



**IONE BORGES MEIRA**

**DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO  
GERVÃO ROXO (*Stachytarpheta sellowiana* Schauer) E  
POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO SEU EXTRATO  
BRUTO ETANÓLICO**

**LAVRAS - MG  
2024**

**IONE BORGES MEIRA**

**DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO GERVÃO ROXO  
(Stachytarpheta Sellowiana Schauer) E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO SEU  
EXTRATO BRUTO ETANÓLICO**

Dissertação apresentada como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, na Universidade Federal de Lavras, para obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas  
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2024**

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

Meira, Ione Borges.

Determinação da localização geográfica do Gervão Roxo  
(*Stachytarpheta sellowiana* Schauer) e potencial farmacológico do  
seu extrato bruto etanólico / Ione Borges Meira. - 2023.

41 p. : il.

Orientador(a): Luis Solis Murgas.

Coorientador(a): Suzan Vilela Bertolluci.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Gervão roxo. 3. Veterinária  
Integrativa. I. Murgas, Luis Solis. II. Bertolluci, Suzan Vilela. III.  
Título.

**IONE BORGES MEIRA**

**DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO GERVÃO ROXO  
(Stachytarpheta Sellowiana Schauer) E POTENCIAL FARMACOLÓGICO DO SEU  
EXTRATO BRUTO ETANÓLICO**

**DETERMINATION OF THE GEOGRAPHIC LOCATION OF GERVÃO ROXO  
(Stachytarpheta Sellowiana Schauer) AND PHARMACOLOGICAL POTENTIAL OF  
ITS CRUDE ETHANOLIC EXTRACT**

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

APROVADA em 22 de dezembro de 2023.

Dr. Luis David Solis Murgas UFLA

Dra. Renata Alves de Oliveira e Castro UFOP

Dr. Wanderley José Mantovani Bittencourt UFLA

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas  
Orientador

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2024**

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço, primeiramente, à existência dessa página, que me garante minimamente a liberdade de escrita, podendo falar de forma um pouco menos eurocentrada. Dito isso, agradeço à Olorum, aos orixás e as entidades, que não só me acompanharam durante todo o percurso da vida, mas possibilitaram o acontecimento dela, em cada detalhe, desde o surgimento das plantas até a manutenção das mesmas, me possibilitando a vida e atualmente o estudo dela.

Por falar em vida, valeu demais pai e mãe, por resolverem que seria legal colocar um indivíduo a mais no mundo. Se não fosse por essa decisão, eu não estava aqui agora, escrevendo esse agradecimento. Mãe, obrigada por incentivar os meus porquês da infância, eles perduram até hoje, enchendo o saco de outras pessoas agora. Eu devo muito do que sou a você e eu amo o que sou. Por isso mesmo, o meu mais sincero agradecimento a mim mesma, que me manteve forte, sem abandonar meus sonhos e ideais, mesmo quando isso me custou preços altos.

Irmãs, queridas, não sei nem que palavra usar pra dizer o quanto eu sou sortuda por ter nascido com seres tão maravilhosos por perto! Só agradece mesmo! Vó Liria e Tia Liu, as maiores influências dessa pesquisa aqui, inclusive. Foi a Dona Liria uma das mulheres que mais influenciaram os meus passos dentro da academia, tanto pra que o conhecimento daqui fosse acessível pra ela e pra tantas outras Donas Lirias, tanto pra que o conhecimento dela fosse valorizado pelos daqui.

Agradeço imensamente aos meus familiares consanguíneos pelo apoio e por comemorarem as minhas vitórias como se fossem deles. E na mesma intensidade os meus familiares escolhidos em vida, que me acompanharam, torceram por mim, me auxiliaram em tantos aspectos e formatos, contribuindo pra que hoje eu esteja aqui, escrevendo uma dissertação de mestrado. Quem diria!?

São tantos, de tantos cantos diferentes que eu nem sei como listar, mas vamos lá: João, Rogerio, Vitor, Lara, Carol, Cláudia, Alessandra, Bruno, Dico, Giu, Dri, Rê, Jorge, Jussara, Gavilanes, Heitor, Mariana, Pato, Buni, Luiza, Dora, Marta, Sonia, Gabriel, Dmitri, Pedro, Sara, Primi, Maria, Camila, Leticia, Gabi, Paulo, Geise, Sandra, Lívia, Talita, Gui, Janina, Julia, Suzan, Magela, Luciana, Alexandre, Wanderley, Murgas, Fernanda, Luan, Vitória, Joyce, Henrique.

Vocês são seres humanos que me inspiram! Obrigada por tanto! Agradeço também à arte, que teve um papel grandioso na manutenção da minha sanidade, principalmente ao Hip Hop.

Um super agradecimento ao Harmos, o núcleo de estudos mais bonito que eu já participei em toda a minha vida. Medicina Veterinária Integrativa nos meus tempos de graduação era um delírio da minha cabeça, é lindo ver o que esse núcleo tem feito dentro da Universidade. Agradeço infinitamente ao NEMAC e ao NEPRON por me possibilitarem reerguer um pilar tão esquecido dentro da academia: a extensão. Me dando combustível e propósito sempre que a pesquisa me drenava forças. E ao NEPAD pelos recursos e estrutura que me permitiram conduzir minha pesquisa.

Agradeço a todos os colegas de trabalho, os técnicos, equipe de limpeza, alunos de graduação, mestrado, doutorado, professores deste e de outros departamentos. Sem essa imensa equipe não seria possível conduzir nem um terço do que fiz aqui durante esses dois anos. E CAPES, eu e meus boletos agradecemos infinitamente pelo apoio e incentivo à pesquisa, ensino e extensão. Obrigada!

## RESUMO

*Stachytarpheta sellowiana* Schauer, conhecida popularmente como gervão roxo, é um arbusto endêmico do Brasil, descrito pela primeira vez em 1851 como uma espécie extremamente rara, pertencente à família *Verbenaceae*, encontrada apenas em Minas Gerais. São documentados apenas 35 registros da mesma, evidenciando a falta de estudos com a flora brasileira. O gênero *Stachytarpheta* possui cerca de 82 espécies conhecidas pelo seu potencial farmacológico, sendo descritas com propriedades anti-inflamatórias, antimaláricas, anti-leishmanióticas, antibióticas, hipoglicêmicas e outras. Pressupõe-se que esta espécie pouco documentada tenha semelhante propriedade medicinal. Objetiva-se avaliar o potencial farmacológico desta planta, a começar pela toxicidade da mesma por intermédio do modelo biológico zebrafish (*Danio rerio*), elucidar seu local de ocorrência, bem como iniciar a pesquisa fitoquímica do extrato e avaliar sua atividade leishmanicida. O extrato foi preparado pelo método de maceração dinâmica com EtOH 92,80° INPM, rotaevaporado e liofilizado. Diferentes diluições foram preparadas para a aplicação nos embriões de zebrafish para definir a concentração letal média (CL<sub>50</sub>), as doses seguras foram testadas no protozoário *Leishmania amazonensis*, buscando a CL<sub>50</sub> nesta espécie, e o extrato bruto etanólico foi quantificado quanto aos teores de compostos fenólicos e flavonoides totais por espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo 25 embriões por tratamento e sete tratamentos (0,0; 100,0; 250,0; 500,0; 750,0 1.000,0 e 2.000,0 µg/ml), com três repetições. Depois da exposição os exemplares foram avaliados e com os valores obtidos, através de análises estatísticas, a CL<sub>50</sub> no modelo biológico zebrafish foi estabelecida em 250,0 µg/ml<, o extrato não apresentou atividade leishmanicida com a Cepa de *L. amazonensis*, os teores de fenóis e flavonoides foram 9,61 ± 0,31 mg Eq. Q/g e 15,03 ± 0,28 mg Eq. AG/g, respectivamente. Dentre as características de ocorrência atribuídas à planta, a restrição altitudinal foi a única confirmada pelo estudo. Os resultados obtidos lançam luz sobre a interação complexa entre uma planta medicinal e o desenvolvimento de um fitofármaco, fornecendo subsídios cruciais para futuros desenvolvimentos terapêuticos.

**Palavras chaves:** gervão; *Verbenaceae*; *Stachytarpheta*; zebrafish; planta medicinal; *Leishmania*.

## ABSTRACT

*Stachytarpheta sellowiana* Schauer, popularly known as purple gervão, is a shrub endemic to Brazil, described for the first time in 1851 as an extremely rare species, belonging to the *Verbenaceae* family, found only in Minas Gerais. Only 35 records of it are documented, highlighting the lack of studies on Brazilian flora. The genus *Stachytarpheta* has around 82 species known for their pharmacological potential, being described with anti-inflammatory, antimalarial, anti-leishmanial, antibiotic, hypoglycemic and other properties. It is assumed that this poorly documented species has similar medicinal properties. The aim is to evaluate the pharmacological potential of this plant, starting with its toxicity through the zebrafish (*Danio rerio*) biological model, elucidate its place of occurrence, as well as begin phytochemical research on the extract and evaluate its leishmanicidal activity. The extract was prepared by the dynamic maceration method with EtOH 92.80° INPM, rotary evaporated and freeze-dried. Different dilutions were prepared for application to zebrafish embryos to define the average lethal concentration (LC<sub>50</sub>), the safe doses were tested on the protozoan *Leishmania amazonensis*, looking for the LC<sub>50</sub> in this species, and the crude ethanolic extract was quantified for the levels of phenolic compounds and total flavonoids by ultraviolet molecular absorption spectrophotometry. The design used was completely randomized, with 25 embryos per treatment and seven treatments (0.0; 100.0; 250.0; 500.0; 750.0, 1,000.0 and 2,000.0 µg/ml), with three repetitions. After exposure, the specimens were evaluated and with the values obtained, through statistical analyses, the LC<sub>50</sub> in the zebrafish biological model was established at 250.0 µg/ml, the extract did not show leishmanicidal activity with the *L. amazonensis* strain, the phenol and flavonoid contents were 9.61 ± 0.31 mg Eq. Q/g and 15.03 ± 0.28 mg Eq. AG/g, respectively. Among the occurrence characteristics attributed to the plant, the altitudinal restriction was the only one confirmed by the study. The results obtained shed light on the complex interaction between a medicinal plant and the development of a phytopharmaceutical, providing crucial information for future therapeutic developments.

**Keywords:** gervão; *Verbenaceae*; *Stachytarpheta*; zebrafish; medicinal plant; *Leishmania*

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 10 |
| <b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....                                     | 11 |
| <b>2.1. Objetivo Específico</b> .....                              | 11 |
| <b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....                                | 12 |
| <b>3.1. <i>Stachytarpheta sellowiana</i> Schauer</b> .....         | 12 |
| <b>3.2. Gênero <i>Stachytarpheta</i></b> .....                     | 13 |
| <b>3.2.1. Atividade biológica do gênero</b> .....                  | 15 |
| <b>3.2.2. Leishmaniose</b> .....                                   | 16 |
| <b>3.3. Zebrafish</b> .....  | 17 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                 | 19 |
| <b>4.1. Cultivo das matrizes</b> .....                             | 19 |
| <b>4.2. Preparo do extrato</b> .....                               | 19 |
| <b>4.3. Ensaio de embriotoxicidade</b> .....                       | 20 |
| <b>4.3.1. Obtenção dos embriões</b> .....                          | 20 |
| <b>4.3.2. Teste de embriotoxicidade</b> .....                      | 21 |
| <b>4.4. Levantamento da ocorrência geográfica</b> .....            | 22 |
| <b>4.5. Quantificação de metabólitos secundários</b> .....         | 22 |
| <b>4.5.1. Quantificação de compostos fenólicos</b> .....           | 22 |
| <b>4.5.2. Quantificação de flavonoides</b> .....                   | 22 |
| <b>4.6. Ensaio de viabilidade</b> .....                            | 22 |
| <b>4.6.1. <i>Leishmania amazonensis</i></b> .....                  | 22 |
| <b>4.6.2. Macrófagos murinos</b> .....                             | 23 |
| <b>4.7. Análises estatísticas</b> .....                            | 24 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                             | 24 |
| <b>5.1. Embriotoxicidade</b> .....                                 | 24 |
| <b>5.2. Levantamento da ocorrência geográfica</b> .....            | 26 |
| <b>5.3. Quantificação de polifenóis totais e flavonóides</b> ..... | 30 |
| <b>5.4. Testes de viabilidade</b> .....                            | 32 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b> .....  | 33 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>35</b> |
|--|-----------|

## 1. INTRODUÇÃO

*Stachytarpheta sellowiana* Schauer (*Verbenaceae*) é uma planta endêmica do Brasil, conhecida popularmente como gervão roxo. Seu primeiro registro foi feito em 1847, desde então somente 35 registros da espécie foram feitos, indicando ameaça de extinção e evidenciando o descaso com as pesquisas da flora brasileira. Descrita como endêmica na Cadeia do Espinhaço, região predominantemente formada pelo bioma Cerrado, extremamente ameaçado pelo avanço do agronegócio (*hotspot*).

