



KIARA CÂNDIDO DUARTE DA SILVA

**EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus*
EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

**LAVRAS-MG
2023**

KIARA CÂNDIDO DUARTE DA SILVA

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* EM ZEBRAFISH
(*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, área de
concentração Ciências Veterinárias
para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

Dra. Tássia Flávia Dias Castro
Coorientadora

Dr. William Franco Carneiro
Coorientador

**LAVRAS-MG
2023**

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

Silva, Kiara Cândido Duarte da.

Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em
zebrafish (*Danio rerio*) / Kiara Cândido Duarte da Silva. - 2023.
102 p. : il.

Orientador(a): Luis David Solis Murgas.

Coorientador(a): Tássia Flávia Dias Castro, William Franco
Carneiro.

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

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Toxicidade. 3. Zebrafish. I. Murgas,
Luis David Solis. II. Castro, Tássia Flávia Dias. III. Carneiro,
William Franco. IV. Título.

KIARA CÂNDIDO DUARTE DA SILVA

**EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* EM ZEBRAFISH
(*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, área de
concentração Ciências Veterinárias
para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 30 de janeiro de 2023.

Profa. Dra. Mônica Rodrigues Ferreira Machado UFJ
Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira UFLA
Dra. Juliana Tensol Pinto UFLA

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas
Orientador

Dra. Tássia Flávia Dias Castro
Coorientadora

Dr. William Franco Carneiro
Coorientador

**LAVRAS-MG
2023**

À Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele eu nada posso fazer e Nossa Senhora Aparecida por me proteger e iluminar e a minha família que sempre está comigo e acredita no meu potencial. Tudo o que eu faço é por vocês
Com todo o meu coração e profunda gratidão,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à Deus pelo dom da vida, por ser minha fortaleza e me sustentar até aqui e Nossa Senhora Aparecida, minha mãezinha, que sempre me iluminou e me cobriu com o seu Manto Sagrado.

Aos meus pais, Vanderleia e Cláudio e meu irmão Adriel por todo amor, carinho, incentivo e que não pouparam esforços para que mais uma etapa do meu sonho tornasse realidade. Vocês são meu alicerce, minha vida! Amo vocês para sempre!

Ao meu namorado Alexandre, pelo amor, carinho, amizade, cumplicidade e pelo incentivo. Obrigada por tudo!

A minha afilhada, Júlia, pelos abraços e beijos apertados toda vez que voltava para casa, recarregando minhas forças. Você é meu coração fora do peito, a dindinha te ama para sempre!

A minha amiga, colega de profissão e irmã de coração Bárbara, por todo carinho, amizade, companheirismo, ensinamentos, incentivo e apoio. Amo você amore!

As minhas amigas, Lourdes e Andressa, que moram comigo, por me proporcionarem momentos inesquecíveis e se tornarem minha família em Lavras.

Ao meu amigo João Paulo que foi um anjo enviado por Deus para que a trajetória mesmo árdua ficasse mais fácil ao lado dele. Obrigada por tudo amigo, amo você!!

Ao professor, pai cientista e orientador Dr. Luis David Solis Murgas que admiro como pessoa e profissional, por todo apoio, incentivo, ajuda, oportunidade, por confiar em mim e no meu trabalho mesmo quando eu mesma não acreditava e, sobretudo pela amizade durante esses anos.

Aos meus coorientadores Dra. Tássia Flávia Dias Castro e Dr. William Franco Carneiro, pela excelente orientação, sempre estiveram presente durante a execução do trabalho me dando todo suporte, atenção, apoio, incentivo e acreditando no meu potencial. Vocês são muito importantes para mim!

Aos meus colegas de trabalho do biotério por todo carinho, amizade, compreensão, auxílio e ajuda na minha vida acadêmica e por me incentivarem a ir em busca dos meus sonhos. Vocês fizeram total diferença na minha jornada!

À Universidade Federal de Lavras por dispor de infraestrutura e profissionais de alta competência para minha formação acadêmica. À Rede Mineira de Bioterismo, FAPEMIG e CAPES pela colaboração e apoio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com o meu crescimento pessoal e profissional e me ajudaram a concluir mais essa etapa.

GRATIDÃO!!!

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará.

Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranqüilas.
Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do seu nome.

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum,
porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.

Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha
cabeça com óleo, o meu cálice transborda.

Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha
vida; e habitarei na casa do Senhor por longos dias”

Salmo 23:1-6

RESUMO

A *Cymbopogon citratus* DC. Stapf (*Poaceae*), é popularmente conhecida como capim-limão e vários atributos dessa planta já foram relatados. No entanto, o uso de seu óleo essencial (OE) em embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*) ainda é limitado. Os objetivos do presente estudo foram avaliar o potencial tóxico, anti-inflamatório, através da regeneração da nadadeira caudal, recrutamento de neutrófilos e avaliação do efeito protetor do OE da *C. citratus* contra o estresse oxidativo, apoptose e espécies reativas de oxigênio induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no zebrafish. As concentrações analisadas para os ensaios de embriotoxicidade foram 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 e 0,39 $\mu\text{g/mL}$, diluídas em dimetil sulfoxido (DMSO) a 0,5%. Vinte embriões foram submetidos aos seus tratamentos em placas de 96 poços e analisados até 120 horas pós-fertilização (hpf). Um pool de quarenta larvas por tratamento expostas por até 96 hpf foram utilizadas para as análises das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione s-transferase (GST). Para a identificação de células apoptóticas, foram utilizadas 20 larvas de 72 hpf, que foram coradas com laranja de acridina (AO) por 20 minutos. Para os demais testes, foram testadas cinco concentrações (6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 $\mu\text{g/mL}$) e seus efeitos foram analisados na migração de neutrófilos, regeneração da nadadeira caudal, atividade das enzimas, apoptose e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), em embriões e larvas de zebrafish expostos ao H_2O_2 . O OE apresentou toxicidade nas concentrações de 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ a 24 e 72 hpf, respectivamente. A concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ causou mortalidade de 70%. A concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ causou efeitos teratogênicos. Em comparação com o controle, a atividade de SOD apresentou uma redução significativa em concentrações superiores a 0,78 $\mu\text{g/mL}$, e concentrações superiores a 1,56 $\mu\text{g/mL}$ resultaram em uma redução significativa na atividade de CAT. Houve uma redução significativa na migração de neutrófilos em todos os tratamentos com OE, quando comparados com os do grupo controle. As maiores concentrações de OE (3,12 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram uma redução significativa do processo de regeneração da nadadeira caudal. Além disso, foi observada uma redução significativa da atividade da SOD em todas as concentrações do OE. A atividade da CAT foi significativamente menor no grupo 3,12 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, a atividade da GST aumentou significativamente nos grupos 0,78 e 1,56 $\mu\text{g/mL}$, quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença significativa na produção de ROS. Uma redução da apoptose celular foi observada em todas as concentrações do OE, quando comparadas com o controle H_2O_2 . Os resultados dos estudos indicam que o OE da *C. citratus* nas maiores concentrações causou efeitos tóxicos e teratogênicos em embriões e larvas de peixe-zebra. Porém, em menor concentração, o OE não apresentou toxicidade. Além disso, OE possui potencial para efeito anti-inflamatório e proteção contra formação de radicais livres.

Palavras-chave: Plantas Medicinais. Capim-limão. Toxicidade. Regeneração. Radicais Livres.

ABSTRACT

Cymbopogon citratus DC. Stapf (Poaceae), is popularly known as lemongrass and several attributes of this plant have been reported. However, the use of its essential oil (EO) in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae is still limited. The objectives of the present study were to evaluate the toxic potential, anti-inflammatory, through caudal fin regeneration, neutrophil recruitment and evaluation of the protective effect of *C. citratus* EO against oxidative stress, apoptosis and hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced reactive oxygen species in zebrafish. The concentrations analyzed for embryotoxicity assays were 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78 and 0.39 µg/mL, diluted in 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO). Twenty embryos were subjected to their treatment in 96-well plates and analyzed up to 120 hours post-fertilization (hpf). A pool of forty larvae per treatment exposed for up to 96 hpf were used for the analyses of the antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione s-transferase (GST). For the identification of apoptotic cells, 20 72 hpf larvae were used and stained with acridine orange (AO) for 20 minutes. For the other tests, five concentrations (6.25; 3.12; 1.56; 0.78; 0.39 µg/mL) were tested and their effects were analyzed on neutrophil migration, caudal fin regeneration, enzyme activity, apoptosis, and the production of reactive oxygen species (ROS), in zebrafish embryos and larvae exposed to H₂O₂. The EO showed toxicity at concentrations of 50 and 25 µg/mL at 24 and 72 hpf, respectively. The concentration of 12.5 µg/mL caused 70% mortality. The concentration of 6.25 µg/mL caused teratogenic effects. Compared to control, SOD activity showed a significant reduction at concentrations higher than 0.78 µg/mL, and concentrations higher than 1.56 µg/mL resulted in a significant reduction in CAT activity. There was a significant reduction in neutrophil migration in all EO treatments when compared to the control group. The highest concentrations of EO (3.12 and 6.25 µg/mL) showed a significant reduction in the process of caudal fin regeneration. In addition, a significant reduction of SOD activity was observed in all concentrations of the EO. CAT activity was significantly lower in the 3.12 µg/ml group. On the other hand, GST activity was significantly increased in the 0.78 and 1.56µg/ml groups when compared to the control group. There was no significant difference in ROS production. A reduction in cell apoptosis was observed in all concentrations of OE when compared to the H₂O₂ control. The results of the studies indicate that the EO of *C. citratus* at the highest concentrations caused toxic and teratogenic effects in zebra fish embryos and larvae. However, at lower concentration, OE showed no toxicity. In addition, EO has potential for anti-inflammatory effect and protection against free radical formation.

