliferativa ( $GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$ ), indicando que não foi tóxico para células não tumorais.

Não foi possível encontrar estudos específicos que avaliem a atividade anti proliferativa da espécie *Z. golungensis* em linhas celulares tumorais e não tumorais, o que levou à consulta de estudos com espécies do mesmo gênero. Apesar das diferenças entre as espécies, tais estudos podem fornecer uma base comparativa interessante.

**Tabela 8:** Atividade citotóxica do extrato da raiz da *Z. golungensis*.

Actividade Antiproliferativa			
		Extrato	Ellipticine ( $\mu\text{g/mL}$ )
Linhas celulares tumorais	AGS	183,04±3,65	1.23±0.03
	CaCo-2	184,48±3,04	1.21±0.02
	MCF_7	195,65±4,17	1.02 ± 0.02
	NCI-H460	133,79±6,53	1.01±0.01
Linhas celulares não tumorais	VERO	>400	0.6±0.1

$GI_{50}$  valor que corresponde à concentração que causa 50% de inibição da proliferação celular; AGS - adenocarcinoma gástrico humano; CaCo-2 - adenocarcinoma de cólon humano; MCF-7 - adenocarcinoma de mama humano; NCI-H460 - carcinoma de pulmão humano.

Os resultados sugerem que o extrato de *Z. golungensis* possui um potencial anti proliferativo promissor, especialmente contra células de carcinoma pulmonar. A presença de compostos fenólicos na amostra testada poderá ser um fator relevante a explorar em estudos futuros, uma vez que esses compostos são conhecidos por suas propriedades anticancerígenas.

Um estudo conduzido por (Beuscher, 1994), com a espécie *Z. africana* do mesmo gênero que a *Z. golungensis*, revelou que o extrato metanólico a 25% e o extrato etanólico da casca da raiz foram capazes de induzir a produção de interferão-alfa e beta ( $\text{IFN-}\alpha,\beta$ ), o que sugere um possível efeito imunomodulador.

Outro estudo, realizado por (Runyoro et al., 2006), avaliou a atividade antiproliferativa do extrato metanólico da raiz de *Z. africana*, e demonstrou uma inibição significativa (75,7%) da proliferação de células HeLa (carcinoma cervical humano) a uma concentração de  $10 \mu\text{g/mL}$ . Embora a linha celular HeLa não tenha sido incluída no presente estudo, a evidência da atividade

anti proliferativa de *Z. africana* em células cancerígenas sugere que *Z. golungensis* poderá ter efeitos semelhantes, encorajando futuras investigações sobre o seu impacto em outras linhas celulares tumorais.

#### 4.5. Atividade antioxidante

Os resultados apresentados na **tabela 9** indicam que o extrato da raiz de *Z. golungensis* apresenta atividade antioxidante significativa, evidenciada pela inibição da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). No ensaio de TBARS, o extrato obteve um valor de EC<sub>50</sub> de 0,170 ± 0,002 µg/mL, sugerindo um elevado potencial antioxidante.

Não foi encontrado um estudo específico sobre a avaliação do extrato hidroetanólico da *Z. golungensis* no ensaio de TBARS, sendo necessário recorrer a investigações que analisam a mesma espécie, mas em ensaios distintos e utilizando diferentes partes da planta. Essas variáveis podem contribuir para a diversidade de resultados observados.

**Tabela 9:** Atividade antioxidante dos extratos hidroetanólico obtidos a partir de *Z. golungensis*.

	Extrato de <i>Z. golungensis</i>	Controlo positivo
Atividade antioxidante (EC <sub>50</sub> µg/mL)		Trolox
TBARS	0.170±0.002	19.6±0.8

Um estudo realizado por Maroyi (2019b), avaliou o extrato metanólico das folhas *Z. golungensis*, num contexto antioxidante, obtendo resultados significativos. No ensaio com 2,2'-ácido azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), foi registado um valor de 0,1 mg/mL, enquanto no teste de eliminação do radical livre DPPH, o extrato demonstrou uma atividade de eliminação dependente da concentração. Para a capacidade de redução férrica (FRAP), o extrato revelou uma capacidade redutora de 47,2 µmolFe<sup>2+</sup>/g, sendo comparado ao hidroxitolueno butilado (BHT) com 62,4 µmolFe<sup>2+</sup>/g. Quercetina e catequina foram usadas como controlos positivos.