O gênero *Stachytarpheta* é bastante conhecido, sendo utilizado como planta medicinal pela população há muitos anos para o tratamento de diversas enfermidades. As atividades leishmanicida, hipoglicêmica, anti-inflamatória, repelente, antibacteriana já foram amplamente pesquisadas, confirmando as ações farmacológicas do conhecimento popular (Abe and Ohtani, 2013; Adebajo et al., 2007; Adedeji, 2012; Agampodi et al., 2022a; Almeida et al., 1995b; Aumeeruddy and Mahomoodally, 2021). Todavia, a espécie *Stachytarpheta sellowiana* não possui informações científicas. O ponto de partida em qualquer investigação farmacológica deve ser a toxicidade da planta, já que o estabelecimento da dose é necessário para separar o remédio do veneno.

Um modelo biológico que vem sendo cada vez mais empregado para avaliação da toxicidade é o zebrafish. *Danio rerio* (*Cyprinidae*), conhecido como zebrafish, bandeirinha ou paulistinha, é um peixe nativo da região sudeste do Himalaia. Adquiriu visibilidade como modelo biológico devido às inúmeras vantagens que apresenta, tais como: genoma completamente sequenciado, sendo 70% semelhante à espécie humana, rápido ciclo de vida, possibilitando testes em um curto período, embrião transparente, sensível às substâncias tóxicas, visível a olho nu e com desenvolvimento externo, baixo custo para manutenção e menor impacto ambiental (Abidar et al., 2020; Abozaid and Gerlai, 2022; Abrão et al., 2022).

Todas as fases de vida do zebrafish podem ser utilizadas pela pesquisa científica, a fase embrionária, em que o animal ainda não sente dor, é o estágio mais sensível do ciclo de vida do peixe, sendo empregada para avaliações toxicológicas, padronizadas por diversas organizações, sendo a OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico) a maior referência, patenteadora do teste FET (Toxicidade Embrionária em Peixe) (Akhtar et al., 2016; Certo et al., 2017).

Descartando as dosagens que apresentarem toxicidade, as doses seguras podem ser estudadas para compreensão da ação biológica da espécie. Uma das indicações das espécies

contempladas pelo gênero *Stachytarpheta* é a leishmanicida. As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, um parasita intracelular obrigatório, transmitidas para hospedeiros vertebrados através da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas com o protozoário. O microrganismo necessita do flebotomíneo, conhecido popularmente como mosquito palha, para completar o seu ciclo de vida, da forma amastigota (sem flagelo), encontrada no macrófago dos hospedeiros e no trato gastrointestinal do vetor, para a forma promastigota (com flagelo) (Cecílio et al., 2022).

Dividem-se em duas principais apresentações clínicas, a Visceral, que atinge órgãos internos, possui alta mortalidade e atinge principalmente crianças e a Tegumentar, que se subdivide em Cutâneo-Mucosa, responsável por provocar lesões na mucosa e Cutânea, provoca lesões indolores de base eritematosa e é a mais comum. Todas as formas acometem inúmeras espécies, mas o principal reservatório é o cachorro, sendo protocolo de prevenção elimina-los. Atualmente existe tratamento (Milteforam®), entretanto devido ao preço ( $\pm$  R\$ 1.000,00), este é pouco empregado (Ibarra-Meneses et al., 2022; Kumari et al., 2022).

O Brasil é responsável pela maior quantidade de casos notificados causados pelo protozoário *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, com endemismo notável em inúmeros estados, inclusive Minas Gerais. Em contrapartida é também o país com a maior biodiversidade mundial. Estima-se que 125.000 plantas são medicinais, destas somente 1-2% são estudadas e inúmeras correm risco de extinção. É bastante provável que inúmeras doenças possam ser tratadas com o fitocomplexo que essas plantas possuem, para isso é necessário que estudos científicos sejam conduzidos de forma a garantir eficácia, qualidade e segurança para sua utilização.

Algumas espécies do gênero *Stachytarpheta* já possuem essas informações, entretanto quando se trata da *S. sellowiana* não existe nenhum documento publicado na plataforma *Scopus*, *Web of Science* e *PubMed*, no entanto é possível que essa espécie tenha semelhante ação farmacológica, tendo potencial para ser aliada no tratamento destas enfermidades negligenciadas.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Objetiva-se avaliar a toxicidade da *Stachytarpheta sellowiana* Schauer em zebrafish (*Danio rerio*) e sua atividade leishmanicida.

### **2.1. Objetivo Específico**

- Coletar e preparar o extrato da espécie *Stachytarpheta sellowiana*;
- Avaliar a toxicidade da planta em embriões de *Danio rerio*;
- Quantificar os teores de fenóis e flavonóides totais;
- Levantamento da ocorrência geográfica;
- Avaliar a atividade leishmanicida.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. *Stachytarpheta sellowiana* Schauer

*Stachytarpheta sellowiana* Schauer (*Verbenaceae*), conhecida popularmente como gervão-roxo ou gervão-azul. É uma espécie endêmica do Brasil considerada ameaçada de extinção, restrita ao estado de Minas Gerais, com populações encontradas na Cadeia do Espinhaço. Descrita como extremamente rara há 175 anos, somente 35 registros da espécie foram feitos até então, sendo todos no estado de Minas Gerais (Harley and Atkins, 1996; SiBBR, 2008; Cardoso et al., 2020b).

Nenhum documento foi encontrado na literatura disponível na base de dados *Scopus*, *PubMed* e *Web of Science*, ao utilizar como palavra-chave o nome da espécie, tendo que abranger o estudo da planta para gênero e família. Entretanto foi possível encontrar algumas publicações na plataforma Google Acadêmico, nestas a espécie é descrita como endêmica, portanto restrita, da Serra do Espinhaço, entretanto os registros da mesma não se limitam à essa região, sendo necessário um georreferenciamento desta área para melhor entendimento de sua ocorrência (Cardoso et al., 2019; de Melo et al., 2010).

A *S. sellowiana* é um sub-arbusto ramificado com cerca de 0,6 m de altura, apresentando ramos cilíndricos, tricomas glandulares, folhas sésseis com lâmina de 2-5 cm × 1-2 cm, subpatente, coriácea, oboval, de ápice obtuso, margem serrilhada, base atenuada, face adaxial e abaxial densamente cobertas por tricomas simples e glandulares. Suas inflorescências possuem espigas terminais 4-6 floras, 3-6 × 3 cm, brácteas esverdeadas, estreito-ovais, com cerca de 8 mm de comprimento, contendo tricomas curtos e glandulares, cálice 2-laciniado de cerca de 14 mm de comprimento e tricomas glandulares externos. Apresenta corola infundibuliforme, de cor azul-escura, tubo ligeiramente curvo de cerca de 15 mm comprimento. A espécie possui estames 2 perfeitos, inseridos na metade do tubo da corola e estaminódios 2,

ovário possui cerca de 2 mm comprimento e fruto não-visto (FIGURA 1). (Cruz and Salimena, 2017)

Figura 1 - *Stachytarpheta sellowiana* Schauer (*Verbenaceae*)



Fonte: Da autora (2022)

### 3.2. Gênero *Stachytarpheta*

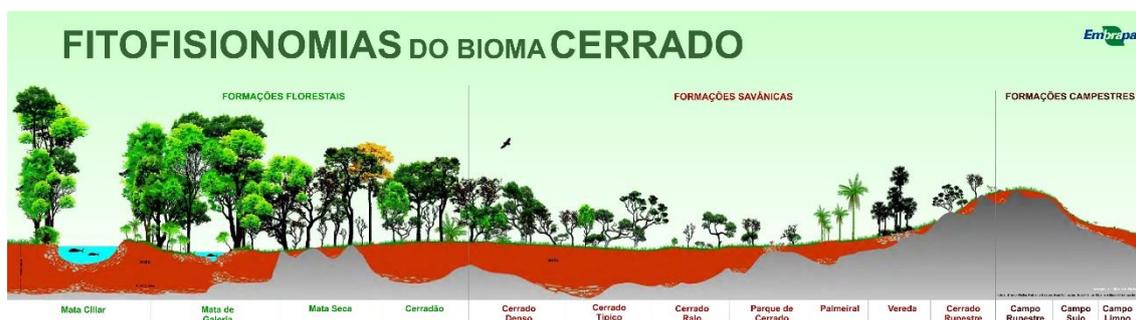
O gênero *Stachytarpheta* é o segundo maior dentre os 35 contemplados pela família *Verbenaceae*, família que contém aproximadamente 1.200 espécies distribuídas nas regiões áridas e semiáridas da África, Andes e das Américas. Destas, 286 se encontram no Brasil, 187 são endêmicas e 50 estão ameaçadas de extinção, todavia, poucos estudos desta família foram realizados no país, a maioria deles não incluem as espécies da flora brasileira. Schauer (1847) foi pioneiro ao realizar um levantamento das espécies brasileiras pertencentes ao gênero *Stachytarpheta*, até hoje o mais completo; foi também o responsável pelo primeiro registro da *Stachytarpheta sellowiana* Schauer (Cabral et al., 2018; Cardoso et al., 2020b; Cruz and Salimena, 2017).

As espécies deste gênero encontradas no Brasil são bastante distintas, sendo possível encontrar de herbáceas até arbóreas, sendo as arbustivas as mais comuns. Apresentam ramos cilíndricos ou tetragonais, as folhas são simples, de filotaxia oposta ou verticilada, raramente

alternas e frequentemente com margens crenadas, inflorescências racemosas, brácteas esverdeadas ou róseas, flores podem ser monoclinas ou diclinas, sésseis ou pediceladas, zigomorfas e raramente actinomorfas, o cálice pode ser gamossépalo, tubuloso ou campanulado, a corola gamopétala, 4–5-mera, os estames 4–5, geralmente didínamos, ou 2 férteis e 2 estaminódios, o gineceu 2–4 carpelar, 1-carpelar por aborto, o ovário é súpero, contendo 1 óvulo por lóculo, o estilete é terminal, o estigma lateral e o fruto é do tipo drupa ou esquizocarpo (Atkins, 2005).

Estima-se a existência de 133 espécies do gênero no mundo todo, destas 79 foram identificadas no Brasil até o ano de 2005, entretanto estudos taxonômicos atuais incluíram 4 novas espécies, totalizando 83 registros no Brasil, 76 são endêmicas, concentradas principalmente na Cadeia do Espinhaço, onde o bioma Cerrado é predominante (FIGURA 2), especialmente o tipo fitofisionômico Campo Rupestre (Atkins, 2005; Cabral et al., 2018; Cardos et al., 2019; Cardoso et al., 2020a; Cardoso et al., 2021; Cardoso et al., 2022).

Figura 2 - Fitofisionomias do bioma Cerrado



Fonte: (RIBEIRO, 2008)

Os solos desta fitofisionomia são os neossolos litólicos, originados pela decomposição de arenitos e quartzitos, pobres em nutrientes, ácidos e com baixo teor de matéria orgânica, com altitudes geralmente maiores de 900 metros, ventos constantes, variações extremas de temperatura, substratos arenosos ou pedregosos com afloramentos e pouca disponibilidade de água devido à baixa profundidade e capacidade de retenção do solo (Ribeiro and Walter, 1998; Zappi et al., 2003).