Key-words: Medicinal Plants. Lemongrass. Toxicity. Regeneration. Free radicals.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	História e importância econômica dos óleos essenciais	12
2.2	Definição e característica dos óleos essenciais	13
2.3	Métodos de obtenção	14
2.4	Capim limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	15
2.4.1	Origem e aspectos botânicos	15
2.5	Inflamação	20
2.5.1	Papel dos neutrófilos na inflamação	21
2.6	Radicais livres e antioxidantes	22
2.6.1	Enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST)	23
2.7	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	24
2.7.1	Zebrafish como modelo para avaliação de produtos naturais	26
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
	REFERÊNCIAS	29
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	41
	ARTIGO 1 - Effect of the essential oil of <i>Cymbopogon citratus</i> on zebrafish embryos and larvae	41
	ARTIGO 2 - Avaliação do potencial anti-inflamatório e antioxidante do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> em zebrafish	81

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a utilização de óleos essenciais (OE) de plantas vem antes mesmo da era cristã. As citações históricas sobre a obtenção e utilização desses óleos estão ligadas, aos países orientais, se destacando o Egito, Pérsia, Japão, China e Índia (VITTI; BRITO, 2003).

Os OE são metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas, misturas voláteis, naturais, geralmente odoríferas e líquidas. Além disso, são conhecidos como óleos voláteis ou essências (PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A necessidade por produtos obtidos diretamente das plantas tem crescido muito atualmente no mercado (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012; LIMA et al., 2020). Algumas substâncias presentes nos óleos essenciais possuem alto valor comercial, podem ser isoladas do óleo ou mesmo sintetizadas em laboratório, o “capim-limão” (*Cymbopogon citratus*) é um exemplo (TRANCOSO, 2013).

O OE da *C. citratus* possui grande importância industrial e são empregados nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentícia e farmacêutica (CRAVEIRO; DE QUEIROZ, 1993; IAC, 2007; LORENZI; MATTOS, 2002; NASCIMENTO et al., 2003; PRINS et al., 2008; SERRA; FUGANTI; BRENNNA, 2005). Devido à grande utilização popular do “capim-limão” é necessário pesquisas para analisar a segurança terapêutica desta planta (COSTA et al., 2005).

O *Danio rerio*, conhecido popularmente como zebrafish é um modelo animal estabelecido em diversas áreas de pesquisas, desde biologia do desenvolvimento, doenças metabólicas, genética humana, patologia humana, comportamento, toxicologia e neurociência (BROUGHTON et al., 2001; DOOLEY; ZON, 2000; LEVIN; CHEN, 2004; RICO, 2007; SERRA et al., 1999; ZANG; MADDISON; CHEN, 2018). Devido a estas características, o zebrafish tornou-se um excelente para pesquisas in vivo (CRAWFORD et al., 2008). Desse modo, possibilita novos estudos para descobertas de novas propriedades, moléculas e pesquisas que possam desvendar os efeitos e benefícios do OE da *C. citratus* em humano. Além disso, diversos compostos e medicamentos que são oriundos de plantas medicinais e que são utilizados pelos seres humanos, foram testados

primordialmente no zebrafish, devido a possíveis efeitos tóxicos ou teratogênico (DOS SANTOS et al., 2016).

Portanto, esse trabalho tem como objetivo avaliar o potencial tóxico e possíveis efeitos benéficos do OE da *C. citratus* em embriões e larvas de zebrafish.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 História e importância econômica dos óleos essenciais

A história dos OE começou no Oriente, especificamente no Egito, Pérsia e Índia. Documentos históricos mostram que os egípcios usavam óleos aromáticos desde 4500 a. C, porém o conhecimento sobre como os primeiros óleos foram preparados e para quais objetivos, são escassos e extremamente vagos (ANDREI; PERES; COMUNE, 2005.). Há evidências que somente depois de algum tempo do uso dos primeiros óleos que os árabes desenvolveram a técnica de destilação a partir do álcool etílico (GUENTHER; ALTHAUSEN, 1948).

À medida que o conhecimento químico se expandiu, no final do século XIX e início do século XX, alavancou a produção de OE. O aprimoramento do conhecimento de OE levou a uma forte expansão na produção, e o uso de óleos voláteis na medicina tornou-se subordinado aos usos em alimentos, bebidas e perfumes (CORAZZA, 2002).

Os OE são o 446º produto mais negociado do mundo e o 1018º produto mais complexo, de acordo com o Índice de Complexidade do Produto (PCI) (SIMÕES et al., 2017). Os principais exportadores de OE são Estados Unidos (US \$ 697 milhões), Índia (US \$ 665 milhões), China (US \$ 522 milhões), França (US \$ 466 milhões) e Brasil (US \$ 409 milhões). Os principais importadores são Estados Unidos (US \$ 1,27 bilhão), França (US \$ 444 milhões), Alemanha (US \$ 353 milhões), Reino Unido (US \$ 341 milhões) e Índia (US \$ 258 milhões) (SIMÕES et al., 2017)

Na última década, o Brasil tornou-se um dos destaques na produção de OE, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os grandes produtores mundiais (SILVEIRA et al., 2012). A industrialização significativa de OE naturais no Brasil teve início a partir do século XX, baseado no extrativismo de essências nativas, principalmente do Pau-Rosa. Após a crise na produção de OE nos países ocidentais a partir de 1940, em virtude da II Guerra Mundial, a produção de OE no Brasil passou a ser feita de forma mais organizada, com a introdução de outras culturas para obtenção de óleos de laranja,

eucalipto, capim-limão, e outros, voltada, basicamente, para o mercado externo (SILVA et al., 2018).

Nas décadas seguintes, contudo, empresas internacionais produtoras de perfumes, cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentares passaram a se instalar no país, contribuindo para a solidificação e desenvolvimento do nosso mercado interno (SEBRAE, 2020). Dados divulgados pelo IBGE/SIDRA (2020), demonstra que os OE de laranja representam a maior parte do valor monetário de produção no Brasil contribuindo com 90,43% do valor no mercado nacional no período de 2014 a 2017 quando comparados aos OE de limão e outros cítricos.

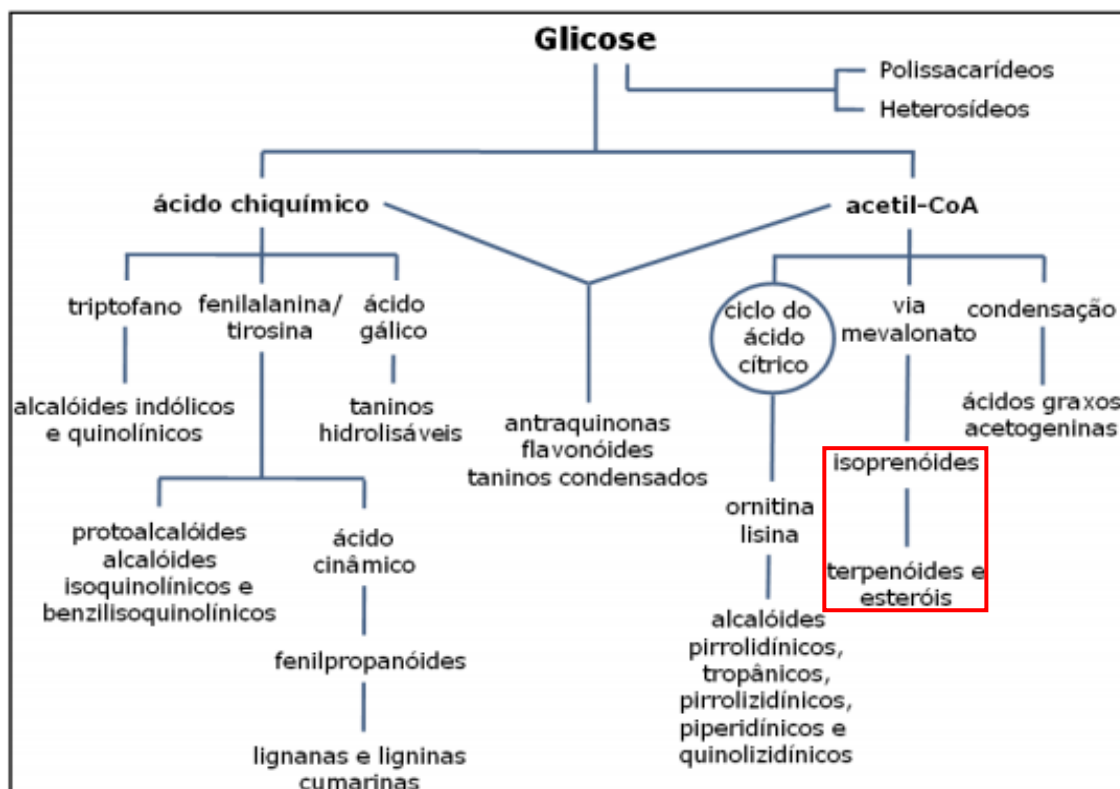
2.2 Definição e característica dos óleos essenciais

Os OE são misturas complexas voláteis, naturais, odoríferas e líquidas. São substâncias solúveis em solventes apolares e possuem solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar soluções aquosas, que evaporam rapidamente a temperatura ambiente, por isso, são chamados de essências, óleos voláteis ou etéreos (AMORIM; FROTA, 2019). Os OE são metabólitos secundários (Figura 1) produzidos por plantas aromáticas que ficam armazenados em estruturas especializadas, como tricomas, pelos glandulares, células modificadas do parênquima, canais ou bolsas secretoras (PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006; RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Esses líquidos aromáticos podem ser obtidos através das flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes (PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006). A finalidade desses óleos é a proteção das plantas contra bactérias, vírus, fungos, herbivoria e atração de alguns insetos favorecendo a dispersão de pólenes e sementes (BAKKALI et al., 2008).

A estrutura química dos OE é composta basicamente por carbono, oxigênio e hidrogênio, possui uma classificação química complexa, visto que são formados por uma mistura de diversas moléculas orgânicas, como hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis, éteres, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outras (MIRANDA, 2010). Os OE apresentam-se em misturas de diferentes concentrações de constituintes químicos, tendo, normalmente, um ou dois compostos majoritários, como os terpenoides e fenilpropanoides (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Contudo, a composição dos OE é determinada geneticamente, podendo variar de acordo com a origem botânica,

quimiotipo, ciclo vegetativo, fatores da natureza e método de obtenção (SIMÕES et al., 2007).