Outro estudo, realizado por Margaret O. Sofidiya, (2012), avaliou a atividade antioxidante de extratos metanólicos de folhas de seis espécies da família Sapindaceae, incluindo *Z. golungensis*, para os ensaios de DPPH, ABTS e FRAP. O extrato de *Z. golungensis* demonstrou

significativa atividade antioxidante nos ensaios realizados: para o teste de DPPH, verificou-se uma capacidade de captação de radicais superior a 70% numa concentração de 50 µg/mL, e uma atividade de eliminação dependente da concentração; no ensaio de ABTS, a inibição variou entre 62,7% e 92,2%; e no ensaio de FRAP, o extrato mostrou capacidade redutora do complexo TPTZ-Fe(III) para TPTZ-Fe(II), quando comparado a antioxidantes de referência como BHT, ácido ascórbico e catequina.

## **5. Conclusão**

Com base nos resultados obtidos, pode concluir-se que o extrato da raiz de *Z. golungensis* possui propriedades promissoras em diversas atividades biológicas, o que justifica a sua relevância como alvo de investigação.

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) identificou três compostos fenólicos no extrato, todos partilhando a mesma estrutura principal de crisoeriol, com variações na ligação de açúcares à estrutura base. Essas diferenças estruturais nos compostos fenólicos podem influenciar as atividades biológicas observadas, sugerindo a importância desses componentes na bioatividade do extrato.

No que respeita à atividade antimicrobiana, o extrato demonstrou ação contra bactérias Gram-negativas de origem clínica, incluindo *Escherichia coli*, *Morganella morganii* e *Pseudomonas aeruginosa*. No caso de bactérias de origem alimentar, o extrato exibiu atividade inibitória contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enterocolitica*. Estes resultados indicam um potencial uso do extrato como agente antimicrobiano, especialmente contra microrganismos patogênicos de interesse clínico e alimentar.

Em termos de atividade antioxidante, o extrato demonstrou uma elevada capacidade para inibir a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), evidenciando um potencial antioxidante significativo. Este efeito sugere que o extrato pode ajudar a mitigar o stress oxidativo, um fator importante no desenvolvimento de várias doenças crônicas e degenerativas.

Quanto à atividade anti-inflamatória, o extrato mostrou capacidade para inibir a produção de óxido nítrico em linhas celulares de macrófagos de ratos (RAW 264.7), o que aponta para o seu potencial anti-inflamatório e relevância no controlo de processos inflamatórios.

Relativamente à atividade citotóxica, o extrato evidenciou uma ação anti proliferativa, inibindo o crescimento de várias linhas celulares tumorais humanas, incluindo AGS (adenocarcinoma gástrico), CaCo-2 (adenocarcinoma de cólon), MCF-7 (adenocarcinoma mamário) e NCI-H460 (carcinoma pulmonar). Importa destacar que, nas células não tumorais (linhas celulares VERO), o extrato não apresentou toxicidade significativa, o que realça a sua seletividade para células tumorais.

Em síntese, os resultados obtidos sugerem que o extrato da raiz de *Z. golungensis* apresenta um elevado potencial biológico, com atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anti proliferativa em células tumorais. Estes resultados reforçam a relevância da *Z. golungensis*

como fonte potencial de compostos bioativos e justificam a continuidade da investigação para aprofundar a compreensão dos seus mecanismos de ação e explorar as suas aplicações terapêuticas e industriais.

## Perspetivas futuras

Considerando a diversidade de glicosídeos identificados ligados à estrutura principal de crisoeriol, investigações futuras poderiam concentrar-se em análises estruturais mais detalhadas para confirmar definitivamente a configuração destes compostos. Além disso, é recomendável realizar estudos de bioatividade específicos, visando avaliar o potencial terapêutico dos compostos identificados, sobretudo no contexto de doenças inflamatórias e condições associadas ao stress oxidativo.