O Cerrado é o bioma brasileiro com a maior ocorrência da *Verbenaceae* e de outras famílias, com destaque para o Cerrado mineiro. No Cerrado, existe um endemismo notável de inúmeras espécies, sendo considerado um *hotspot*. Devido à expansão do agronegócio, estima-se que se o desmatamento mantiver o ritmo atual até 2050, mais de 1.100 plantas endêmicas

poderão ser extintas, dentre elas inúmeras são plantas medicinais que ainda não foram documentadas. A necessidade da conservação deste bioma se faz também pela demanda do conhecimento das espécies que ele comporta (Cardoso et al., 2020a; Cardoso et al., 2022).

### 3.2.1. Atividade biológica do gênero

A utilização para fins medicinais do gênero *Stachytarpheta* é bastante disseminada, indicada para diversas enfermidades por apresentar atividade leishmanicida, hipoglicêmica, imunossupressora, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana e antiparasitária, a depender da planta, do farmacógeno, do solvente e do método extrativo utilizados, já que a composição química e, portanto, a ação farmacológica estão relacionadas com esses fatores (Abe and Ohtani, 2013; Adebajo et al., 2007; Agampodi et al., 2022a, b; Almeida et al., 1995a; Duret et al., 1976).

Na literatura foi possível observar que as espécies mais estudadas até agora foram a *Stachytarpheta jamaicensis*, *S. cayennensis*, *S. mutabilis*, *S. indica*, *S. angustifolia*, *S. glabra* e *S. urticifolia*. Nestes estudos, observa-se divergências quanto aos solventes e o método extrativo utilizado. Entretanto, a maioria deles utilizam as folhas, álcool 95% e a maceração para obtenção do extrato vegetal. Dos compostos e classes de compostos identificados, a maioria deles são compostos fenólicos, verbascosídeos (fenilpropanóide), aminas, 6 $\beta$ -hidroxipolamiida, iridoides, ipolamiidas (iridoides), taninos, flavonoides, esteróides, glicosídeos cardiotônicos, alcalóides e saponinas (Adebajo et al., 2007; Agampodi et al., 2022a; Chowdhury et al., 2004; Da Silva et al., 2013; De Oliveira, 2022).

A atividade anti-leishmania foi constatada na espécie *Stachytarpheta cayennensis* (FIGURA 3), esta apresenta verbascosídeo e ipolamiida como compostos majoritários. Seu uso é bastante difundido, principalmente entre os povos originários, com múltiplas indicações terapêuticas, muitas delas analisadas cientificamente, o que justifica sua participação no Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais do SUS (Braga et al., 2007; Maquiaveli et al., 2016; Saúde, 2006).

Figura 3 - *Stachytarpheta cayennensis* Vahl



Fonte: (Brasil, 2020)

### 3.2.2. Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa, endêmica em 98 países, que possui como hospedeiros definitivos alguns animais silvestres, cavalos, seres humanos e principalmente cães. Tendo os flebotomíneos como hospedeiros intermediários, é através da picada de fêmeas parasitadas por protozoários do gênero *Leishmania* que a doença é transmitida. No Brasil, ela se manifesta predominantemente em duas formas clínicas distintas: a leishmaniose cutânea e a leishmaniose visceral (Cecílio et al., 2022; Erber et al., 2022).

A leishmaniose cutânea, responsável por grande parte dos casos, apresenta lesões no tecido epitelial, é causada por diversas espécies do gênero *Leishmania*. Entre as principais, destacam-se *Leishmania (viannia) braziliensis*, *Leishmania (viannia) guyanensis* e *Leishmania (leishmania) amazonensis*. Essa diversidade pode influenciar aspectos como a resposta do hospedeiro, a patogenicidade e, potencialmente, a eficácia de tratamentos (Da Silva et al., 2018; Gouri et al., 2022; Ibarra-Meneses et al., 2022).

Por outro lado, a leishmaniose visceral, associada à *Leishmania chagasi*, representa uma forma mais grave da doença, com acometimento sistêmico, causando febre, pancitopenia,

hepatoesplenomegalia e potencialmente morte. A compreensão das peculiaridades de cada espécie é essencial para a implementação de estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento. O tratamento estabelecido para esta doença consistia na eutanásia dos hospedeiros definitivos, com exceção do homem, atualmente o tratamento implica na utilização de medicamentos (miltefosina e alopurinol) que apresentam inúmeros efeitos adversos e alto custo (aproximadamente 1.000 reais) (Erber et al., 2022; Ibarra-Meneses et al., 2022; Kumari et al., 2022; Kvist et al., 2006; Mazire et al., 2022; Moreira et al., 2007; Vásquez-Ocmín et al., 2018).

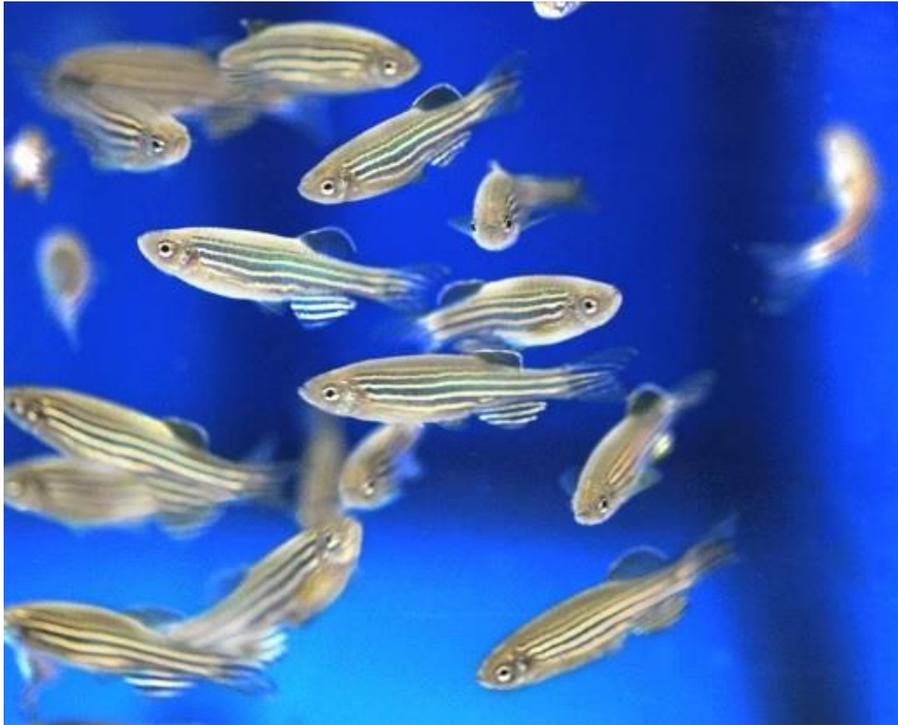
É de extrema importância que novas formas de tratamento sejam pesquisadas, como por exemplo, a fitoterapia, que consiste na utilização de plantas que possuem metabólitos especiais, capazes de prevenir, curar ou tratar doenças, conhecimento alicerçado na utilização popular há milhares de anos. A partir destas plantas, chamadas medicinais, é possível obter derivados vegetais, dentre eles está o extrato, formado por substâncias extraídas da planta por meio de solventes apropriados (ANVISA, 2022).

Na literatura contatou-se que outros gêneros de plantas medicinais (*Syringa* e *Homalolepis*) que possuem iridóides, compostos monoterpênicos, de esqueleto iridano, especificamente ipolamiida, também possuem atividade leishmanicida, sendo letal para formas amastigotas e promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* (Atay et al., 2016; Braga et al., 2007; Da Silva et al., 2018; Gouri et al., 2022; Kirmizibekmez et al., 2004; Kvist et al., 2006).

### 3.3. Zebrafish

Nativo do sul da Ásia, a espécie *Danio rerio* (sinonímia *Brachydanio rerio*), popularmente conhecida como paulistinha ou zebrafish (FIGURA 4), é um peixe de água doce de regiões tropicais, que atinge em média 2 a 3 cm de comprimento. A diferença de gêneros é facilmente identificada, pois os machos são menores, mais estreitos e apresentam listras douradas e azuis, ao contrário das fêmeas, que apresentam listras pratas e azuis e possuem a barriga esbranquiçada (Alafiatayo et al., 2019; Balkrishna et al., 2021).

Figura 4 – Zebrafish

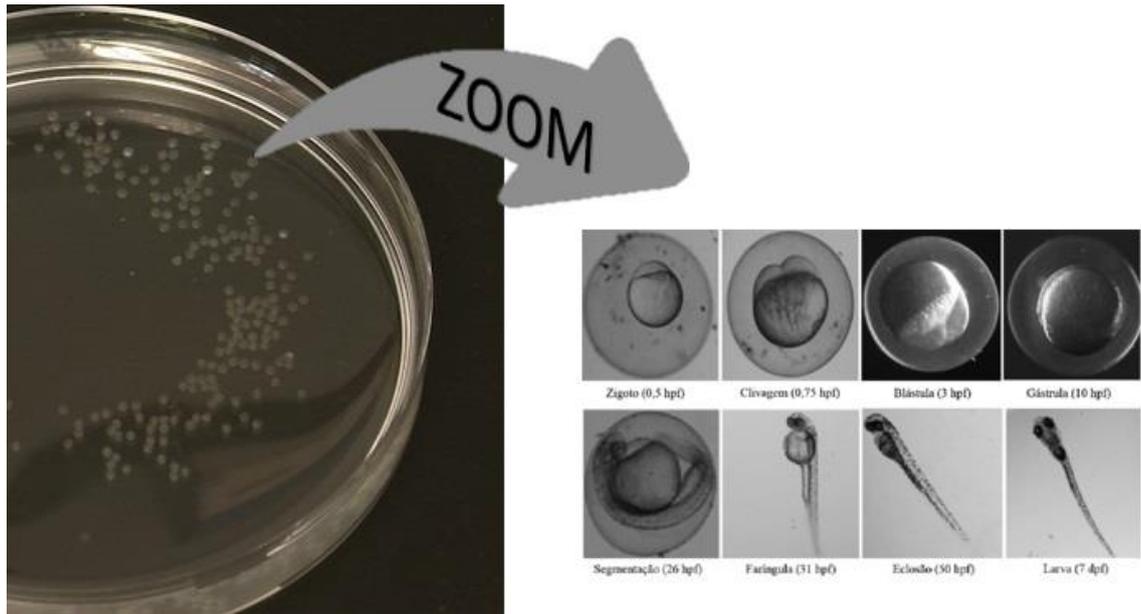


Fonte: (Abozaid and Gerlai, 2022)

Em crescente utilização como modelo biológico é considerada um ótimo modelo vertebrado devido à sua semelhança morfológica, fisiológica e genética com os mamíferos, ademais seu pequeno porte, código genético totalmente sequenciado, velocidade de desenvolvimento, economia na manutenção, alta fecundidade, curto ciclo de vida e embriões translúcidos são outras vantagens da espécie (Abidar et al., 2020; Agraz et al., 2021; Ferreira et al., 2019).

Todos os seus estágios de vida (embrionário, larval, juvenil e adulto) têm sido amplamente utilizados para a pesquisa (FIGURA 5), empregados em diferentes análises. Uma delas é o ensaio de embriotoxicidade, que visa determinar a toxicidade de uma substância em embriões de *Danio rerio* (Zainol Abidin et al., 2020). Somente nos últimos 18 anos foram publicados 47.779 documentos, de acordo com a base de dados Scopus (pesquisa realizada no dia 18/08/2022) relacionada à palavra-chave “Zebrafish”, indicando crescente visibilidade a este modelo tão vantajoso.

Figura 5 – Embriões de zebrafish



Fonte: Adaptado pela autora (2022)

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Cultivo das matrizes

O cultivo das plantas foi realizado no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) – MG. Foram utilizadas mudas advindas da parte superior (apicais e nodais) de plantas de *Stachytarpheta sellowiana*, coletadas na Serra do Campestre em Lavras-MG.