Figura 1. Rota biossintética dos metabólitos secundários.



Fonte: Santos, 2003.

2.3 Métodos de obtenção

Diferentes estudos já relataram que os diferentes métodos de extração utilizados para obtenção dos OE interferem na sua composição (CHARLES; SIMON, 1990) sendo demonstrado no trabalho de Costa et al. (2005) que até o tamanho do fragmento do vegetal utilizado também influencia no rendimento do mesmo, por causa da superfície de contato.

Diante do exposto, foi visto que há diferentes maneiras de extração do óleo da *C. citratus*. Foi observado na literatura duas formas de extração da *C. citratus*, um método usando o micro-ondas sem solvente e outra através da hidrodestilação no aparelho de Clevenger. Em ambas as técnicas, houve predominância de monoterpenos. Os compostos oxigenados principais encontrados foram linalol, citral, citronelol, trifluoroacetil-lavandulol, ácido gerânico, pinacol, geraniol, 2,3-epóxi-geranilacetato, geranil butanoato

e fitol (AJAIY et al., 2016; LUCCHESI et al., 2004). Em outro estudo usando apenas o método de hidrodestilação no aparelho Clevenger, obteve-se um rendimento de 0,6% (v/p), sendo que os principais componentes encontrados foram geranial (42,2%), neral (31,5%) e β -mircenol (7,5%). Foram encontrados em menor quantidade o acetato de geranil (4,3%) e o isopulegol (1,4%). O citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal), isômero cis geranial e no isômero trans neral, estavam presentes no óleo cerca de 73,3%. Encontrou-se alto teor de monoterpenos oxigenados e baixas quantidades de hidrocarbonetos monoterpenos (9,54%), hidrocarbonetos sesquiterpenos (0,79%) e sesquiterpenos oxigenados (0,33%) (BOUKHATEM et al., 2014). No experimento de Leal et al. (2015) o objetivo foi testar diferentes tempos de extração com a técnica de arraste a vapor. Nos 8 minutos iniciais o rendimento foi de 0,320ml 100g⁻¹, dobrou-se o valor nos 4 minutos seguintes 0,655ml 100g⁻¹ e aumentou lentamente o volume até os 20 minutos com o rendimento de 0,767ml 100g⁻¹, depois dos 20 minutos não houve incremento no rendimento do óleo. No estudo Koketsu e Gonçalves (1991), a técnica de arraste a vapor obteve rendimento de 0,25% a 0,35%. Em outro experimento realizado no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizou também a extração através da técnica de arraste a vapor e diluídos com Tween 80 na concentração 1% (v/v) facilitando a imersão na água com o “alecrim-pimenta” e do “capim-limão” obtendo também o mesmo rendimento (MAGALHAES et al., 2013). No Laboratório de Operações Unitárias (LOPE), os óleos essenciais da citronela (*Cymbopogon winterianus* J.), que é do mesmo gênero da *C. citratus* e do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L), foram obtidos através da extração no destilador por arraste a vapor, obtiveram rendimento de 0,833% e 0,462% respectivamente. Os compostos majoritários encontrados na citronela foi citronelol (42,01%), β - citronelol (19,93%) e geraniol (13,89%) e os compostos minoritários, acetato de geraniol (2,75%), β - elemeno (1,16%), α -amorfenol + germacreno D (2,67%), δ -cadineno (1,90%) e elemol (1,18%). Compostos do óleo alecrim majoritários α – Pineno (39,72%), terpineno (21,43%) e verbenona (10,49%) e os compostos minoritários, canfora (2,46%), borneol (2,50%), terpinen-4-ol (0,87%), α -terpineol (1,36%), geraniol (1,58%), acetato de bornila (0,72%) e (E)-cariofileno (2,00%) (STEFFENS et al., 2010).

2.4 Capim limão (*Cymbopogon citratus*)

2.4.1 Origem e aspectos botânicos

O nome *Cymbopogon* é derivado do grego “kymbe” (barco) e “pogon” (barba) que refere a inflorescência, do tipo espiguetas e *citratus* deriva do latim e refere-se ao “aroma de limão”, específico dessa espécie (SHAH et al., 2011). A sua descoberta foi em 1695, por James Petiver no seu próprio museu, como “*Gramen citratum fragrantissimum*”. Em 1786, foi publicado na 3ª edição do catálogo de plantas (*Hortus cantabricensis*), ganhando a expressão “*lemongrass*”, que significava popularmente “capim-limão” (STAPF, 1906). Foi inicialmente descrita como *Andropogon citratus* por De Candolle e reclassificada por Otto Stapf em 1906. Apresenta diversos sinônimos, *Andropogon ceriferus* Hack, *Andropogon citratus* DC, *Andropogon citratus* DC ex Nees, *Andropogon citriodorum* Hort x Desf, *Andropogon nardus* subsp. *ceriferus* (Hack) Hack, *Andropogon roxburghii* Nees ex Steud, *Andropogon schoenanthus* L. e *C. nardus* subvar (CATALOGUE, 2003).

C. citratus pertence à família Poaceae originária do sudeste Asiático e têm ampla distribuição em diversos países como, Guatemala, Índia Meridional, China, Filipinas, Sri Lanka e Brasil, visto que são muito resistentes às variações de solo e clima. É conhecida popularmente como “capim-limão”, “capim santo”, “capim-catinga”, “capim-de-cheiro”, “capim-cidrão”, “capim-cidrilho”, “capim-cidrô” e “capim-ciri” (GOMES; NEGRELLE, 2003; MARTINAZZO et al., 2007; SANTOS et al., 2009).

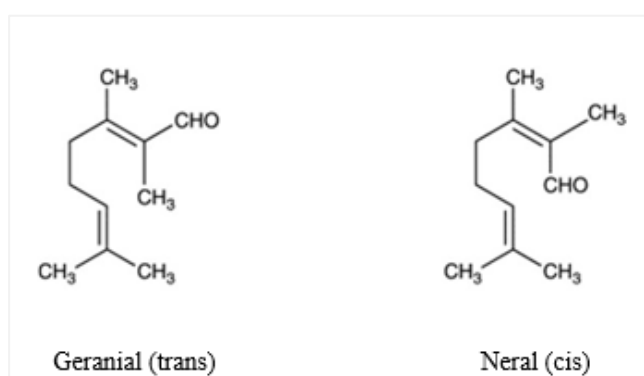
A *C. citratus* é uma erva perene, cespitosa, herbácea, estolonífera, forma touceiras de até 1 metro de altura e possui rizomas semi-subterrâneos. Possui caules simples ou ramificados, eretos e lisos. Apresentam folhas longas com até 1,5 metros de comprimento, com odor aromático agradável, característico de limão e possui sabor aromático ardente. Suas folhas também apresentam coloração verde-pálida, são ásperas nas duas faces devido ao fato de serem recobertas por uma fina camada de cera, cortantes, amplexicaule, lanceolada, moles, nervura grossa e canaliculada. O florescimento é raro e as flores são estéreis (Figura 2) (BARROSO et al., 2009; GOMES; NEGRELLE, 2003).

Figura 2. *Cymbopogon citratus*

Fonte: Do autor

A espécie produz OE que é conhecido internacionalmente como “lemongrass” e é comercializado visto que, é utilizado em indústrias alimentícias, fragrâncias, cosméticos, sabonetes, detergentes e perfumarias, devido ao seu aroma típico de limão e além da obtenção do seu principal componente citral (GANJEWALA; GUPTA, 2013; MARTINAZZO et al., 2007). O citral, é a mistura de dois isômeros, geranial (α -citral) e neral (β -citral) (Figura 3), acompanhado em menor quantidade pelo mirceno. O mesmo possui ação calmante e espasmolítica comprovada e o mirceno apresenta atividade analgésica (MATOS, 2000, p. 344).

Figura 3. Estruturas moleculares dos estereoisômeros do citral (geranial e neral).



Fonte: qint.sbq.org.br.

Tabela 1- Benefícios do extrato e OE de *C. citratus*.

EFEITO	FORMA DE OBTENÇÃO	POSSÍVEL APLICAÇÃO	REFERÊNCIA	Modelo Animal
Antioxidante	Extrato e óleo essencial	Combate os radicais livres	OLIVEIRA et al. (2019), VALDEZ et al. (2020), UCHIDA et al. (2017), YUNG et al. (2019)	In vitro e camundongos
Antifúngico, anti-helmíntico e antibactericida	Óleo essencial	Propriedade contra bactérias, helmintos e fungos gram-positivo e gram-negativa.	ALMEIDA et al. (2003), BARBOSA et al. (2009), BOUKHATEM et al. (2014), DUAN e ZHAO (2009)	Larvas nematoides gastrintestinais de caprinos, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella Enteritidis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> e <i>Aspergillus niger</i>
Anticonvulsivo	Extrato e óleo essencial	Potencial de modificar o caminho dos episódios convulsivos, interferindo nas crises e/ou impedindo o desenvolvimento das crises	HACKE et al, (2021), SILVA et al. (2010)	Zebrafish e camundongos
Antinociceptivo	Óleo essencial	Anula ou reduz a percepção e transmissão de estímulos que causam dor	BOUKHATEM et al. (2014), VIANA et al. (2000)	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Aspergillus niger</i> e camundongos
Anti-inflamatório	Extrato e óleo essencial	Impedir ou amenizar uma reação de inflamação	ABBAS et al. (2021), FRANCISCO et al. (2011), SALARIA et al. (2020), SANTIN et al. (2009)	Camundongos, macrófagos leucêmicos de camundongos, in vitro e <i>Leishmania amazonensis</i>
Gastroprotetor e cicatrizante gástrico	Óleo essencial	Cicatrização gástrica	VENZON et al. (2018)	Camundongos
Hipoglicemiante e hipolipemiantes	Óleo essencial	Diminui os níveis de glicose no sangue, níveis de triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol total (CT) e aumento do nível de HDL	EWENIGHI et al. (2013)	Camundongos

Suplementação de peixes	Óleo essencial	Melhora o crescimento, atividade da catalase, imunidade, resposta antioxidante e resistência a doenças	AL-SAGHEER et al. (2018)	<i>Oreochromis niloticus</i>
Anestésico	Óleo essencial	Sedativo	CALDAS et al. (2018), SOUZA (2017)	<i>Gymnocorymbus ternetz</i> e alevinos de tambatinga

Fonte: elaborado pelo autor.