Paralelamente, estudos futuros poderiam explorar a presença e a bioatividade de saponinas na *Z. golungensis*, dada a sua relevância potencial para fins terapêuticos. Em particular, recomenda-se investigar os triterpenóides presentes na raiz desta espécie, visto que poucos estudos até ao momento abordaram o potencial medicinal desses compostos no género *Zanha*. A caracterização e análise de triterpenóides e outras saponinas podem contribuir para a identificação de novos agentes terapêuticos, promovendo a valorização farmacológica da *Z. golungensis* e o seu possível uso em aplicações terapêuticas.

## **6. Referências Bibliográficas**

- Aboulaghras, S., Sahib, N., Bakrim, S., Benali, T., Charfi, S., Guaouguaou, F.-E., Omari, N. E., Gallo, M., Montesano, D., Zengin, G., Taghzouti, K., & Bouyahya, A. (2022). Health Benefits and Pharmacological Aspects of Chrysoeriol. *Pharmaceuticals*, *15*(8), 973. <https://doi.org/10.3390/ph15080973>
- Barbosa, F., Hlashwayo, D., Sevastyanov, V., Chichava, V., Mataveia, A., Boane, E., & Cala, A. (2020). Medicinal plants sold for treatment of bacterial and parasitic diseases in humans in Maputo city markets, Mozambique. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, *20*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2809-9>
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R. C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, *5*(4), 1732–1740. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.07.019>
- Bashyal, P., Parajuli, P., Pandey, R. P., & Sohng, J. K. (2019). Microbial Biosynthesis of Antibacterial Chrysoeriol in Recombinant *Escherichia coli* and Bioactivity Assessment. *Catalysts*, *9*(2), 112. <https://doi.org/10.3390/catal9020112>
- Beuscher, N. (1994). *Antiviral activity of African medicinal plants*.
- Bruschi, P., Mancini, M., Mattioli, E., Morganti, M., & Signorini, M. A. (2014). Traditional uses of plants in a rural community of Mozambique and possible links with Miombodegradation and harvesting sustainability. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *10*(1), 59. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-59>
- Canga, I. L. V., Vita, P., De Oliveira, A. I. D. F. T., De Pinho, C. M. L., & González, M. Á. C. (2022). Ethnopharmacological study of medicinal plants from the province of Cuanza

Norte (Angola). *Revista Contexto & Saúde*, 22(46), e13336.

<https://doi.org/10.21527/2176-7114.2022.46.13336>

Cardoso, C. A. L., Coelho, R. G., Honda, N. K., Pott, A., Pavan, F. R., & Leite, C. Q. F. (2013).

Phenolic compounds and antioxidant, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Serjania erecta* Radlk. (Sapindaceae). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(4), 775–782. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502013000400017>

Catarino, S., Duarte, M. C., Costa, E., Carrero, P. G., & Romeiras, M. M. (2019). Conservation and sustainable use of the medicinal Leguminosae plants from Angola. *PeerJ*, 7, e6736.

<https://doi.org/10.7717/peerj.6736>

Ceravolo, I. P., Aguiar, A. C., Adebayo, J. O., & Krettli, A. U. (2021). Studies on Activities and Chemical Characterization of Medicinal Plants in Search for New Antimalarials: A Ten Year Review on Ethnopharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 734263.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.734263>

Cuéllar, M. J., Giner, R. M., Recio, M. C., Just, M. J., Máñez, S., Cerdá, M., Hostettmann, K., &

Ríos, J.-L. (1997). Zanthosaponins A and B, Antiphospholipase A<sub>2</sub> Saponins from an Antiinflammatory Extract of *Zanha africana* Root Bark. *Journal of Natural Products*, 60(11), 1158–1160. <https://doi.org/10.1021/np970221r>

Deng, L.-J., Qi, M., Li, N., Lei, Y.-H., Zhang, D.-M., & Chen, J.-X. (2020). Natural products and their derivatives: Promising modulators of tumor immunotherapy. *Journal of Leukocyte*

*Biology*, 108(2), 493–508. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0320-444R>

Department of Biological Sciences, University of Maiduguri, Maiduguri, Nigeria, Bulama-

Modu, M., Muftaudeen, T. K., Department of Biological Sciences, Baze University,

Abuja, Nigeria, Ayodele, A. E., Department of Botany, University of Ibadan, Ibadan,