O cultivo das plantas foi conduzido de forma livre em canteiro com solo classificado como sendo do horizonte B do latossolo vermelho distrófico (textura argilosa) com as seguintes características químicas: pH em água= 6,0; P e K = 1,13 e 26,0 mg·dm<sup>-3</sup>; Ca, Mg, Al e H+ Al = 1,20; 0,20; 0,00 e 1,86 cmol·dm<sup>-3</sup>; saturação de bases V (%) = 44,04; matéria orgânica = 1,41 dag Kg<sup>-1</sup>; teor de argila = 64 dag Kg<sup>-1</sup>, com duas irrigações semanais.

### 4.2. Preparo do extrato

Folhas da base, meio e ápice da planta *Stachytarpheta sellowiana* Schauer foram coletadas pela manhã, no Horto de Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) - MG, situada nas coordenadas geográficas 21'23" S 44' 94" W, 918 m de altitude.

As folhas selecionadas foram pesadas, secas em estufa com circulação de ar fechada a  $38 \pm 2$  °C, durante 96 horas, pesadas para cálculo de matéria seca e tamisadas em peneira de

análise granulométrica de malha 9 TY e abertura de 2,00 mm, obtendo a droga vegetal. A droga vegetal foi extraída na proporção 1:5 (300 g da planta: 1.500 mL de EtOH 92,80° INPM), e macerada durante 7 dias, a temperatura ambiente, com duas agitações diárias durante 3 minutos, com intervalo de 12 horas entre elas.

O extrato vegetal foi filtrado à vácuo e o resíduo remacerado com 1,500 mL de EtOH 92,80° INPM. O extrato foi concentrado em Rotavapor (Buchi Switzerland) a 40°C, condensador a -3°C, rotação de 5 rpm e vácuo de 150 mbar ao início, diminuindo gradativamente, de 5 em 5 mbar até a evaporação completa do solvente.

Posteriormente, as amostras foram congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80 °C, até passarem por secagem por liofilização a uma pressão de vácuo de aproximadamente 1.140 mbar, com temperatura do condensador de -63 °C, durante 44 horas e 42 minutos. As amostras liofilizadas foram armazenadas na geladeira até montagem dos experimentos.

### **4.3. Ensaios de embriotoxicidade**

#### **4.3.1. Obtenção dos embriões**

Depois da aprovação do Comitê de Ética Animal da UFLA, sob o protocolo 040/2021, adultos de *Danio rerio* foram separados de acordo com o sexo (20 machos e 20 fêmeas) no dia anterior a cada reprodução, em pequenas criadeiras. As criadeiras foram mantidas em aquários de 40L com sistema de oxigenação constante e temperatura controlada a 28°C, com manutenção do fotoperíodo de 14 horas luz/10 horas escuro. No dia seguinte pela manhã, os machos foram acondicionados na criadeira das fêmeas (2 machos/1 fêmea) uma ou duas horas antes do término do período de fase escura, para estimular a reprodução e a liberação de gametas no período de fase clara que sucede. A utilização de criadeiras com um fundo gradeado é de extrema importância, para que os ovos passem pelo fundo, ficando protegidos do canibalismo.

Os embriões foram coletados por meio de uma pipeta e mantidos em meio E3, em placas de petri (100 embriões por placa), em estufa a 28°C, até que tivessem alcançado a fase de 50% de epibolia (5 horas após fertilização). O meio E3 permite a padronização do desenvolvimento embrionário do zebrafish e possui em sua composição 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>, e 0,1% de azul de metileno (Di Prinzio et al., 2010).

#### 4.3.2. Teste de embriotoxicidade

Ao atingir a fase de epibolia, os ovos passaram por uma triagem inicial, classificando – os como embriões viáveis ou inviáveis. Os viáveis foram acondicionados em placas de ELISA de 96 poços (1 embrião por poço), sendo utilizados 24 e 75 embriões por concentração, no pré-teste e no teste, consecutivamente.

As concentrações do pré-teste foram estabelecidas de acordo com as diretrizes da OECD 236, em escala logarítmica de 10 em 10, sendo empregada as dosagens de 0; 1,0; 10; 100 e 1.000 µg/ml. As concentrações do teste foram estabelecidas de acordo com os resultados do pré-teste, sendo empregadas as dosagens de 0; 100; 250; 500; 750; 1.000 e 2.000 µg/ml. A maior concentração testada deve resultar em 100% de letalidade e a menor concentração testada deve não apresentar efeito observável. No controle há apenas o meio E3.

Em cada um dos poços foi adicionado 200 µL de cada solução. As placas foram cobertas com Parafilm® para evitar o possível efeito de evaporação e em seguida incubadas a 28±1°C. Para a observação das taxas de sobrevivência, eclosão e possíveis alterações morfológicas, os embriões foram avaliados diariamente até alcançarem 96hpf (OECD, 2013).

Foram consideradas alterações morfológicas as seguintes características: não fertilização, formação de blástula e gástrula, não desenvolvimento de somitos, desenvolvimento dos olhos, movimentos espontâneos, presença de circulação na aorta dorsal, grau de pigmentação da larva, edema durante a formação do coração, não descolamento de cauda, falta de batimento cardíaco e retardo de crescimento (Hallare; Kohler; Triebkorn, 2004).

Com base nos parâmetros normais da espécie, quaisquer outras características que não correspondem ao desenvolvimento da espécie foram consideradas como alterações morfológicas. O número de indivíduos mortos e o estágio de desenvolvimento foram verificados todos os dias, sendo contabilizados todos os embriões que não apresentaram batimento cardíaco, circulação sanguínea ou outro processo de degeneração. Todos os procedimentos experimentais, tanto a reprodução quanto os testes toxicológicos, seguem especificações da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico. Todos os embriões que sobreviveram após o teste de toxicidade foram sacrificados com superdosagem de anestésico benzocaína (250 mg/L) (Kimmel et al., 1995; OECD, 2013).

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), sendo 25 embriões por tratamento e 7 tratamentos (0,0; 100,0; 250,0; 500,0; 750,0; 1.000,0 e 2.000,0 µg/mL) com três repetições. Depois da exposição foi feita a avaliação dos exemplares e com os valores obtidos, através de análises estatísticas, foi possível obter a CL<sub>50</sub>.

#### **4.4. Levantamento da ocorrência geográfica**

A ferramenta utilizada foi a QGIS, abastecida com dados baixados do IBGE em conjunto com os pontos de ocorrência da espécie *Stachytarpheta sellowiana* Schauer (QGIS, 2014). No site do IBGE os dados buscados foram: Biomas brasileiros, fitosifonias do bioma Cerrado encontrados no estado de Minas Gerais e altitudes no estado de Minas Gerais. Gerando quatro cartografias através de análise de sobreposição de camadas (IBGE, 2022).

#### **4.5. Quantificação de metabólitos secundários**

##### **4.5.1. Quantificação de compostos fenólicos**

A quantificação de compostos fenólicos totais foi determinada em microplacas com 96 poços pelo método de Folin-Ciocalteu com modificações (Singleton & Rossi, 1965). Foram utilizados 40 µL do extrato, em seguida adicionados 120 µL do reagente Folin-Ciocalteu (10%) e 120 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,0%). Todas as amostras foram incubadas por 2 horas no escuro em temperatura ambiente e sua absorvância lida a 760 nm. A curva de calibração foi gerada a partir do padrão ácido gálico diluído em cinco diferentes concentrações (35,7; 17,8; 8,9; 4,5 e 2,2 µg/µL), os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de folha seca e todos os testes foram realizados em quintuplicata.

##### **4.5.2. Quantificação de flavonoides**

A quantificação de flavonoides totais foi determinada pelo método descrito por Popova et al. (2005) com modificações. Em microtubos de 1,5 mL alíquotas de 100 µL do extrato foram misturados com 100 µL de AlCl<sub>3</sub> (7%). Todas as amostras foram incubadas por 40 minutos no escuro em temperatura ambiente, centrifugadas a 5000 rpm por cinco minutos. Posteriormente, 200 µL das amostras foram transferidas para uma microplaca e a absorvância lida a 420 nm. A compensação de cada tratamento foi preparada utilizando a mesma metodologia, apenas substituindo o cloreto de alumínio por água destilada. A curva de calibração foi gerada a partir do padrão quercetina diluído em cinco concentrações distintas (93,7; 46,9; 23,4; 11,7; 5,9 µg/µL). Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de folhas seca. Todos os testes foram realizados em quintuplicata.

#### **4.6. Ensaios de viabilidade**

##### **4.6.1. *Leishmania amazonensis***

O ensaio de viabilidade da cepa de *Leishmania amazonensis* (OP46) iniciou-se pela preparação de uma lâmina com a finalidade de avaliar a qualidade da cultura. Posteriormente foi retirado um volume de 5 ml da cultura, centrifugado a 3.000 RPM por 10 minutos a 23°C.

Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em RPMI 1640 Medium (SIGMA) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Para a contagem em Câmara de Neubauer, uma diluição em formalina 4% foi preparada (1:40 - 390  $\mu$ l de formalina 4% + 10  $\mu$ l de *Leishmania*), 10  $\mu$ l da diluição foi colocada na Câmara e contada em microscópio. Após a contagem, o volume necessário para o experimento foi ajustado para uma concentração de  $2 \times 10^8$  células/ml. As células foram centrifugadas novamente para remover o excesso de meio de cultura. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas no volume necessário de RPMI.

Em seguida foi adicionado  $1 \times 10^7$  parasitos por poço em um volume de 50  $\mu$ l de meio RPMI para a fase exponencial de crescimento da cultura. Em cada poço foi adicionado 50  $\mu$ l de cada uma das preparações do extrato (1% do extrato + DMSO em 50  $\mu$ L de RPMI). As placas foram cobertas com Parafilm® para evitar o possível efeito de evaporação e em seguida incubadas na Estufa BOD, a 25°C. Para a observação das taxas de sobrevivência, as placas foram avaliadas as 24, 48 e 72 horas. Após cada um dos tempos foi adicionado 150  $\mu$ l da solução de MTT em RPMI com 10% SFB em cada poço. As placas foram envolvidas com Parafilm® e papel alumínio, e incubadas na Estufa CO<sub>2</sub> a 37°C por 4 horas. Após a incubação, foi adicionado SDS 10% em HCL 0,01 M, e as placas foram incubadas por 16 horas para leitura em 490 nm.

No processo de contagem, o volume necessário da cepa OP46 foi calculado com base na contagem da célula mãe pura e diluição em formalina 4%. A curva da OP46 foi preparada em volumes finais de 300  $\mu$ l/poço, com diferentes pontos representando variações de concentração de *Leishmania*.

#### **4.6.2. Macrófagos murinos**

O cultivo de macrófagos murinos da linhagem J774.A1 (Banco de Células do Rio de Janeiro – BCRJ) foi conduzido em garrafas de cultura de 160 ml (Nunc, Roskilde, Denmark) utilizando o meio RPMI 1640 Medium (SIGMA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino - SFB (Vitrocel Embriolife, Campinas, SP).

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados  $1 \times 10^7$  macrófagos por poço em um volume de 50  $\mu$ L de RPMI. O extrato foi dissolvido em DMSO, e as diluições foram preparadas para atingir 1% do extrato + DMSO em 50  $\mu$ L de RPMI. Em triplicata, foram adicionados 50  $\mu$ L de cada concentração nos poços, para cada tempo de tratamento (24 e 48 horas). As placas foram lacradas com Parafilm® e incubadas na Estufa BOD a 25°C.

Após cada período de tratamento, as placas foram centrifugadas por 10 minutos a 3000 RPM a 18°C. Em seguida, adicionou-se 150  $\mu$ L de solução de MTT em RPMI com 10% SFB

aos poços, mantendo as placas ao abrigo da luz durante a incubação em estufa CO<sub>2</sub> a 37°C por 4 horas. Após este período, adicionou-se 60 µL/poço de SDS 10% em HCL 0,01 M (SDS – HCl), seguido de incubação por 16 horas a 37°C em estufa CO<sub>2</sub>. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 490 nm.