2.5 Inflamação

A inflamação é a resposta primordial do sistema imune inato a entrada de patógenos, corpos estranhos ou lesões no tecido (CRUVINEL et al., 2010). O objetivo principal da resposta inflamatória é localizar e eliminar os fatores que interferem na homeostase e iniciar a restauração tecidual (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014; FREIRE; VAN DYKE, 2013).

O processo inflamatório envolve células residentes do tecido, vasos sanguíneos, proteínas e células imunológicas, como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e fagócitos mononucleares (BHATTACHARYA, 2013; CRUVINEL et al., 2010) e pode ser separado em três etapas: recrutamento, pico da inflamação e resolução (SERHAN et al., 2007).

Quando um tecido é lesado, ocorre a liberação de sinais químicos (prostaglandinas e histaminas), os quais proporcionam a vasodilatação local e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, ocorrendo assim o processo denominado de diapedese, em que os eletrólitos, pequenas e grandes moléculas que formam o transudato e exsudato, respectivamente, juntamente com água e células imunológicas migram do espaço extracelular em direção ao tecido lesionado, acarretando em uma inflamação aguda (CRUVINEL et al., 2010; FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

No processo de recrutamento, os macrófagos e neutrófilos são superativados e induz a produção de citocinas pró-inflamatória, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6) e mediadores inflamatórios (prostaglandinas e óxido nítrico) (MURALIDHARAN; MANDREKAR, 2013). Os neutrófilos na área inflamada fagocitam os patógenos invasores, liberam armadilhas extracelulares e geram ROS (espécies reativas de oxigênio) (FOX et al., 2010). Portanto, o recrutamento de macrófagos e neutrófilos para o tecido inflamado é considerado o pico da inflamação aguda (WITKO-SARSAT et al., 2000). A migração de neutrófilos é de suma importância para respostas fisiológicas a lesões e infecções ao tecido, no entanto a sua atividade descontrolada e excessiva conduz para inflamação persistentes, dano tecidual ou surgimento de doenças (YANG et al., 2018).

A última etapa é resolução da inflamação que precisa ser eficiente e controlada, sendo necessário a eliminação dos neutrófilos por meio de apoptose seguida pelo englobamento de macrófagos e/ou migração reversa, em que os neutrófilos voltam para o vaso sanguíneo ou tecido distante (FADDEL, XUE, KAGAN, 2010; FARRERA;

FADEEL, 2013; HENRY et al., 2013). Havendo erros nessa etapa tal como, neutrófilos persistirem no local e ocorrer liberação de compostos nocivos, falha na remoção dos patógenos e no engolfamento das células inflamatórias apoptóticas e um retardo da apoptose resulta na inflamação crônica (FREIRE; VAN DYKE, 2013; HASLETT, 1992; HENRY et al., 2013), originando doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, Alzheimer e câncer (FREIRE; VAN DYKE, 2013; YANG et al., 2018).

2.5.1 Papel dos neutrófilos na inflamação

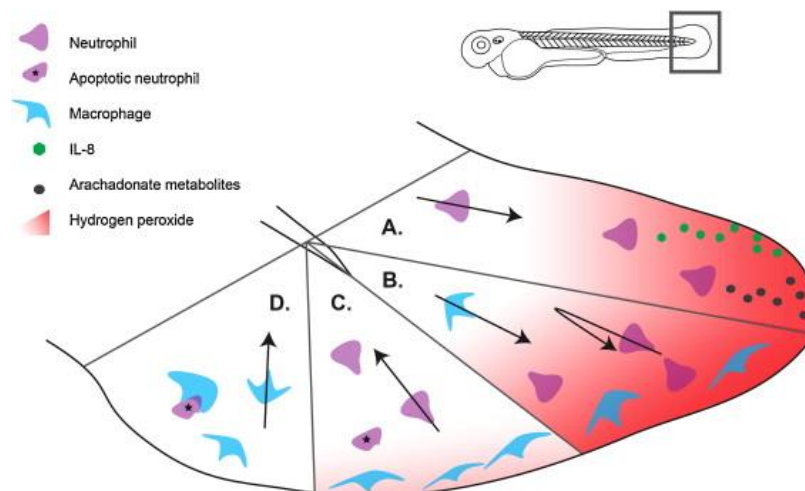
Dentre os leucócitos circulantes, os neutrófilos polimorfonucleares são os mais abundantes e compõe a principal barreira do sistema imunológico contra micro-organismos (FREIRE; VAN DYKE, 2013).

Os neutrófilos são formados na medula óssea através da proliferação e diferenciação das células precursoras da medula (AMULIC et al., 2012). Durante o processo de hematopoiese são estimulados por citocinas, principalmente o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e até completarem o processo de maturação ficam retidos na médula e depois de maduros migram para os vasos sanguíneos (AMULIC et al., 2012; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2013).

Essa célula imunológica pode ser encontrada de 6 a 12 horas na circulação, antes de deslocarem para o tecido (ROSALES, 2018; SUMMERS et al., 2010). No entanto, essa meia-vida pode-se prolongar pela ação de alguns micro-organismos e do próprio processo de inflamação, chegando a estender seu ciclo por 2 a 6 dias devido a retardação do apoptose (AMULIC et al., 2012; MAYADAS; CULLERE; LOWELL, 2013).

Quando o tecido é lesionado uma grande quantidade de neutrófilos migram para o tecido para aniquilar os patógenos e promover a eliminação de células e outros resíduos por meio da fagocitose. À medida que o tempo da lesão aumenta, os neutrófilos se acumulam no tecido e morrem devido á apoptose (FREIRE; VANDYKE, 2013). Em seguida, ocorre a infiltração celular de monócitos para o tecido se diferenciando em macrófagos. A função dessas células fagocíticas é possibilitar a remoção de neutrófilos apoptóticos e resqúicio de fagocitose. Posteriormente, os macrófagos também são eliminados por eferocitose e/ou voltam para o sistema linfático (FREIRE; VANDYKE, 2013).

Figura 4. Esquema da inflamação imune inata induzida por ferimento em zebrafish



Fonte: Lebert; Huttenlocher, 2014.

2.6 Radicais livres e antioxidantes

O organismo humano sofre várias reações químicas de perda (oxidação) e ganho (redução) de elétrons que são de suma importância para os processos metabólicos do corpo como, fornecimento de energia na forma de ATP (GULCIN, 2012; GULCIN, p. 651-715, 2020). Quando há a ocorrência de desacoplamento nas transferências de elétrons e uma das moléculas fica com elétron desemparelhado na última camada de valência tem-se a geração de radicais livres (GULCIN, p. 651-715, 2020).

Os radicais livres são altamente instáveis e reativos, incluem ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio H_2O_2 , radical hidroxila (OH), oxigênio singlete e óxido nítrico (NO) (GULCIN, p. 651-715, 2020; NEHA et al., 2019). Podem ser de origem endógena, produzidos pelas mitocôndrias, peroxissomos, xantina oxidase, pelos processos de inflamação e apoptose (HUSAIN; KUMAR, 2012; LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019; SISEIN, 2014) e de origem exógena, produzidos devido a fatores externos como, poluição, radiação UV, consumo de tabaco, álcool e maus hábitos alimentares (ANRAKU et al., 2018; LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

A produção excessiva de radicais livres ou uma deficiência dos sistemas antioxidantes, origina a condição de estresse oxidativo, a qual é prejudicial aos componentes celulares (GULCIN, p. 651-715, 2020; NEHA et al., 2019). O estresse oxidativo provoca efeitos deletérios no DNA, proteínas, mitocôndrias, membranas, alterações na estrutura e funções celulares. Os resultados desses desequilíbrios se

acumulam com o tempo e estão relacionados a diversas patologias, como: câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata e disfunções cognitivas (APAK et al., 2016; KIM et al., 2015; SINDHI et al., 2013). Em condições celulares normais, há um equilíbrio entre a produção de radicais livres e sua neutralização pelos sistemas antioxidantes, evitando que ocorra o estresse oxidativo (HUYUT; BEYDEMIR; GÜLÇIN, 2017; ÖZTASKIN et al., 2017).

2.6.1 Enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST)

Os antioxidantes são compostos que em baixas concentrações são capazes de prevenir ou retardar a ação dos radicais livres, protegendo o sistema biológico das reações ou processos que provocam a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (NEAH et al., 2019; SHIMANO, 2019).

Os antioxidantes endógenos podem ser enzimáticos ou não enzimáticos (AGUILAR; NAVARRO; PÉREZ, 2016) consistem em glutathione peroxidase (GSH), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e não enzimáticos, ácido lipóico, bilirrubina, glutathione e melatonina. Os exógenos são obtidos através de alimentos, podendo ser encontrado também em todas as partes das plantas, folha, raízes, casca, sementes e frutos que contenha vitamina E, A e C e flavonoides (ALVES et al., 2010; GULCIN, 2020; SHAHIDI; ZHONG, 2010; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

A superóxido dismutase (SOD) pode ser dividida nas seguintes categorias: superóxido dismutase dependente de cobre e zinco Cu/Zn SOD codificada pelo gene *SOD1*, existente no citoplasma e superóxido dismutase dependente de manganês Mn SOD codificada pelo gene *SOD2*, na mitocôndria (ROLÃO, p. 18, 2010; SILVA, p. 39, 2018). É uma importante enzima defensiva para a maioria dos organismos que são expostos ao oxigênio pois, converte o oxigênio prejudicial em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podendo ser removido subsequentemente por outras enzimas, evitando que ocorra uma reação direta das moléculas com os radicais superóxidos (RODRÍGUEZ et al., 2015; ROLÃO, 2010).