- Nigeria, Akinloye, A. J., & Department of Botany, Obafemi Awolowo University, Ile-Ife, Ife, Nigeria. (2021). Systematic wood anatomical study in some species of Sapindaceae Juss. In South-Western Nigeria. *Plants and Environment*, 3(2), 37–46.  
<https://doi.org/10.22271/2582-3744.2021.jun.37>
- Díaz, M., Castillo, L., Díaz, C. E., Álvarez, R. G., González-Coloma, A., & Rossini, C. (2014). Differential Deterrent Activity of Natural Products Isolated from *Allophylus edulis* (Sapindaceae). *Advances in Biological Chemistry*, 04(02), 168–179.  
<https://doi.org/10.4236/abc.2014.42021>
- Domínguez, R., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., McClements, D. J., & Lorenzo, J. M. (2021). Encapsulation of Bioactive Phytochemicals in Plant-Based Matrices and Application as Additives in Meat and Meat Products. *Molecules*, 26(13), 3984.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26133984>
- Ekiert, H. M., & Szopa, A. (2020). Biological Activities of Natural Products. *Molecules*, 25(23), 5769. <https://doi.org/10.3390/molecules25235769>
- El Mokni, R., & Iamónico, D. (2023). Taxonomic revision of Sapindaceae in Tunisia, with new additions to national flora and the whole north Africa. *Botanica Complutensis*, 47, e78684. <https://doi.org/10.5209/bocm.78684>
- Heleno, S. A., Ferreira, I. C. F. R., Esteves, A. P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M., & Queiroz, M. J. R. P. (2013). Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 95–100.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.04.025>

- Hlashwayo, D. F., Barbosa, F., Langa, S., Sigauque, B., & Bila, C. G. (2020). A Systematic Review of *In Vitro* Activity of Medicinal Plants from Sub-Saharan Africa against *Campylobacter* spp. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(1), 9485364. <https://doi.org/10.1155/2020/9485364>
- Jain, P., Hossain, Md. S., Fatema, K., Hossain, Md. A. A., Mazumder, K. U., Hossain, H., Alam, Md. A., & Reza, H. M. (2014). Anti-Inflammatory, Analgesic and Antioxidant Activities of *Allophylus Cobbe* Leaves. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 9(4), 223–231. <https://doi.org/10.3844/ajptsp.2014.223.231>
- Kallifatidis, G., Hoy, J. J., & Lokeshwar, B. L. (2016). Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration-resistant prostate cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 40–41, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2016.06.003>
- Kim, M. H., Kwon, S. Y., Woo, S.-Y., Seo, W. D., & Kim, D. Y. (2021). Antioxidative Effects of Chrysoeriol via Activation of the Nrf2 Signaling Pathway and Modulation of Mitochondrial Function. *Molecules*, 26(2), 313. <https://doi.org/10.3390/molecules26020313>
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013(1), 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Lavaud, C., Sayagh, C., Humbert, F., Pouny, I., & Delaude, C. (2015). Triterpenoid saponins from root bark of *Zanha golungensis* (Sapindaceae). *Carbohydrate Research*, 402, 225–231. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.10.001>

- Law, S. K., Wu, X. X., Jiang, Z., Tong, C. W. S., Chow, W. Y. L., & Au, D. C. T. (2024). Pharmacological Activities of *Lonicerae japonicae* flos and Its Derivative—“Chrysoeriol” in Skin Diseases. *Molecules*, *29*(9), 1972. <https://doi.org/10.3390/molecules29091972>
- Lemmens, R. H. M. J., & Louppe, D. (2012). *Timbers 2*. PROTA Foundation ; CTA.
- Maregesi, S., Messo, C., & Mathias, J. (2017). ETHNOMEDICAL SURVEY AND SAFETY EVALUATION OF TRADITIONAL EYE MEDICINES USED IN MISUNGWI DISTRICT, TANZANIA. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, *6*(1), 75. <https://doi.org/10.5455/jice.20161116071244>
- Margaret O. Sofidiya. (2012). Evaluation of antioxidant and antibacterial properties of six Sapindaceae members. *Journal of Medicinal Plants Research*, *6*(1). <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1364>
- Maroyi, A. (2019a). *Zanha africana* (Radlk.) Exell: Review of its botany, medicinal uses and biological activities. *J. Pharm. Sci.*, *11*.
- Maroyi, A. (2019b). *Zanha golungensis* Hiern (Sapindaceae): Review of its botany, medicinal uses and biological activities. *J. Pharm. Sci.*, *11*.
- Mbokane, E. M., & Moyo, N. A. G. (2022). Use of medicinal plants as feed additives in the diets of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and the African Sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) in Southern Africa. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 1072369. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1072369>
- Mishra, B., Priyadarsini, K. I., Kumar, M. S., Unnikrishnan, M. K., & Mohan, H. (2003). Effect of O -glycosilation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *11*(13), 2677–2685. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(03\)00232-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00232-3)