#### **4.7. Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software R.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Embriotoxicidade**

Os experimentos foram conduzidos utilizando doses variadas (0, 100, 250, 500, 750, 1.000 e 2.000 µg/ml) no modelo zebrafish, selecionadas com base nos resultados do pré-teste, no qual de todas as doses avaliadas (0; 1,0; 10,0; 100,0 e 1.000 µg/ml) somente a de 1.000 µg/ml evidenciou mortalidade e alterações morfológicas. Em todas as outras dosagens o desenvolvimento apresentou normalidade, indicando a necessidade de concentrar as investigações no intervalo de 100 a 1.000 µg/ml.

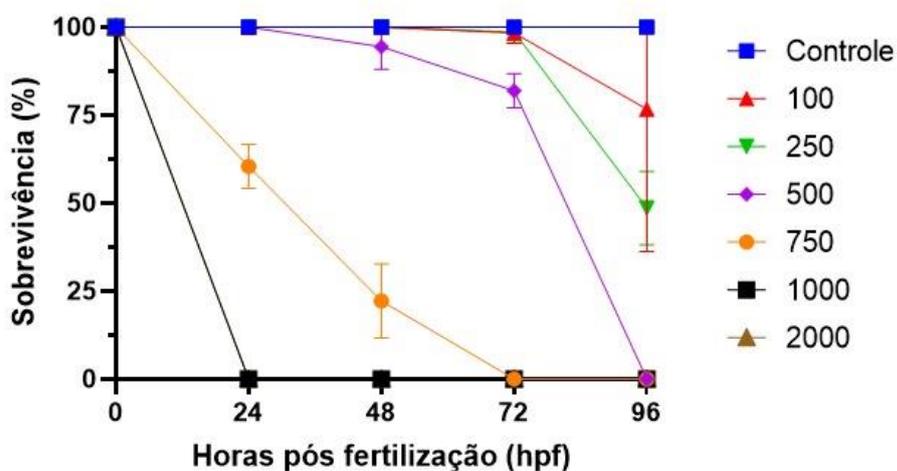
Nas primeiras 24 horas de exposição, as concentrações de 1.000 e 2.000 µg/ml demonstraram uma taxa de mortalidade de 100%, sendo classificadas como doses letais. Conforme o esperado, dada a alta concentração das mesmas. Na dosagem de 750 µg/ml, a taxa de mortalidade atingiu 100% às 96 hpf, entretanto, desde as primeiras 24 hpf já foi constatada mortalidade e os sobreviventes apresentaram alterações morfológicas (22,6% com retardo no crescimento e 21,3% com lordose), indicando que a dose seja teratogênica (Fakri et al., 2020; Shen et al., 2023).

A concentração de 500 µg/ml resultou em alterações morfológicas na maioria dos embriões nas primeiras 24 horas de exposição (68% dos embriões com retardo no crescimento), às 72 hpf 25% dos embriões já haviam perecido e os remanescentes apresentaram anormalidades (57,3% apresentaram retardo no crescimento e 6,7% edema de pericárdio), às 96 hpf a taxa de mortalidade alcançou 100%. Apesar de apresentar valores menores que a dose de 750 µg/ml é igualmente teratogênica (Marinho et al., 2022; Zian et al., 2022).

Em contraste, os embriões expostos à dosagem de 100 µg/ml exibiram respostas semelhantes aos do grupo controle em todos os intervalos analisados, com alta taxa de sobrevivência e normalidade no desenvolvimento. A dosagem de 250 µg/ml também apresentou respostas semelhantes ao grupo controle. Contudo, a partir das 72 hpf, observaram-se alterações morfológicas na maioria dos embriões (26,7% exibiram lordose, 4% manifestaram edema de pericárdio, e 6,7% apresentaram retardo no crescimento), e às 96 hpf 50% atingiram a mortalidade. O Gráfico 1, gerado pelo GraphPad Prism, ilustra as variações ao longo do tempo para todas as dosagens avaliadas.

Esses resultados destacam a variabilidade nas respostas dos embriões às diferentes concentrações, evidenciando efeitos como eclosão, retardo no crescimento, lordose e edema de pericárdio em diversos estágios do desenvolvimento embrionário, alterações similares com a de outros trabalhos utilizando o mesmo modelo biológico para avaliação de toxicidade de plantas medicinais (Alafiatayo et al., 2019; Chahardehi et al., 2020; Singulani et al., 2018).

Gráfico 1 – Embriotoxicidade do extrato bruto etanólico de *S. sellowiana*



Fonte: Da Autora, 2023 (William UFLA)

As doses seguras para uso no presente estudo foram estabelecidas em 100 e 250 µg/ml. Cabe destacar que, até o momento, não foram identificados estudos publicados relacionados à planta específica utilizada neste trabalho. No entanto, foram encontrados cinco trabalhos científicos abordando plantas do mesmo gênero, estes empregaram ratos como modelo animal e, de maneira análoga, administraram doses equivalentes das folhas das plantas *S. angustifolia*, *S. cayennensis* e *S. jamaicensis* para avaliação da toxicidade das mesmas.

A análise comparativa dos resultados obtidos neste estudo com os cinco trabalhos existentes revelou similaridades significativas, mesmo com as potenciais variações na resposta toxicológica entre diferentes espécies de animais e plantas utilizadas nos estudos. Sendo que a *S. angustifolia* apresentou doses abaixo de 50 µg/ml como dose segura, a *S. jamaicensis* com doses abaixo de 75 µg/ml e a *S. cayennensis*, apresentando a maior margem de segurança, com doses abaixo de 750 µg/ml (Ataman et al., 2006; Idu et al., 2006; Laryea and Borquaye, 2021; Ogonnia et al., 2009; Olayode et al., 2020).

Adicionalmente, uma revisão de literatura abrangente identificou outros 22 trabalhos publicados que empregaram plantas medicinais e o modelo zebrafish. Destaca-se que o primeiro trabalho desse tipo foi publicado em 2018, sugerindo que o uso do modelo zebrafish para avaliação toxicológica de plantas medicinais é uma abordagem relativamente recente. Contudo, o crescente número de publicações desde então demonstra o potencial promissor desse modelo para pesquisas nesse contexto.

## **5.2. Levantamento da ocorrência geográfica**

A planta objeto desta pesquisa, embora não tenha sido previamente documentada em estudos científicos, apresenta descrições em repositórios de flora brasileira. Nestas fontes, a planta é caracterizada como endêmica, sugerindo uma distribuição restrita a uma única área geográfica específica, reconhecida como região da Serra do Espinhaço Meridional (Cardoso et al., 2019; SiBBr, 2008).

No entanto, observações de campo realizadas durante este estudo revelaram a presença da planta em locais além daqueles inicialmente indicados pelos registros e uma incoerência entre os próprios registros, apontando a existência da mesma em 10 municípios diferentes no Estado de Minas Gerais, dentre estes, nem todos estão localizados na região descrita como

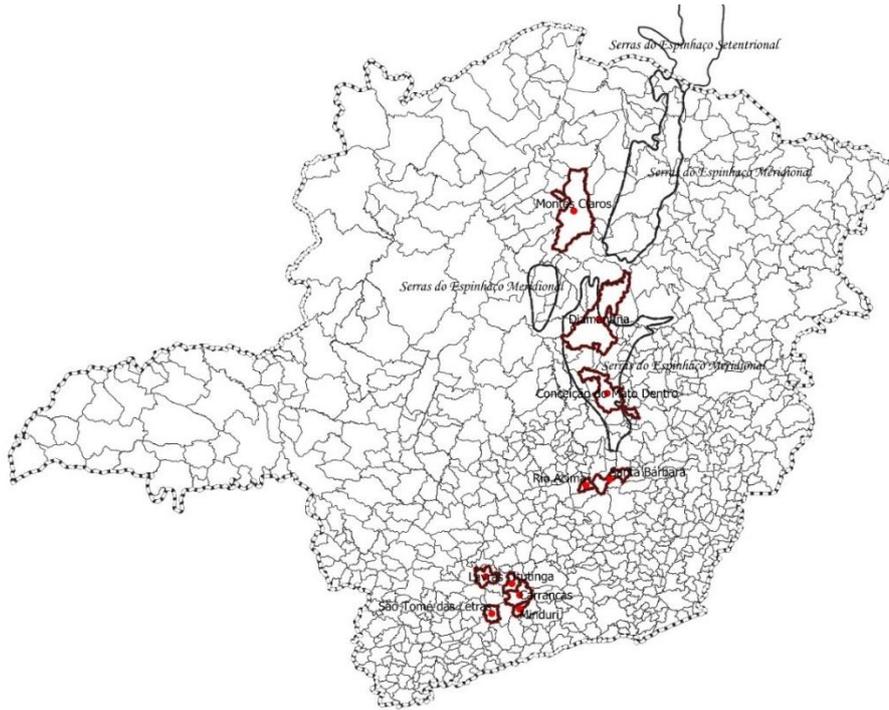
endêmica (De Melo et al., 2010; De Oliveira, 2022; SiBBr, 2008).

Para validar e mapear a distribuição real da planta, foram coletados dados de ocorrência da espécie, e uma cartografia dos locais de ocorrência foi gerado (Figura 6), apresentando tanto os pontos em que a planta foi identificada, quanto a delimitação da área previamente designada como restrita (área demarcada no mapa, contornada em preto). Dos 10 pontos de ocorrência, apenas 3 estavam localizados dentro da área de endemismo.

A análise da Figura 6 evidencia que a distribuição geográfica da planta ultrapassa significativamente os limites inicialmente estabelecidos. Os pontos de ocorrência estendem-se para além da área considerada endêmica. Sendo assim, outro mapa foi gerado (Figura 7) com a intenção de incorporar informações adicionais sobre os biomas de ocorrência, já que no levantamento inicial, a planta era descrita como restrita a um único tipo fitofisionômico do bioma Cerrado, o Campo Rupestre (De Oliveira, 2022).

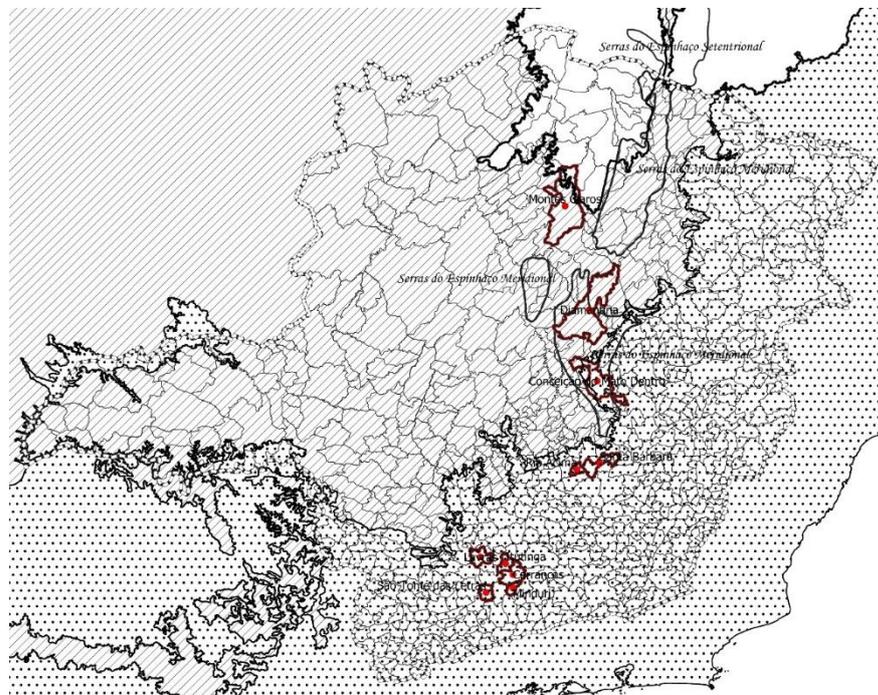
Surpreendentemente a planta foi identificada também em Mata Atlântica (demarcada no mapa por pontos), além do Cerrado (demarcado por traços). A presença dela em ambos os biomas evidenciaria uma notável adaptação, já que são dois ambientes tão distintos.