A catalase (CAT) está localizada no peroxissomo e consegue desintegrar H_2O_2 em uma velocidade extremamente rápida e eficiente. Exerce função peroxidativa e catalítica dependendo das concentrações baixa e alta, respectivamente de H_2O_2 (WU et al., 2011; ROLÃO, 2010).

A glutathione S-transferase (GST) são isoenzimas que exercem papel importante na desintoxicação celular protegendo as células de metabólitos reativos de oxigênio e auxiliando na biotransformação de compostos xenobióticos e endobióticos (DOMINGUES et al., 2010; HAYES et al., 2005; REZAEI et al., 2013). Além do mais, alteração na temperatura, produtos químicos tóxicos e oxidação podem determinar a expressão de GSTs (FROVA, 2006).

Os antioxidantes naturais ou sintéticos necessitam ser seguros para o uso humano e animal. Dessa forma, existem muitas pesquisas direcionadas à descoberta de novos antioxidantes presentes em plantas que possam ser uma alternativa para substituir os antioxidantes sintéticos, pois estudos demonstram que antioxidantes naturais possuem efeito igual ou maior na inibição da oxidação, potencial nutricional e efeitos terapêuticos (GÓMEZ, 2003; GENENA, 2005).

2.7 Zebrafish (*Danio rerio*)

O peixe zebrafish (*Danio rerio*) é da família Cyprinidae. É um peixe de água doce de regiões tropicais, nativo do sul da Ásia e oriundo dos principais rios da Índia, Bangladesh e Nepal. O zebrafish recebe esse nome devido às linhas presentes em suas escamas e também é conhecido como paulistinha referente às listras que contém na bandeira do estado de São Paulo (DAMMSKI; MÜLLER; GAYA, 2011; MCGONNELL; FOWKES, 2006). Este peixe vive em regiões alagadiças, encontrado principalmente em águas rasas, paradas ou com pouca movimentação, contendo vegetação aquática e lodo (DAMMSKI; MÜLLER; GAYA, 2011).

Os animais apresentam um tamanho médio de 2 a 3 cm podendo alcançar tamanhos de até 4 a 5 cm, de 2 a 3 anos de idade e vivem em cardumes de 5 a 20 indivíduos, porém, podem apresentar comportamento adversário até que se estabeleça a hierarquia de dominância entre os animais, quando mantidos em laboratório (BERNARDO, 2017; MÜLLER et al., 2017; REOLON et al., 2017). Os sexos podem ser distinguidos com base nas diferenças no tamanho corporal, forma e pigmentação. Os machos são, geralmente, menores e têm o corpo mais alongado com listras dourada e azul, enquanto as fêmeas são maiores, mais arredondadas, com barriga esbranquiçada, cores alternadas de prata e azul e exibem uma pequena papila genital na frente da nadadeira anal (ENGESZER et al., 2007) (Figura 5).

Figura 5. Macho (acima) e fêmea (abaixo) de zebrafish (*Danio rerio*).



Fonte: Do autor.

Atingem a maturidade sexual de 3 a 6 meses pós fertilização. Na natureza o zebrafish se alimenta de insetos (terrestres e aquáticos) e fitoplâncton. Em laboratório, são utilizados alimentos vivos como, *Paramecium* spp., náuplios de artêmia e rotíferas nos estádios iniciais e após a fase larval são alimentados com dietas artificiais. A temperatura ideal para a espécie é 28°C, o que favorece maior taxa de crescimento e o pH na faixa de 7 a 8, visto que, estimula o desenvolvimento, reprodução e alimentação, além do mais é ideal para o desenvolvimento de bactérias nitrificantes que atuam no sistema de filtragem biológica (DAMMSKI; MÜLLER; GAYA, 2011).

George Streisinger na década de 1960 foi o primeiro pesquisador a utilizar o zebrafish como modelo animal aplicando a análise mutacional para estudar o desenvolvimento embrionário do zebrafish (GRUNWALD; EISEN, 2002). No final da década de 70, os pesquisadores começaram a usá-lo na neurociência, estudando a resposta surpreendente e as células de Mauthner, que foram descritas como neurônios de comando (SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999). Na atualidade, o zebrafish é estabelecido em diversas áreas de pesquisas, desde biologia do desenvolvimento, doenças metabólicas, genética humana, patologia humana, comportamento, toxicologia e neurociências (CASSAR et al., 2019; DOOLEY; ZON, 2000; FAZRY et al., 2018; FREIFELD et al., 2017; GIBERT; TRENGOVE; WARD, 2013; ZANG; MADDISON; CHEN, 2018). Apresenta vantagens como, fácil manuseio, baixo custo, todos os estágios de vida podem ser obtidos em laboratório, alta performance reprodutiva com desova abundante, embriões translúcidos permitindo avaliação do desenvolvimento embrionário, tamanho pequeno, o que permite o cultivo em espaços reduzidos, possui cerca de 70% do seu genoma semelhantes aos humanos, permitindo estudos filogenéticos e fisiológicos (ALI et al., 2014; JAYASINGHE; JAYAWARDENA, 2019; PHAM et al., 2016; SIMONETTI, 2014; ZANG; MADDISON; CHEN, 2018).

2.7.1 Zebrafish como modelo para avaliação de produtos naturais

As plantas medicinais são utilizadas a décadas pela população de forma empírica, porém os materiais vegetais contêm diversas substâncias tóxicas que são produzidas pelas plantas em defesa contra doenças e animais predadores, podendo ocasionar no ser humano reações alérgicas, intoxicação entre outras reações desagradáveis (ATANASOV et al., 2015; FALCÃO et al., 2018; FÜRST; ZÜNDORF, 2015; HIBEN et al., 2019; YUMNAMCHA et al., 2015). Por esses motivos, é de suma importância estudos de identificação, nomenclatura das plantas, avaliação dos possíveis efeitos maléficos e benéficos.

Os estudos com plantas apresentam algumas limitações tais como, acessibilidade ao material pois, a quantidade disponível de produtos é baixa devido as ações antrópicas, dependendo dos métodos de extrações pode-se obter baixo rendimento do material e pela alta procura quando o produto possui algum composto bioativo muito promissor, custo, tempo, visto que, as estações do ano interferem na composição química das plantas, as complexas misturas de componentes (HIBEN et al., 2019; LITTLE et al., 2017).

As pesquisas com plantas medicinais, que têm como objetivo principal prever as dosagens que podem ocasionar toxicidade ou benefícios para a população por meios de ensaios com animais e o *D. rerio*, vem se destacando (BAMBINO; CHU, 2017). É um modelo animal que possui muitas vantagens em relação aos roedores e se encaixa nos 3 Rs (redução, substituição e refinamento). Redução, pois podem ser testadas diferentes números de concentração e as mais estáveis serem testadas posteriormente em outros modelos. Substituição de modelos que possuem um custo mais elevado e que precisam de muitos números de animais para testar. Refinamento, são animais de fácil manipulação e embriões translúcidos (CASSAR et al., 2019; VANDERLAAN et al., 2012).

Compostos utilizados pelos seres humanos como flavonóides, alcaloides e alguns medicamentos advindos de plantas medicinais foram testados no modelo zebrafish, principalmente em relação a possíveis efeitos tóxicos ou teratogênicos (CABALLERO; CANDIRACCI, 2016; MODARRESI; ARSAD; LIM, 2020) como pode ser visto na tabela 2.

Tabela 2- Avaliação de produtos naturais em embriões, larvas e adultos de zebrafish.

PLANTA	RESULTADOS	REFERÊNCIA
<i>Spondias mombin</i> (extrato- folha) <i>Cymbopogon citratus</i> (extrato e óleo- folha)	Efeitos ansiolíticos e antidepressivos.	SAMPAIO et al. (2018), HACKE et al. (2020)
<i>Curcuma longa</i> (extrato – rizoma) <i>Croton tiglium L.</i> (extrato- semente) <i>Milletia pachycarpa</i> (extrato -raíz) <i>Piper nigrum</i> (extrato- pó) <i>Trachyspermum ammi</i> (óleo-fruto) <i>Carthamus tinctorius L.</i> (extrato- folha) <i>Baccharis dracunculifolia</i> (extrato- sem raíz), <i>Anacardium occidentale</i> (óleo vegetal) <i>Syzygium aromaticum</i> (óleo essencial) <i>Cymbopogon citratus</i> (extrato e óleo- folhas)	Efeito tóxico e teratogenicidade, tais como, teratogênico, cauda quebrada, tronco dobrado e edema aumentado do saco vitelino. Além disso, houve maior produção de radicais livres e apoptose ao longo do corpo dos animais. Uma mistura desses podem ser utilizados na dieta de peixes para melhorar o desempenho e bloquearam a oxidação lipídica. Demonstrou que o extrato e o óleo possuem efeitos anticonvulsivantes induzidos por PTZ e toda as amostras diminuíram a formação de malondialdeído (MDA) e óxido nítrico (NO) e elevação dos níveis de GSH e CAT, indicando que os mecanismos antioxidantes podem estar relacionados a neuroproteção .	ALAFIATAYO et al. (2019), YUMNAMCH et al. (2015), YUMNANCHA et al. (2020), PATEL et al. (2020), KIM et al. (2017), XIA et al. (2017) RAMOS (2019). HACKE et al. (2021)
<i>Rosmarinus officinalis L</i> (óleo-folha)	O efeito do óleo foi essencial na proliferação de fibroblastos que atuam nos processos de cicatrização, não apresentou toxicidade para macrófagos e demonstrou atividade antioxidante	BORGES et al. (2018)

Fonte: elaborado pelo autor

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Produtos que são oriundos de fontes naturais têm despertado interesse no mercado desde a antiguidade e a *C. citratus* tem se destacado atualmente. Isso ocorre devido à grande utilização da *C. citratus* em indústrias farmacêuticas como, anti-hipertensivo, antiasmático, antisséptico, na indústria cosmética na utilização em máscaras faciais, propriedades antioxidantes e na indústria alimentícia (na conservação dos alimentos comercializados frescos). Entretanto novos estudos se mostram necessários para avaliar a segurança da espécie, seus efeitos e benefícios.