- Moussa Ndiaye, Eric E Agoyi, Achille E Assagbadjo, Birane Dieng, Ablaye Ngom, & Khandioura Noba. (2022). Socio-cultural importance of the species *Blighia sapida* koenig (Sapindaceae) in Benin. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 18(3), 073–082. <https://doi.org/10.30574/gscbps.2022.18.3.0079>
- Muftaudeen, T. K., Bulama, M. M., Ayodele, E. A., & Akinloye, A. J. (2023). Foliar epidermal studies in the family Sapindaceae Juss. in South Western Nigeria. *Research in Plant Biology*, 11–18. <https://doi.org/10.25081/ripb.2023.v13.8199>
- Naeem, A., Hu, P., Yang, M., Zhang, J., Liu, Y., Zhu, W., & Zheng, Q. (2022). Natural Products as Anticancer Agents: Current Status and Future Perspectives. *Molecules*, 27(23), 8367. <https://doi.org/10.3390/molecules27238367>
- Ndhlovu, P. T., Asong, J. A., Omotayo, A. O., Otang-Mbeng, W., & Aremu, A. O. (2023). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by indigenous knowledge holders to manage healthcare needs in children. *PLOS ONE*, 18(3), e0282113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282113>
- Onuminya, T. O., & Ogundipe, O. T. (2014). Diversity of life-forms within Sapindaceae Juss. in West Africa and Western Cameroon: A field guide. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 6(8), 624–636. <https://doi.org/10.5897/IJBC2014.0730>
- Onuminya, T. O., Surajudeen, D. R., & Ogundipe, O. T. (2020). *MORPHOLOGICAL, ANATOMICAL AND PHYTOCHEMICAL STUDIES ON ZANHA GOLUNGENSIS HIERN. (FAMILY: SAPINDACEACE)*.
- Otieno, J., Abihudi, S., Veldman, S., Nahashon, M., Van Andel, T., & De Boer, H. J. (2015). Vernacular dominance in folk taxonomy: A case study of ethnospecies in medicinal plant

- trade in Tanzania. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 11(1), 10.  
<https://doi.org/10.1186/1746-4269-11-10>
- Pires, T. C. S. P., Dias, M. I., Barros, L., Alves, M. J., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of dried Portuguese apple variety (Malus domestica Borkh. Cv Bravo de Esmolfe). *Food Chemistry*, 240, 701–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.010>
- Qadri, H., Shah, A. H., Almilaibary, A., & Mir, M. A. (2024). Microbiota, natural products, and human health: Exploring interactions for therapeutic insights. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1371312. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1371312>
- Reimers, Fernández, Reimers, Chaloupkova, Del Valle, Milella, & Russo. (2019). An Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants Used in Papantla, Veracruz, Mexico. *Plants*, 8(8), 246. <https://doi.org/10.3390/plants8080246>
- Rente, D., Paiva, A., & Duarte, A. R. (2021). The Role of Hydrogen Bond Donor on the Extraction of Phenolic Compounds from Natural Matrices Using Deep Eutectic Systems. *Molecules*, 26(8), 2336. <https://doi.org/10.3390/molecules26082336>
- Romeiras, M. M., Essoh, A. P., Catarino, S., Silva, J., Lima, K., Varela, E., Moura, M., Gomes, I., Duarte, M. C., & Duarte, M. P. (2023). Diversity and biological activities of medicinal plants of Santiago island (Cabo Verde). *Heliyon*, 9(4), e14651.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14651>
- Ruffo, C. K., BIRNIE, A., & TENGNÄS, B. (2002). Edible Wild Plants of Tanzania. *Regional Land Management Unit, RELMA/Sida*.