Figura 6 – Cartografia dos locais de ocorrência da *S. sellowiana* e da Cadeia do Espinhaço



Fonte: Da Autora, 2022 (Dmitri, Pedro e Gavilanis UFLA)

Figura 7 – Cartografia dos biomas de ocorrência da *S. sellowiana*



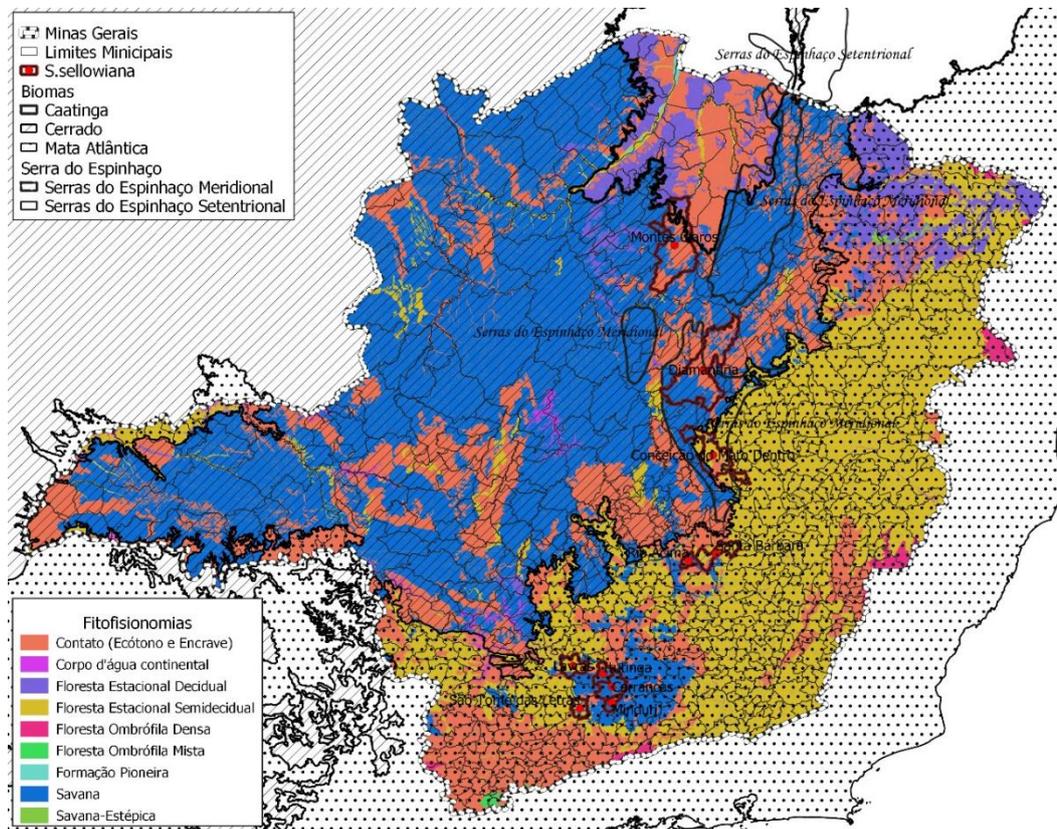
Fonte: Da Autora, 2022 (Dmitri, Pedro e Gavilanis UFLA)

Para melhor esclarecimento dessa provável adaptação, outro mapa foi criado, com a intenção de delimitar melhor essas nuances entre biomas. Neste (Figura 8) os tipos

fitofisionômicos foram avaliados, elucidando que a espécie em questão não está inserida no bioma Mata Atlântica e sim no Ecótono, área de transição entre Mata Atlântica e Cerrado. Não obstante foi possível registrar a presença da espécie em mais duas fitofisionomias: Savana e Floresta Estacional Semidecidual.

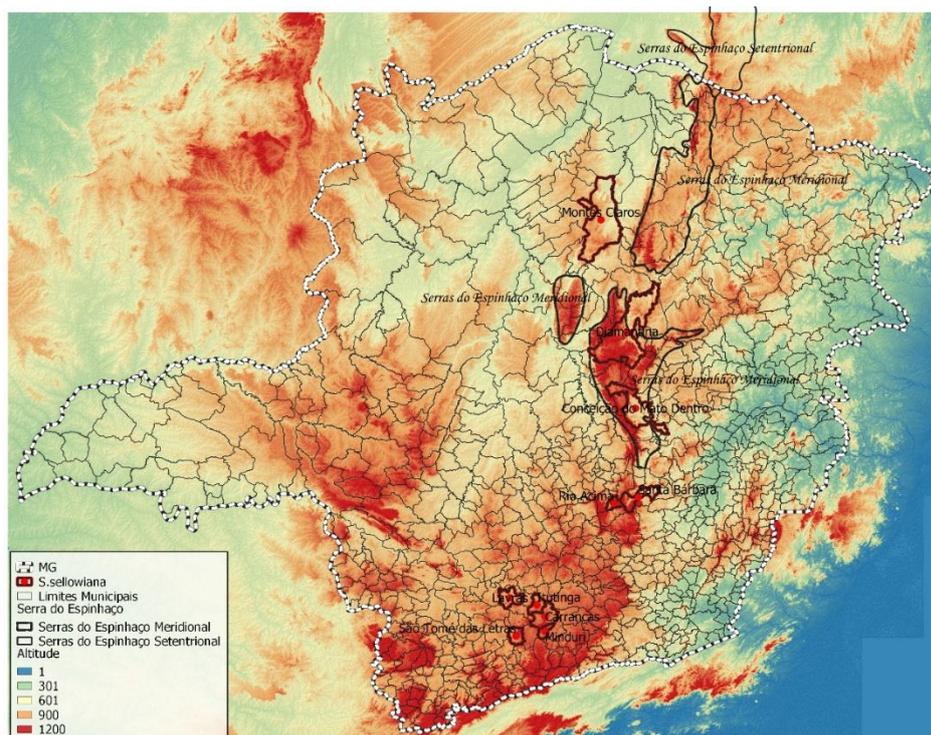
A planta também é descrita como endêmica à altitudes superiores a 900 metros. Outro mapa (Figura 9) foi criado com a intenção de avaliar essa informação, considerando a altitude dos locais de ocorrência. Sendo possível confirma-la, indicando que a planta está restrita a altitudes acima de 900 metros.

Figura 8 – Tipos fitofisionômicos e ocorrência da *S. sellowiana*



Fonte: Da Autora, 2022 (Dmitri, Pedro e Gavilanis UFLA)

Figura 9 – Altitudes e ocorrência da *S. sellowiana*



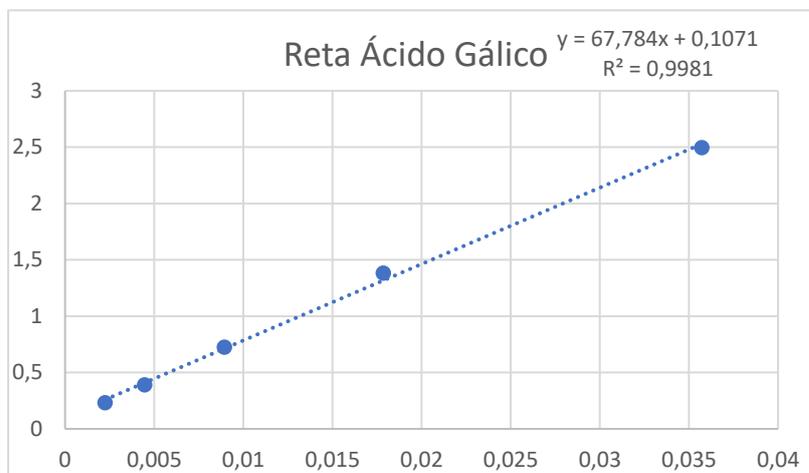
Fonte: Da Autora, 2022 (Dmitri, Pedro e Gavilanis UFPA)

É relevante ressaltar que, dentre as características inicialmente atribuídas à planta, a restrição altitudinal foi a única confirmada pelo estudo. As demais informações, tanto sobre a distribuição geográfica quanto sobre a fitofisionomia, não corroboram os dados pré-existentes nos repositórios de flora brasileira.

### 5.3. Quantificação de polifenóis totais e flavonóides

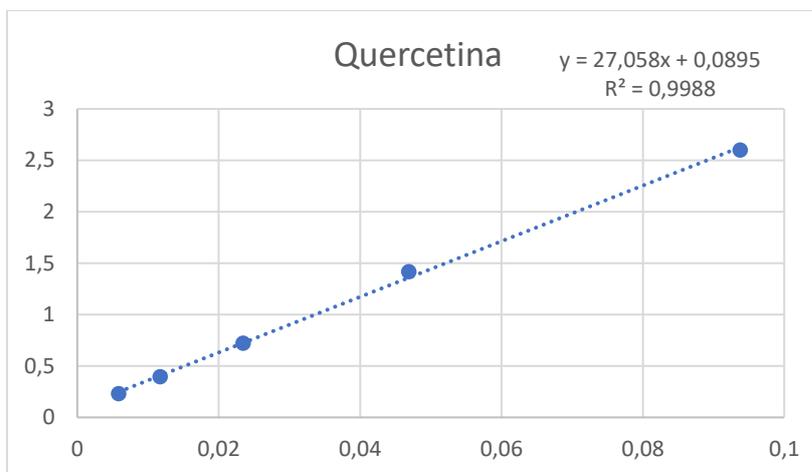
A construção das curvas de calibração, fundamentais para a determinação precisa das concentrações, revelou uma relação linear entre absorvância e concentração para ambos os grupos de metabólitos ( $R^2 = 0,9981$  para compostos fenólicos e  $R^2 = 0,9988$  para flavonoides). A equação de regressão linear média para compostos fenólicos foi  $y = 67,784x + 0,1071$ , onde  $y$  é a absorvância e  $x$  a concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) em equivalente de ácido gálico (GRÁFICO 2). Analogamente, a equação de regressão linear média para flavonoides foi  $y = 27,058x + 0,0895$ , em equivalente de quercetina (GRÁFICO 3).

Gráfico 2 - Curva de calibração para compostos fenólicos



Fonte: Da Autora, 2022 (João Pedro UFLA)

Gráfico 3 - Curva de calibração para flavonóides



Fonte: Da Autora, 2022 (João Pedro UFLA)

A busca por flavonoides e fenóis fundamentou-se na descrição desses compostos no gênero da planta, conforme documentado na literatura científica. No extrato etanólico bruto de *Stachytarpheta sellowiana* foram encontradas  $15,03 \pm 0,28$  de Polifenóis (mg Eq. AG /g de extrato) e  $9,61 \pm 0,31$  de Flavonóides (mg Eq. Q/g de extrato). A detecção e quantificação destacam o potencial fitoquímico da planta, sugerindo possíveis benefícios para a saúde associados à presença dos mesmos. No entanto, é crucial considerar que a concentração específica desses compostos pode variar entre diferentes partes da planta, estágios de desenvolvimento e condições de crescimento (Abril-Saltos et al., 2017; Adebajo et al., 2007;

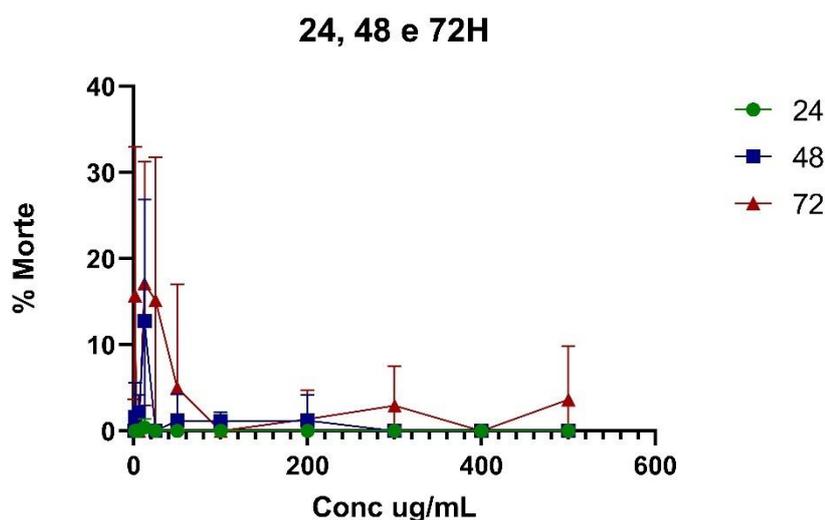
Cardoso et al., 2018).