Compostos oriundos de plantas utilizados pelos seres humanos foram testados no modelo experimental zebrafish, visto que, é um modelo animal de baixo custo no cultivo de todos os estágios de vida em laboratório, desova abundante, embriões translúcidos, o que permite avaliação do desenvolvimento embrionário; tamanho pequeno e é um vertebrado que possui cerca de 70% do seu genoma semelhante aos humanos, permitindo assim estudos filogenéticos, anatomia e fisiologia.

Portanto, essa revisão demonstrou o zebrafish com um modelo útil para avaliar os efeitos do OE da *C. citratus* e possivelmente descobrir mecanismo para elucidar tratamento de doenças.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Cellular and molecular immunology E-book. **Elsevier Health Sciences**, 2014.
- ABBAS, M. et al. Investigation and comparison of anti-inflammatory activities of different extracts of *Cymbopogon citratus* using various in vivo models. **PAKISTAN JOURNAL OF BOTANY**, v. 53, n. 1, p. 217-226, 2021.
- AGUILAR, T. A. F.; NAVARRO, B. C. H.; PÉREZ, J. A. M. Endogenous antioxidants: a review of their role in oxidative stress. **A Master Regulator of Oxidative Stress—The Transcription Factor Nrf2**. **Intech Open**, p. 1-20, 2016.
- AJAYI, E. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. GC-MS evaluation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf oil obtained using modified hydro distillation and microwave extraction methods. **Food chemistry**, v. 209, p. 262-266, 2016.
- ALAFIATAYO, A. A. et al. Phytochemical evaluation, embryotoxicity, and teratogenic effects of Curcuma longa extract on zebrafish (*Danio rerio*). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.
- ALI, S.; AALDERS, J.; RICHARDSON, M. K. Teratological effects of a panel of sixty water-soluble toxicants on zebrafish development Zebrafish v. 11, n. 2, p.129-141, 2014.
- ALMEIDA, M. et al. Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (capim santo) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (Capim-açu) sobre cultivos de larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos. **Revista Brasileira Parasitologia Vet.**, v. 12, n. 3, p. 125-129, 2003.
- ALSAGHEER, A. A. et al. Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. **Aquaculture nutrition**, v. 24, n. 3, p. 1006-1014, 2018.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMORIM, A.F.V; FROTA, E.B. Tecnologia de produtos sanitários e cosméticos. Editora da Universidade Estadual do Ceará, 2019.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 459-489, Jan. 2012.
- ANDREI, P.; PERES, A.; COMUNE, D. Aromaterapia e suas aplicações. **CADERNOS**, São Paulo, v. 11, n. 4, p. 57- 68, out./dez. 2005.
- ANRAKU, M. et al. Antioxidant activities of chitosan and its derivatives in in vitro and in vivo studies. **Carbohydrate polymers**, v. 199, p. 141-149, 2018.

APAK, R. et al. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997-1027, 2016.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

AVOSEH, O. et al. *Cymbopogon species*; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7438-7453, 2015.

BAKKALI, F. et al. biological effects of essential oils a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in toxicology and environmental health. **Current topics in developmental biology**, v. 124, p. 331-367, 2017

BARBOSA, L. N. et al. Essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria in minced meat. **Foodborne pathogens and disease**, v. 6, n. 6, p. 725-728, 2009.

BARROSO, K. M. A. et al. **Avaliação da eficácia do fitoterápico a base de *Cymbopogon citratus* no tratamento da Candidose em usuários de prótese**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em diagnóstico bucal) - Universidade Federal do Paraíba, Paraíba, 2009.

BERNARDO, H. T. Modelo de exposição intermitente ao etanol altera parâmetros do sistema colinérgico, estresse oxidativo e comportamento em peixe-zebra. 2017. Dissertação (Mestrado em ciências da saúde) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2017.

BHATTACHARYA, K. et al. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on pulmonary inflammation. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 15, p. 2087-2097, 2013.

BORGES, R. S. et al. Anti-inflammatory activity of nanoemulsions of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: in vitro and in zebrafish studies. **Inflammopharmacology**, v. 26, n. 4, p. 1057-1080, 2018.

BOUKHATEM, M. N. et al. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**, v. 9, n. 1, 2014.

BROUGHTON, R. E.; MILAM, J. E.; ROE, B. A. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. **Genome research**, v. 11, n. 11, p. 1958-1967, 2001.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 17, p. 2675-2685, 2012.

CABALLERO, M. V.; CANDIRACCI, M. Zebrafish as Toxicological model for screening and recapitulate human diseases. 2016.

CALDAS, D. W. et al. **Óleo de capim limão, *Cymbopogon flexuosus* como anestésico para tetra negro, *Gymnocorymbus ternetz***. 39 p. Tese (Mestrado em Magister Scientiae) - Universidade Federal de Viçosa, 2018.

CASSAR, S. et al. Use of zebrafish in drug discovery toxicology. **Chemical research in toxicology**, v. 33, n. 1, p. 95-118, 2019.

CATALOGUE of new world grasses (Poaceae). *Cymbopogon citratus*. Disponível <<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/nwgc.html>>. Acesso em: 15 fev. 2020.

CHARLES, D.J; SIMON, J.E. Comparison of extraction methods for the rapid determination of essential oil content and composition of basil (*Ocimum* spp.). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.115, n.3, p.458-62, 1990.

COELHO, A. P. D. Caracterização fenotípica e determinação do sistema de cruzamento de *Elionurus muticus*. 2018. 119 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2018.

CORAZZA, S. A. Aromacologia através dos tempos. In: CORAZZA, S. **Aromacologia: uma ciência de muitos cheiros**. São Paulo: Senac, 2002.

COSTA, L.C.B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.956-959, 2005.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

CRAWFORD, A.D., ESGUERRA, C.V., WITTE, P. A. M. Fishing for drugs from nature: zebrafish as a technology platform for natural product discovery. **Planta medica**, p. 624-632, 2008.

CRUVINEL, W. M. et al. Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.

DAMMSKI, A. P.; MÜLLER, B. R.; GAYA, C. **Manual de Criação em Biotério**. 2011.

DE JESUS, J. G. et al. Elaboração de fórmulas farmacêuticas de uso tópico utilizando óleo essencial extraído do capim limão. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 21800-21815, 2021.

DOMINGUES, I. et al. Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 152, n. 3, p. 338-345, 2010.

DOOLEY, K.; ZON, L. I. Zebrafish: a model system for the study of human disease. **Current opinion in genetics & development**, v. 10, n. 3, p. 252-256, 2000.

DOS SANTOS, I. V. F. et al. Use of zebrafish (*Danio rerio*) in experimental models for biological assay with natural products. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 42, p. 883-891, 2016.

DUAN, J.; ZHAO, Y. Antimicrobial efficiency of essential oil and freeze–thaw treatments against *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* Ser. Enteritidis in strawberry juice. **Journal of food science**, v. 74, n. 3, p. 131-137, 2009.

DUTTA, S. et al. A short review on chemical composition, therapeutic use and enzyme inhibition activities of *Cymbopogon species*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 9, n. 46, p. 1-9, 2016.

ENGESZER, R. E. et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, v. 4, p. 21–40, 2007.

EWENIGHI, C. O. et al. Estimation of lipid profile and glucose level in alloxan-induced diabetic rats treated with *Cymbopogon citratus* (lemongrass). **Journal of Experimental & Integrative Medicine**, v. 3, n. 3, 2013.

FADEEL, B; XUE, D.; KAGAN, V. Programmed cell clearance: molecular regulation of the elimination of apoptotic cell corpses and its role in the resolution of inflammation. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 396, n. 1, p. 7-10, 2010.

FALCÃO, M. A. P. et al. Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 35, p. 35015-35026, 2018.

FARRERA, C.; FADEEL, B. Macrophage clearance of neutrophil extracellular traps is a silent process. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 5, p. 2647-2656, 2013.

FAZRY, S. et al. Cytotoxicity and toxicity evaluation of *Xanthone crude* extract on hypoxic human hepatocellular carcinoma and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Toxics**, v. 6, n. 4, p. 60, 2018.

FOX, S. et al. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. **Journal of innate immunity**, v. 2, n. 3, p. 216-227, 2010

FRANCISCO, V. et al. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 818-827, 2011.

FREIFELD, L. et al. Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and developmental biology studies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 50, p. E10799-E10808, 2017.

FREIRE, M. O.; VANDYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology** **2000**, v. 63, n. 1, p. 149-164, 2013.

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. **Biomolecular engineering**, v. 23, n. 4, p. 149-169, 2006.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrófagos em inflamação. **Current Drug Targets-Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

FÜRST, R.; ZÜNDORF, I. Evidence-based phytotherapy in Europe: where do we stand? **Planta medica**, v. 81, n. 12/13, p. 962-967, 2015.

GANJEWALA, D.; GUPTA, K. A. Capim-limão (*Cymbopogon flexuosus* Steud.) Óleo essencial de wats: visão geral e atividades biológicas. **Progresso recente em plantas medicinais**, v. 37, p. 235-271, 2013.

GENENA, A. K. Extração e caracterização do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): estudo de sua ação antioxidante. 179 p. Tese (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

GIBERT, Y.; TRENGOVE, M. C.; WARD, A. C. Zebrafish as a genetic model in pre-clinical drug testing and screening. **Current medicinal chemistry**, v. 20, n. 19, p. 2458-2466, 2013.

GOMES, E. T.; NEGRELLE, R. R. B. *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, v. 4, n. 2, 2003.

GUENTHER, E.; ALTHAUSEN, D. The essential oils. **New York: Van Nostrand**, 1948.

GÜLCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. **Archives of toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.

HACKE, A. C. M. et al. Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, p. 113036, 2020.

HACKE, A. C. M. et al. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, citral and geraniol exhibit anticonvulsant and neuroprotective effects in pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 275, p. 114142, 2021.

HASLETT, C. Resolução da inflamação aguda e o papel da apoptose no destino do tecido dos granulócitos. *Clin. Sci. (Lond)* **83**, 639 – 648, 1992.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 51-88, 2005.

HENRY, K. M. et al. Zebrafish as a model for the study of neutrophil biology. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, n. 4, p. 633-642, 2013.