- Runyoro, D., Kamuhabwa, A., Ngassapa, O., & De Witte, P. (2006). Cytotoxic activity of some Tanzanian medicinal plants. *East and Central African Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 35–39. <https://doi.org/10.4314/ecajps.v8i2.9723>
- Sarmiento, A., Barros, L., Fernandes, Â., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2015). Valorization of traditional foods: Nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. and *Lathyrus sativus* L. pulses: Valorization of traditional foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 179–185. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6702>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., & Latha, L. (2010). Extraction, Isolation And Characterization Of Bioactive Compounds From Plants' Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1). <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v8i1.60483>
- Singla, R. K., & Dubey, A. K. (2019). Molecules and Metabolites from Natural Products as Inhibitors of Biofilm in *Candida* spp. Pathogens. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(28), 2567–2578. <https://doi.org/10.2174/1568026619666191025154834>
- Slámová, K., Kapešová, J., & Valentová, K. (2018). “Sweet Flavonoids”: Glycosidase-Catalyzed Modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 2126. <https://doi.org/10.3390/ijms19072126>
- Song, J., Lee, H., Heo, H., Lee, J., & Kim, Y. (2022). Effects of Chrysoeriol on Adipogenesis and Lipolysis in 3T3-L1 Adipocytes. *Foods*, 12(1), 172. <https://doi.org/10.3390/foods12010172>
- Temitope Olabisi Adeyemi. (2012). Biodiversity of Sapindaceae in West Africa: A checklist. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(10). <https://doi.org/10.5897/IJBC12.032>

- Turpin, G., Ritmejeriytė, E., Jamie, J., Crayn, D., & Wangchuk, P. (2022). Aboriginal medicinal plants of Queensland: Ethnopharmacological uses, species diversity, and biodiscovery pathways. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 18(1), 54.  
<https://doi.org/10.1186/s13002-022-00552-6>
- Wang, C.-R., Ji, H.-W., He, S.-Y., Liu, R.-P., Wang, X.-Q., Wang, J., Huang, C.-M., Xu, Y.-N., Li, Y.-H., & Kim, N.-H. (2023). Chrysoeriol Improves In Vitro Porcine Embryo Development by Reducing Oxidative Stress and Autophagy. *Veterinary Sciences*, 10(2), 143. <https://doi.org/10.3390/vetsci10020143>
- Wei, W., He, J., Ruan, H., & Wang, Y. (2019). *In vitro and in vivo cytotoxic effects of chrysoeriol in human lung carcinoma are facilitated through activation of autophagy, sub-G1 cell cycle arrest, cell migration and invasion inhibition and modulation of MAPK/ERK signalling pathway.*
- Wu, J.-Y., Chen, Y.-J., Bai, L., Liu, Y.-X., Fu, X.-Q., Zhu, P.-L., Li, J.-K., Chou, J.-Y., Yin, C.-L., Wang, Y.-P., Bai, J.-X., Wu, Y., Wu, Z.-Z., & Yu, Z.-L. (2020). Chrysoeriol ameliorates TPA-induced acute skin inflammation in mice and inhibits NF- $\kappa$ B and STAT3 pathways. *Phytomedicine*, 68, 153173. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153173>
- Wu, J.-Y., Chen, Y.-J., Fu, X.-Q., Li, J.-K., Chou, J.-Y., Yin, C.-L., Bai, J.-X., Wu, Y., Wang, X.-Q., Li, A. S., Wong, L. Y., & Yu, Z.-L. (2022). Chrysoeriol suppresses hyperproliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes and inhibits JAK2/STAT3 signaling. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 22(1), 73. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03553-w>
- Yoon, H.-S., & Park, C. (2021). Chrysoeriol ameliorates COX-2 expression through NF- $\kappa$ B, AP-1 and MAPK regulation via the TLR4/MyD88 signaling pathway in LPS-stimulated

murine macrophages. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(1), 718.

<https://doi.org/10.3892/etm.2021.10150>

Zha, J. (2019). Pathway enzyme engineering for flavonoid production in recombinant microbes.

*Metabolic Engineering Communications*.