A investigação da toxicidade do extrato etanólico bruto da planta foi conduzida em paralelo à quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides. Embora a presença desses metabólitos seja indicativa de propriedades benéficas à saúde em concentrações moderadas, é possível que em doses mais elevadas sejam os responsáveis pelos sinais de toxicidade, já que alguns polifenóis podem exibir propriedades pró-oxidantes, contribuindo para o estresse oxidativo e desencadeando eventos tóxicos. A correlação entre a concentração dos metabólitos e a toxicidade é uma relação complexa, sendo de suma importância prosseguir com estudos que a elucidem (Abrão et al., 2022; Abutaha et al., 2018).

#### 5.4. Testes de viabilidade

Os resultados da avaliação da atividade leishmanicida da planta sob a cepa de *Leishmania amazonensis* revelaram a ausência de efeito letal sobre essa espécie específica (GRÁFICO 4). É importante ressaltar que a não letalidade para *L. amazonensis* não exclui a possibilidade de atividade leishmanicida frente a outras espécies do gênero *Leishmania*, dada a diversidade existente entre elas (Braga et al., 2007; Cecílio et al., 2022).

Gráfico 4 – CL<sub>50</sub> da *L. Amazonensis* frente ao extrato bruto etanólico de gervão roxo



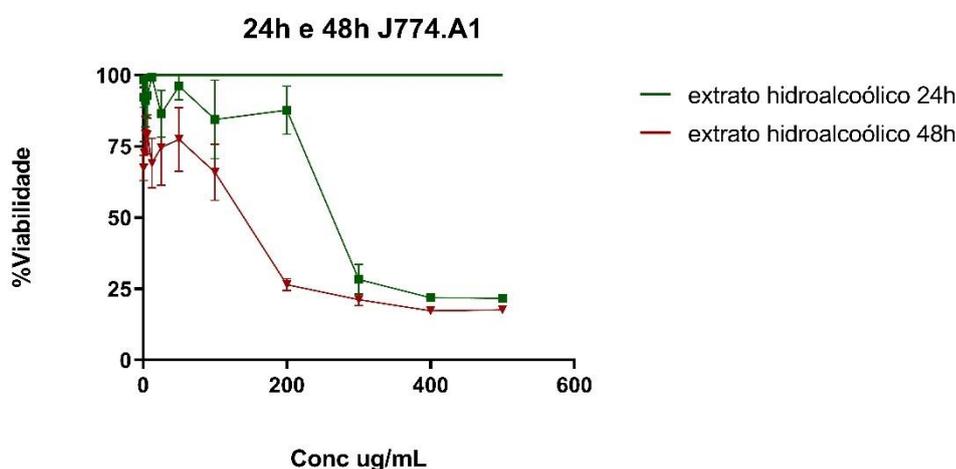
Fonte: Da Autora, 2023 (Renata UFOP)

Portanto sugere-se que o extrato continue sendo estudado para elucidar se a planta possui capacidade de inibir o desenvolvimento de outras espécies de *Leishmania*, contribuindo

assim para o avanço no entendimento do seu potencial terapêutico frente a diferentes formas da doença.

A avaliação da viabilidade de macrófagos murinos expostos a diferentes dosagens da substância em estudo revelou resultados significativos. Nas dosagens inferiores a 250, observou-se que os macrófagos mantiveram uma elevada porcentagem de viabilidade, indicando a segurança nessas condições experimentais, entretanto à medida que as dosagens foram aumentadas, uma tendência de decréscimo na viabilidade dos macrófagos tornou-se evidente (GRÁFICO 5).

Gráfico 5 - Teste de viabilidade de macrófagos murinos



Fonte: Da Autora, 2023 (Renata UFOP)

Esse declínio observado, de forma crescente, sugere uma relação direta entre a concentração da substância e o impacto na viabilidade celular. Esses achados estão em consonância com os testes de embriotoxicidade, indicando uma correlação entre a concentração da substância e seus efeitos sobre a viabilidade celular. A resposta dos macrófagos murinos sugere que, em dosagens mais elevadas, a substância pode apresentar efeitos adversos sobre essas células, comprometendo sua viabilidade.

## 6. CONCLUSÃO

A presente dissertação ofereceu uma abordagem inovadora ao empregar o modelo zebrafish para investigações envolvendo plantas medicinais. Apesar de sua recente introdução nesse contexto, essa estratégia revelou-se extremamente valiosa, fornecendo

perspectivas promissoras para futuras pesquisas no campo da fitoterapia.

A interseção entre a sensibilidade dos embriões de zebrafish, bem como a facilidade da obtenção dos resultados e as propriedades fitoquímicas das plantas medicinais oferece um terreno fértil para explorar novas possibilidades terapêuticas. Os resultados de viabilidade de macrófagos murinos corroborou ainda mais para a comprovação de sua eficácia.

A análise estatística das doses tóxicas e não tóxicas corrobora a importância de definir limites seguros para a utilização do extrato, considerando não apenas a presença de metabólitos específicos, mas também suas concentrações relativas. É importante ressaltar que há outros componentes no extrato, cuja influência na toxicidade requer investigação mais aprofundada.

Estes achados destacam a importância de uma abordagem cautelosa ao explorar o potencial terapêutico de extratos vegetais, especialmente no que diz respeito à dose e à composição específica dos compostos presentes, já que a compreensão da toxicidade demanda uma análise holística, considerando a interação complexa entre os diversos constituintes do fitocomplexo.

A resistência da cepa *L. amazonensis* às doses testadas não exclui o potencial leishmanicida da planta, mas ressalta a diversidade de espécies de *Leishmania* e a importância de considerar tais nuances nas investigações sobre leishmaniose cutânea e visceral.

A discrepância observada entre as cartografias geradas e as informações contidas na base de dados da Flora Nacional destaca a necessidade premente de revisão e atualização constante dessas bases, bem como de maiores investimentos na pesquisa da biodiversidade brasileira, já que há tanto potencial farmacológico subjugado neste país.

Esta dissertação não apenas contribui de maneira significativa para o campo da pesquisa leishmanicida, fornecendo subsídios cruciais para futuros desenvolvimentos terapêuticos, mas também enriquece o entendimento sobre a influência de compostos vegetais em sistemas biológicos complexos. Concluímos, portanto, que a integração de abordagens multidisciplinares, aliada à constante revisão de bases de dados e aprofundamento na compreensão da interação entre substâncias vegetais e organismos patogênicos, é essencial para avançar no conhecimento e aplicação desses recursos na medicina humana e veterinária. Essa pesquisa abre portas para futuros estudos que aprimorem as estratégias terapêuticas e promovam o uso sustentável da biodiversidade em benefício da saúde.

## REFERÊNCIAS

- Abe, R., Ohtani, K., 2013. An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies on Batan Island, the Philippines. *J. Ethnopharmacol.* 145, 554-565.
- Abidar, S., Boiangiu, R.S., Dumitru, G., Todirascu-Ciornea, E., Amakran, A., Cioanca, O., Hritcu, L., Nhiri, M., 2020. The aqueous extract from *Ceratonia siliqua* leaves protects against 6-hydroxydopamine in zebrafish: Understanding the underlying mechanism. *Antioxidants* 9.
- Abozaid, A., Gerlai, R., 2022. Behavioral Effects of Buspirone in Juvenile Zebrafish of Two Different Genetic Backgrounds. *Toxics* 10.
- Abrão, L.D.C., Costa-Silva, D.G., Santos, M.G.D., Cerqueira, M.B.R., Badiale-Furlong, E., Muccillo-Baisch, A.L., Hort, M.A., 2022. Toxicity evaluation of traditional and organic yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) extracts. *J. Toxicol. Environ. Health Part A Curr. Iss.* 85, 461-479.
- Abril-Saltos, R., Ruiz-Vasquez, T., Alonso-Lazo, J., Cabrera-Murillo, G., 2017. Germination, seed diameter and pregerminative treatments in species with different purposes of use. *Agron. Mesoam.* 28, 703-717.
- Abutaha, N., Al-Mekhlafi, F.A., Al-Keridis, L.A., Farooq, M., Nasr, F.A., Al-Wadaan, M., 2018. Larvicidal potency of selected xerophytic plant extracts on *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Entomol. Res.* 48, 362-371.
- Adebajo, A.C., Olawode, E.O., Omobuwajo, O.R., Adesanya, S.A., Begrow, F., Elkhawad, A., Akanmu, M.A., Edrada, R., Proksch, P., Schmidt, T.J., Klaes, M., Verspohl, E.J., 2007. Hypoglycaemic constituents of *Stachytarpheta cayennensis* leaf. *PLANTA MED.* 73, 241-250.
- Adedeji, O., 2012. Systematic significance of trichomes and foliar epidermal morphology in the species of *stachytarpheta vahl.* (verbenaceae) from Nigeria. *Thaiszia J. Bot.* 22, 1-32.
- Agampodi, V.A., Katavic, P., Collet, C., Collet, T., 2022a. Antibacterial and Anti-inflammatory Activity of Extracts and Major Constituents Derived from *Stachytarpheta indica* Linn. Leaves and Their Potential Implications for Wound Healing. *Appl Biochem Biotechnol.*
- Agampodi, V.A., Katavic, P., Collet, C., Collet, T., 2022b. Antibacterial and Anti-inflammatory Activity of Extracts and Major Constituents Derived from *Stachytarpheta indica* Linn. Leaves and Their Potential Implications for Wound Healing. *Appl. Biochem. Biotechnol.*
- Agraz, A.V., Rafiq, M., Guru, B., Madan, M.N., Anturlikar, S.D., Azeemuddin, M.M., Manjula, S.N., 2021. Evaluation of immunomodulatory activity of immusante® in zebrafish. *J. Appl. Biol. Biotechnol.* 9, 75-82.

Akhtar, M.T., Mushtaq, M.Y., Verpoorte, R., Richardson, M.K., Choi, Y.H., 2016. Zebrafish as a Model for Systems Medicine R and D: Rethinking the Metabolic Effects of Carrier Solvents and Culture Buffers Determined by 1H NMR Metabolomics. *OMICS J. Integr. Biol.* 20, 42-52.

Alafiatayo, A.A., Lai, K.S., Syahida, A., Mahmood, M., Shaharuddin, N.A., 2019. Phytochemical Evaluation, Embryotoxicity, and Teratogenic Effects of *Curcuma longa* Extract on Zebrafish (*Danio rerio*). *Evid.-Based Complement. Altern. Med.* 2019.

Almeida, C.E., Karnikowski, M.G., Foletto, R., Baldisserotto, B., 1995a. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev Saude Publica* 29, 428-433.

Almeida, C.E., Karnikowski, M.G.O., Foletto, R., Baldisserotto, B., 1995b. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *REV. SAUDE PUBLICA* 29, 428-433.

ANVISA, 2022. Orientações sobre o uso de fitoterápicos e plantas medicinais (accessed 05/09 2022).

Ataman, J.E., Idu, M., Odiya, E.A., Omogbai, E.K.I., Amaechina, F., Akhigbe, A.O., Ebite, L.E., 2006. Histopathologic effects of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. on Wistar rats. *Pak. J. Biol. Sci.* 9, 477-482.

Atay, I., Kirmizibekmez, H., Kaiser, M., Akaydin, G., Yesilada, E., Tasdemir, D., 2016. Evaluation of in vitro antiprotozoal activity of *Ajuga laxmannii* and its secondary metabolites. *Pharm. Biol.* 54, 1808-1814.

Atkins, S., 2005. The genus *Stachytarpheta* (Verbenaceae) in Brazil. *Kew Bull.* 60, 161-272.

Aumeeruddy, M.Z., Mahomoodally, M.F., 2021. Traditional herbal medicines used in obesity management: A systematic review of ethnomedicinal surveys. *J. Herbal Med.* 28.

Balkrishna, A., Halder, S., Singh, H., Roy, P., Varshney, A., 2021. Coronil, a tri-herbal formulation, attenuates spike-protein-mediated sars-cov-2 viral entry into human alveolar epithelial cells and pro-inflammatory cytokines production by inhibiting spike protein-ace-2 interaction. *J. Inflamm. Res.* 14, 869-884.