HIBEN, M. G. et al. Hazard assessment of *Maerua subcordata* (Gilg) DeWolf. for selected endpoints using a battery of in vitro tests. **Journal of ethnopharmacology**, v. 241, p. 111978, 2019.

HUSAIN, N.; KUMAR, A. Reactive oxygen species and natural antioxidants: a review. **Adv Biores**, v. 3, n. 4, p. 164-175, 2012.

HUYUT, Z.; BEYDEMIR, S.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant and antiradical properties of selected flavonoids and phenolic compounds. **Biochemistry research international**, v. 2017, 2017.

IAC. Disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/capim_limao.htm. Acesso em 15 de abril de 2021

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE/ SIDRA, Pesquisa Industrial Anual - Sistema IBGE de Recuperação de Dados Automática. 2017. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/>. Acesso em 22 de maio de 2019.

JAYASINGHE, C. D.; JAYAWARDENA, U. A. Toxicity assessment of herbal medicine using zebrafish embryos: a systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

KIM, G. H. et al. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Experimental neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325, 2015.

KIM, S. H., SHARMA, C., KANG, S. C. *Ajowan* Oil Potentiates Ros-mediated Teratogenic Effect in Zebrafish Embryos. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 20, n.4, p.883–896, 2017.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L. Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor. **Embrapa Agroindústria de Alimentos-Documentos (INFOTECA-E)**, 1991.

LEAL, T. C. A. B. de. et al. Extração laboratorial simplificada de óleo essencial de capim-cidreira por arraste a vapor/simplified laboratory extraction of lemon grass essential oil by steam distillation. **Ceres**, v. 48, n. 280, 2015.

LEVIN, E. D.; CHEN, E. Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. **Neurotoxicology and teratology**, v. 26, n. 6, p. 731-735, 2004.

LIMA, S. K. et al. Produção e consumo de produtos orgânicos no mundo e no Brasil. 2020.

LITTLE, J. G. et al. In silico approach to safety of botanical dietary supplement ingredients utilizing constituent-level characterization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 418-429, 2017.

LORENZI, H.; MATTOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, Nova Odessa, p.223- 224, 2002

LOURENÇO, S. C.; MOLDÃO-MARTINS, M.; ALVES, V. D. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. **Molecules**, v. 24, n. 22, p. 4132, 2019.

LUCCHESI, M. E.; CHEMAT, F.; SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, n. 2, p. 323-327, 2004.

MAGALHÃES, H. M. et al. Ação alelopática de óleos essenciais de alecrim-pimenta e capim-santo na germinação de aquênios de alface. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 485-495, 2013.

MARTINAZZO, A.P. et al. Difusidade efetiva em folhas de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf submetidas à secagem com diferentes comprimentos de corte e temperaturas do ar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.9, n.1, p.68-72, 2007.

MARTINS, M. B. G.; MARTINS, A. R.; TELASCRÊA, M.; CAVALHEIRO, A. J. Caracterização anatômica da folha de *Cymbopogon citratus* (CD) Stapf (Poaceae) e perfil químico do óleo essencial. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 6, n. 3, p. 20-29, 2004.

MATOS, F.J.A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 200. 344 p. Universidade de Fortaleza, 2000.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology**, v. 9, p. 181-218, 2013.

MCGONNELL, I. M.; FOWKES, R. C. Fishing for gene function endocrine modelling in the zebrafish. **Journal of Endocrinology**, v. 189, n. 3, p. 425-439, 2006.

MIRANDA, C. Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas diversas de plantas. 152 p. Tese (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, 2010.

MODARRESI, C. A.; ARSAD, H.; LIM, V. Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1345, 2020.

MULLER, T.E., R. D.B. et al. Repeated ethanol exposure alters social behavior and oxidative stress parameters of Zebrafish. *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry*, v. 79, p. 105-111, 2017.

MURALIDHARAN, S.; MANDREKAR, P. Resposta ao estresse celular e sinalização imune inata: vias de integração na defesa e inflamação do hospedeiro. **Journal of leukocyte biology**, v. 94, n. 6, pág. 1167-1184, 2013.

NASCIMENTO, I. B. et al. Efeito do horário de corte no óleo essencial de capim-santo. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 34, n. 2, p. 169-172, 2003

NEHA, K. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 178, p. 687-704, 2019.

OLADEJI, O. S. et al. Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. **Scientific African**, v. 6, p. 00137, 2019.

OLIVEIRA, L. P. et al. Estudo da atividade antioxidante do extrato bruto hidroalcolico do capim cidreira (*Cymbopogon citratus*) pelo método de DPPH. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.16 n.29; p. 2034 2019.

ÖZTASKIN, N. et al. Novel antioxidant bromophenols with acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase inhibitory actions. **Bioorganic chemistry**, v. 74, p. 104-114, 2017.

PATEL, P. et al. Selective in vivo molecular and cellular biocompatibility of black peppercorns by piperine-protein intrinsic atomic interaction with elicited oxidative stress and apoptosis in zebrafish eleuthero embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 192, p. 110321, 2020. PHAM, D. H. et al. Use of zebrafish larvae as a multi-endpoint platform to characterize the toxicity profile of silica nanoparticles. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

PINTO, D. A.; MANTOVANI, E. C.; MELO, DE C.; SEDIYAMA, G. C.; VIEIRA, G. H. S. Produtividade e qualidade do óleo essencial de capim-limão, *Cymbopogon citratus*, DC., submetido a diferentes lâminas de irrigação. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 1, p. 54-61, 2014.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 6, n. 1, p. 39, 2006.

PRINS, C. L. et al. Efeitos de confinamento do sistema radicular sobre capim-limão (*Cymbopogon citratus*). **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 03, p. 416-421, 2008.

RAMOS, T. R. Extratos de *Baccharis dracunculifolia*, óleo vegetal de caju (*Anacardium occidentale*) e óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) na dieta de Zebrafish: crescimento animal e toxicidade. 2019. 76 p. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2019.

RANI, P. U. Fumigant and contact toxic potential of essential oils from plant extracts against stored product pests. **Journal of Biopesticides**, v. 5, n. 2, p. 120, 2012.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.

REOLON, G. K. et al. Sex and the housing: Effects on behavior, cortisol levels and weight in zebrafish. *Behavioural brain research*, v. 336, p. 85-92, 2018.

REZAEI, M. K. et al. Glutathione S-transferase (GST) family in barley: identification of members, enzyme activity, and gene expression pattern. **Journal of plant physiology**, v. 170, n. 14, p. 1277-1284, 2013.

RICO, E. P. Influência do metanol e do etanol sobre a atividade e a expressão gênica das ectonucleotidases e acetilcolinesterase em cérebro de zebrafish (*Danio rerio*). 2007. 114 p. Tese (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do rio Grande do Sul, 2007.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G. et al. Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 172, p. 19-25, 2015.

ROLÃO, M. B. Resposta antioxidativa de cafeeiros (*Coffea arabica*) expostos ao metal pesado cádmio. 2010.69 p. Tese (Mestrado em Ciências)- Universidade de São Paulo, 2010.

ROSALES, C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 113, 2018.

SALARIA, D. et al. In silico and In vitro evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* from North-western Himalayas. **bioRxiv**, 2020.

SAMPAIO, T. S. I. et al. Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of ethnopharmacology**, v. 224, p. 563-578, 2018.

SANTIN, R. et al. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology research**, v. 105, n. 6, p. 1489, 2009.

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 436-41, 2009.

SEAB/PARANÁ. Levantamento do valor bruto da produção agropecuária: produtos especiais; 2017.

SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB J.** 2007; 21: 325-332.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C. C.; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 32, n. 12, p. 1551-1553, 1999.

SERRA, S.; FUGANTI, C.; BRENNNA, E. Preparação biocatalítica de aromas e fragrâncias naturais. **Tendências em Biotecnologia**, v. 23, n. 4, p. 193-198, 2005

Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas- SEBRAE, como montar uma fábrica de óleos essenciais. Disponível em: www.sebrae.com.br. Acesso em 13 de maio de 2020.

SHAH, G. et al. Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemongrass). **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 1, p. 3, 2011.

SHIMANO, M. Y. H. Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 9, p. 930-940, 2010.

SILVA, G. A. F. **Estudo do papel estudo da proteína superóxido dismutase 2 (SOD2) no processo de transformação celular mediado por HPV**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

SILVA, R. et al. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 381, n. 5, p. 415-426, 2010.

SILVEIRA, J. C. et al. Levantamento e análise de métodos de extração de óleos essenciais. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1104 p.

SIMONETTI, R. B. Zebrafish (*Danio rerio*): futuro do modelo animal em pesquisa biomédica. 2014.46 p. Graduação (Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.

SINDHI, V. et al. Potential applications of antioxidants—A review. **Journal of pharmacy research**, v. 7, n. 9, p. 828-835, 2013.

SISEIN, E. A. Biochemistry of free radicals and antioxidants. **Scholars Academic Journal of Biosciences**, v. 2, n. 2, p. 110-118, 2014.

SOUZA, J. F. V. de. Atividade anestésica do óleo essencial *Cymbopogon flexuosus* em alevinos de tambaqui, 2017. 40 p. Graduação (Zootecnia)- Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, 2017.

STAPF, O. As gramíneas de óleo da Índia e Ceilão (*Cymbopogon* e *Andropogon spp.*). **Boletim de Informações Diversas (Royal Botanic Gardens, Kew)** p. 297-363, 1906.

STEFFENS, A. H. et al. Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial. 68 p. Tese (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2010.

SUMMERS, C. et al. Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in immunology**, v. 31, n. 8, p. 318-324, 2010.

TAJIDIN, N. E. et al. Chemical composition and citral content in lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stages. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 2685-2693, 2012.

TRANCOSO, M. D. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. **Revista Práxis**, v. 5, n. 9, 2013.

UCHIDA, S. et al. Protective effect of *Cymbopogon citratus* essential oil in experimental model of acetaminophen-induced liver injury. **The American journal of Chinese medicine**, v. 45, n. 03, p. 515-532, 2017.