Braga, F.G., Bouzada, M.L.M., Fabri, R.L., de O. Matos, M., Moreira, F.O., Scio, E., Coimbra, E.S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 111, 396-402.

Brasil, F.d., 2020. *Stachytarpheta*. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB21466> (accessed 30/08 2022).

Cabral, A., Dos Reis Valério, V.I., Salimena, F.R.G., 2018. Verbenaceae in the Serra Negra, Minas Gerais, Brazil Pedro Henrique Cardoso. *Rodriguesia* 69, 777-786.

- Cardos, P.H., Lima, L.V., Dittrich, V.A.D., Salimena, F.R.G., 2019. Typifications and additional taxonomic notes in Brazilian *Stachytarpheta* (Verbenaceae). *Phytotaxa* 411, 223-229.
- Cardoso, P.H., Cabral, A., Santos-Silva, F., Salimena, F.R.G., 2020a. Verbenaceae in the parque nacional da serra da canastra, Minas Gerais, Brazil. *Rodriguesia* 71.
- Cardoso, P.H., Dos Reis Valério, V.I., Neto, L.M., Gonçalves Salimena, F.R., 2021. Verbenaceae in Espírito Santo, Brazil: Richness, patterns of geographic distribution and conservation. *Phytotaxa* 484, 1-43.
- Cardoso, P.H., Menini Neto, L., Salimena, F.R.G., 2020b. Taxonomic notes on *Stachytarpheta* (Verbenaceae) from Brazil. *Kew Bull.* 75.
- Cardoso, P.H., Moroni, P., Antar, G.M., Menini Neto, L., Trovó, M., 2022. Two new Brazilian species of Verbenaceae from the Espinhaço Range: *Stachytarpheta olearyana* and *S. vianae*. *Kew Bull.*
- Cardoso, P.H., Neto, L.M., Salimena, F.R.G., 2019. *Stachytarpheta grandiflora*, a new species of verbenaceae from the Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brazil. *Phytotaxa* 413, 61-66.
- Cardoso, P.H., O'Leary, N., Salimena, F.R.G., 2018. Flora of the canga of the Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Verbenaceae. *Rodriguesia* 69, 1397-1403.
- Cecílio, P., Cordeiro-da-Silva, A., Oliveira, F., 2022. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. *Commun. Biolog.* 5.
- Certo, G., Costa, R., D'Angelo, V., Russo, M., Albergamo, A., Dugo, G., Germanò, M.P., 2017. Anti-angiogenic activity and phytochemical screening of fruit fractions from *Vitex agnus castus*. *Nat. Prod. Res.* 31, 2850-2856.
- Chahardehi, A.M., Arsad, H., Lim, V., 2020. Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. *Plants* 9, 1-35.
- Chowdhury, R., Rashid, M.U., Khan, O.F., Hasan, C.M., 2004. Bioactivity of extractives from *Stachytarpheta urticaefolia*. *Pharm. Biol.* 42, 262-267.
- Cruz, L.V.V., Salimena, F.R.G., 2017. Verbenaceae J. St.-Hil. do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. *Boletim de Botânica* 35, 65-74.
- Da Silva, B.J.M., Hage, A.A.P., Silva, E.O., Rodrigues, A.P.D., 2018. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. *J. Integr. Med.* 16, 211-222.

Da Silva, D.X., De Souza, M.W., Corrêa, C.D.S., Moya, H.D., 2013. A critical study of use of the Fe(II)/3-hydroxy-4-nitroso-2,7-naphthalenedisulfonic acid complexes in the quantification of polyphenols in medicinal plants. *Food Chem.* 138, 1325-1332.

De Melo, J.I.M., Alves, I.M., de Sousa, R.T.M., Barbosa, L.M.M.A., de Andrade, W.M., 2010. *Verbenaceae Sensu Lato In A Stretch At The Esec Raso Da Catarina, Bahia, Brazil. Rev. Caatinga* 23, 41-47.

De Oliveira, T. 2022. Propagação, anatomia e cultivo em malhas coloridas de *Stachytarpheta sellowiana* Schauer: uma planta medicinal ameaçada de extinção. Doutorado, Universidade Federal de Lavras.

Duret, S., Jacquemin, H., Paris, R.R., 1976. Madagascan plants XIX. Chemical composition of *Stachytarpheta jamaicensis* (L) Vahl (=S. indica Vahl), Verbenaceae. *PLANT. MED. PHYTOTHER.* 10, 96-104.

Erber, A.C., Sandler, P.J., de Avelar, D.M., Swoboda, I., Cota, G., Walochnik, J., 2022. Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) protocols: a systematic review and meta-analysis. *Parasites Vectors* 15.

Fakri, F., Idrus, L.S., Iskandar, M.A., Wibowo, I., Adnyana, I.K., 2020. Acute toxicity of *Keladi Tikus* (*typhonium flagelliforme* (Lodd.) blume) ethanol extract on Zebrafish (*Danio Rerio*) embryo in Vivo. *Indones. J. Pharm.* 31, 297-304.

Ferreira, D.Q., Ferraz, T.O., Araújo, R.S., Cruz, R.A.S., Fernandes, C.P., Souza, G.C., Ortiz, B.L.S., Sarquis, R.S.F.R., Miranda, J.C.M.M., Garrett, R., Carvalho, J.C.T., Oliveira, A.E.M.F.M., 2019. *Libidibia ferrea* (Jucá), a traditional anti-inflammatory: A study of acute toxicity in adult and embryos zebrafish (*danio rerio*). *Pharmaceuticals* 12.

Gouri, V., Upreti, S., Samant, M., 2022. Evaluation of target-specific natural compounds for drug discovery against Leishmaniasis. *Parasitol. Int.* 91.

Harley, R.M., Atkins, S., 1996. *Stachytarpheta caracana* (Verbenaceae) an invalidly published name for a forgotten Brazilian *Hyptis* (Labiatae). *Kew Bull.* 50, 591-594.

Ibarra-Meneses, A.V., Corbeil, A., Wagner, V., Onwuchekwa, C., Fernandez-Prada, C., 2022. Identification of asymptomatic *Leishmania* infections: a scoping review. *Parasites Vectors* 15.

IBGE, 2022. Minas Gerais (accessed 26/08 2022).

Idu, M., Ataman, J.E., Akhigbe, A.O., Omogbai, E.K.I., Amaechina, F., Odi, E.A., 2006. Effect of *Stachytarpheta jamaicensis* L. (Vahl.) on Wistar rats: Serum biochemistry and ultrasonography. *J. Med. Sci. (Pakistan)* 6, 646-649.

Kirmizibekmez, H., Çalis, I., Perozzo, R., Brun, R., Dönmez, A.A., Linden, A., Rüedi, P., Tasdemir, D., 2004. Inhibiting activities of the secondary metabolites of *Phlomis*

brunneogaleata against parasitic protozoa and plasmodial enoyl-ACP reductase, a crucial enzyme in fatty acid biosynthesis. *PLANTA MED.* 70, 711-717.

Kumari, D., Mahajan, S., Kour, P., Singh, K., 2022. Virulence factors of *Leishmania* parasite: Their paramount importance in unraveling novel vaccine candidates and therapeutic targets. *Life Sci.* 306.

Kvist, L.P., Christensen, S.B., Rasmussen, H.B., Mejia, K., Gonzalez, A., 2006. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.* 106, 390-402.

Laryea, M.K., Borquaye, L.S., 2021. Antimalarial, Antioxidant, and Toxicological Evaluation of Extracts of *Celtis africana*, *Grosseria vignei*, *Physalis micrantha*, and *Stachytarpheta angustifolia*. *Biochem. Res. Int.* 2021, 10.

Maquiaveli, C.C., Lucon-Júnior, J.F., Brogi, S., Campiani, G., Gemma, S., Vieira, P.C., Silva, E.R., 2016. Verbascoside Inhibits Promastigote Growth and Arginase Activity of *Leishmania amazonensis*. *J. Nat. Prod.* 79, 1459-1463.

Marinho, T.A., Guimarães, R.A., Nunes, P.S., Junior, R.S.L., Reis, P.R.M., Machado, M.R.F., Silva, N.J., 2022. Evaluation of angiogenic and embryotoxic activity of *Anadenanthera peregrina* extract (angico-do-Cerrado). *Rev. Cuba. Plantas Med.* 27.

Mazire, P.H., Saha, B., Roy, A., 2022. Immunotherapy for visceral leishmaniasis: A trapeze of balancing counteractive forces. *Int. Immunopharmacol.* 110.

Moreira, R.C.R., Costa, G.C., Lopes, T.C., Bezerra, J.L., Guerra, R.N.M., Rebêlo, J.M.M., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., Costa, J.M.L., 2007. "In vitro leishmanicidal effect of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae)". *Rev. Brasileira Farmacognosia* 17, 59-63.

Ogbonnia, S.O., Nkemhule, F.E., Anyika, E.N., 2009. Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Stachytarpheta angustifolia* (Mill) Vahl (Fam. Verbanaceae) extract in animals. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 1793-1799.

Olayode, O.A., Daniyan, M.O., Olayiwola, G., 2020. Biochemical, hematological and histopathological evaluation of the toxicity potential of the leaf extract of *Stachytarpheta cayennensis* in rats. *J. Tradit. Complement. Med.* 10, 544-554.

QGIS, 2014. Quantum GIS (accessed 26/08 2022).

Ribeiro, J.F., Walter, B.M.T., 1998. *Fitofisionomias do bioma Cerrado*.

Ribeiro, J.F.W., B.M.T., 2008. *Principais fitofisionomias do Bioma Cerrado* (accessed 02/08 2022).

Saúde, M.d., 2006. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf) (accessed 20/08 2022).

Shen, Y., Sheng, R., Guo, R., 2023. Application of Zebrafish as a Model for Anti-Cancer Activity Evaluation and Toxicity Testing of Natural Products. *Pharmaceuticals* 16.

SiBBR, 2008. *Stachytarpheta sellowiana*. [https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/369099?lang=pt\\_BR](https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/369099?lang=pt_BR) (accessed 19/07 2022).

Singulani, J.L., Pedroso, R.S., Ribeiro, A.B., Nicolella, H.D., Freitas, K.S., Damasceno, J.L., Vieira, T.M., Crotti, A.E.M., Tavares, D.C., Martins, C.H.G., Mendes-Giannini, M.J.S., Pires, R.H., 2018. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. *Future Microbiol.* 13, 1637-1646.

Vásquez-Ocmín, P., Cojean, S., Rengifo, E., Suyyagh-Albouz, S., Amasifuen Guerra, C.A., Pomel, S., Cabanillas, B., Mejía, K., Loiseau, P.M., Figadère, B., Maciuk, A., 2018. Antiprotozoal activity of medicinal plants used by Iquitos-Nauta road communities in Loreto (Peru). *J. Ethnopharmacol.* 210, 372-385.

Zainol Abidin, I.Z., Fazry, S., Jamar, N.H., Ediwar Dyari, H.R., Zainal Ariffin, Z., Johari, A.N., Ashaari, N.S., Johari, N.A., Megat Abdul Wahab, R., Zainal Ariffin, S.H., 2020. The effects of *Piper sarmentosum* aqueous extracts on zebrafish (*Danio rerio*) embryos and caudal fin tissue regeneration. *Sci. Rep.* 10.

Zappi, D.C., Lucas, E., Stannard, B.L., Lughadha, E.N., PIRANI, J.R., DE QUEIROZ, L.P., Atkins, S., HIND, D.N., Giuliatti, A.M., HARLEY, R.M., 2003. Lista das plantas vasculares de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, 345-398.

Zian, N.F.A.M., Swain, P., Faudzi, S.M.M., Zakaria, N., Ibrahim, W.N.W., Bakar, N.A., Shaari, K., Stanslas, J., Choi, T.I., Kim, C.H., 2022. Mapping Molecular Networks within *Clitoria ternatea* Linn. against LPS-Induced Neuroinflammation in Microglial Cells, with Molecular Docking and In Vivo Toxicity Assessment in Zebrafish. *Pharmaceuticals* 15.