VALDEZ, A. et al. Determinação da atividade antioxidante do óleo essencial de capim-limão frente ao método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazil). **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 9, n. 2, 3 mar. 2020.

VENZON, L. et al. Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 98, p. 118-124, 2018.

VIANA, G. S. B. et al. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 3, p. 323-327, 2000.

VITTI, A. M. S.; BRITO J. O. Óleo Essencial de Eucalipto. In: **Documentos Florestais**. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, p.30, 2003.

WILSON, A. A Alquimia das Ervas: Um Guia para Iniciantes-Conhecendo, cultivando e aplicando ervas medicinais. **Babelcube Inc.**, 2018.

WITKO-SARSAT, V. et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Laboratory investigation**, v. 80, n. 5, p. 617-653, 2000.

WU, M. et al. Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 30, n. 10, p. 2335-2341, 2011.

XIA, Q. et al. A developmental toxicity assay of *Carpesii fructus* on zebrafish embryos/larvae. **Toxicology research**, v. 6, n. 4, p. 460-467, 2017.

YANG, Yi et al. Anti-inflammatory and proresolution activities of bergapten isolated from the roots of *Ficus hirta* in an in vivo zebrafish model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 496, n. 2, p. 763-769, 2018.

YUAN, L. et al. Enhanced antioxidant and antiproliferative activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf essential oils in microemulsion. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 18, p. 15173-15181, 2019.

YUMNAMCHA, T. et al. Evaluation of developmental toxicity and genotoxicity of aqueous seed extract of *Croton tiglium* L. using zebrafish. **Drug and Chemical Toxicology**, p. 1-9, 2020.

YUMNAMCHA, T. et al. Evaluation of developmental toxicity and apoptotic induction of the aqueous extract of *Millettia pachycarpa* using zebrafish as model organism. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 97, n. 10, p. 1363-1381, 2015.

ZANG, L.; MADDISON, L. A.; CHEN, W. Zebrafish as a model for obesity and diabetes. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 6, p. 91, 2018.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 - Effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* on zebrafish embryos and larvae

Artigo elaborado conforme as normas para submissão na revista Brazilian Journal of Pharmacognosy- ISSN 1981-528X.

Effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* on Zebrafish embryos and larvae

Kiara Cândido Duarte da Silva^a, Bárbara do Carmo Rodrigues Virote^a, Maria de Fátima Santos^b, Tássia Flávia Dias Castro^c, Moisés Silvestre de Azevedo Martins^a, William Franco Carneiro^a, Luis David Solis Murgas^a

^a Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, 37200-900, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, 37200-900, Minas Gerais, Brazil

^c Institute of Biomedical Sciences da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

ORCID: Silva, KCD (0000-0003-3617-9893), Virote, BCR (0000-0003-2067-5809), Santos, MF (0000-0002-1092-9062), Castro, TFD (0000-0003-3299-2633), Martins, MSA (0000-0001-7116-0579), Carneiro, WF (0000-0002-5163-4615), Murgas, LDS (0000-0002-0066-7505)

*Corresponding author: Luis David Solis Murgas, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil. E-mail: lsmurgas@ufla.br, Tel.: +55 35 3829-1728

Acknowledgments This study was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), grant number 308359/2019-4; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) grant number 88881.117641/2016-01 and Rede Mineira de Bioterismo-FAPEMIG.

Abstract

The study aims to objectively evaluate the toxic potential of *C. citratus* essential oil (EO) *in vivo*. The EO was extracted by steam distillation, and then gas chromatography was performed to quantify the compounds present. The concentrations analyzed for the embryotoxicity assays were 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, and 0.39 $\mu\text{g/mL}$, diluted in 0.5% dimethyl sulfoxide. Twenty embryos were subjected to treatment in 96-well plates and analyzed until 120 hours post fertilization (hpf). A pool of forty larvae per treatment exposed for up to 96 hpf was used for the analysis of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione s- transferase (GST). For the identification of apoptotic cells, twenty 72-hpf larvae were used, which were stained with acridine orange (AO) for 20 minutes in a dark environment at room temperature. The EO showed toxicity at concentrations of 50 and 25 $\mu\text{g/mL}$ at 24 and 72 hpf, respectively. The concentration of 12.5 $\mu\text{g/mL}$ caused a mortality rate of 70%. The concentration of 6.25 $\mu\text{g/mL}$ caused teratogenic effects, such as pericardial and yolk sac edema, tail deformity, and lordosis. Compared to the control, SOD activity showed a significant reduction at concentrations higher than 0.78 $\mu\text{g/mL}$, and concentrations higher than 1.56 $\mu\text{g/mL}$ resulted in a significant reduction in CAT activity. The results study indicate that *C. citratus* EO at the highest concentrations caused toxic and teratogenic effects in zebrafish embryos and larvae. However, at lower concentration, the EO showed no toxicity.

Keywords: *Danio rerio*, lemongrass, toxicology, apoptosis, antioxidant, reactive oxygen species.

Introduction

Plants contain several toxic substances that are produced in defense against diseases and predatory animals (Atanasov et al. 2015). Medicinal plants have been empirically used for decades (Rossato et al., 2012), which can lead to allergies, poisoning and other adverse physical reactions due to the compounds present (Fürst and Zündorf 2015; Yumnamcha et al. 2015; Falcão et al. 2018; Gebrelibanos Hiben et al. 2019).

Cymbopogon citratus (D.C.) Stapf. is popularly known as lemongrass. It is a perennial herb originating in Southeast Asia and has a wide distribution in tropical and subtropical regions of the world, since it is very resistant to soil and climate variations (GOMES and NEGRELLE 2003; Martinazzo et al. 2007; Santin et al. 2009). It is often used in traditional medicine in the form of an infusion or decoction (Mendes Hacke et al. 2020) due to its variety of bioactive compounds that confer therapeutic and pharmacological properties (Mendes Hacke et al. 2022).

Several properties of *C. citratus* have already been reported, such as antioxidant (Oliveira et al., 2019; Uchida et al. 2017; Li et al. 2019) antifungal, anthelmintic, antibacterial (Almeida et al. 2003; Duan and Zhao 2009; Barbosa et al. 2009; Boukhatem et al. 2014), anticonvulsant (Silva et al. 2010; Hacke et al. 2021), antinociceptive (Viana et al. 2000; Boukhatem et al. 2014), anti-inflammatory (Santin et al. 2009; Francisco et al. 2011; Abbas et al. 2014; Salaria et al. 2020), gastroprotective, gastric healing (Venzon et al. 2018) and anesthetic effects (Becker et al. 2021; de Oliveira et al. 2022). Studies have used organisms such as rodents, rabbits (Lulekal et al., 2019), *Argulus sp e Dolops discoidalis* (Pereira 2020), *Sitophilus granarius* Linnaeus (Plata-Rueda et al. 2020), *Sarcóptes* (Li et al. 2020) and ovary cells of Chinese hamsters (Tofiño-Rivera et al. 2016) to assess *C. citratus*, but knowledge of its toxicological properties with respect to zebrafish (*Danio rerio*) is limited.

The main objective of research on medicinal plants is to predict the dosages that may cause toxicity or benefits to the population through animal tests (Bambino and Chu 2017). In addition, studies with plants have some limitations: a low amount of available material; a low yield, depending on the extraction method; and high demand, cost and time (Little et al. 2017; Gebrelibanos Hiben et al. 2019). Given these factors, zebrafish stand out and have become an excellent model to evaluate the toxicity of compounds and possibly the biosafety of new drugs (Crawford et al. 2008; Cabral and Moura 2019). *D. rerio* can overcome the above limitations of studies with plant material because it has many advantages over other organisms. Because it allows large-scale analyses to be performed with several compounds simultaneously, the use of *D. rerio* assists in the isolation of multiple bioactive molecules, a wide variety of tests can be performed, low cost and little material are needed to perform the tests, and the products can be added to the water (Crawford et al. 2011; Liu et al. 2013; Tabassum et al. 2015; Zhang et al. 2017).

Compounds derived from medicinal plants that are used by humans as flavonoids, alkaloids and some medicines have been tested in zebrafish, especially regarding possible toxic or teratogenic effects (Caballero and Candiracci 2016; Chahardehi et al. 2020). In addition, studies have evaluated the effects of oils and plant extracts using embryos and larvae (Yumnamcha et al. 2015, 2020; Xia et al. 2017; Borges et al. 2018; dos Santos Sampaio et al. 2018; Alafiatayo et al. 2019; Ramos 2019).

Considering the promising effects of *C. citratus* EO, the present study evaluated the potential toxicological, teratogenic, antioxidant and cell death effects in zebrafish embryos and larvae.

Materials and Methods

Ethical statement regarding animal experiments

All experimental procedures in this study were conducted in strict accordance with the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras - UFLA), Lavras, MG, Brazil, under protocol no. 003/2021 and meet the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) for the care and use of laboratory animals.

Plant material and essential oil preparation

C. citratus was collected in the Medicinal Plants Garden of the Federal University of Lavras UFLA, Lavras, MG, Brazil (21° 13 '48.8' 'S; 44° 58' 28.5 " W). A voucher specimen was deposited in the Herbarium of Universidade Federal de Lavras (ESAL18409). The aerial parts of the plants were cut into smaller sizes, weighed on an analytical scale and then used to obtain the plant EO.

EO extraction was performed at the Phytochemistry Laboratory of UFLA, according to the proposal of Miranda et al., (2013). A total of 996.14 g of fresh leaves and 8 liters of distilled water were used, and the sample was subjected to steam distillation for 3 hours. After extraction, the EO was purified by decantation and stored in a freezer (-4 °C) for 24 hours. Subsequently, the EO was weighed on an analytical scale, and the oil extraction yield was expressed in mg/g plant dry mass (Carvalho et al. 2020). The material was kept at room temperature and protected from light until the biological tests were performed.

Chromatography

The quantitative chemical analysis of *C. citratus* EO was performed in triplicate using an Agilent® 7890^a gas chromatography (GC) system with the HP GC Chemstation A.01.14 data processing system, the CombiPAL Autosampler System (CTC Analytics,

AG, Switzerland) and a flame ionization detector (GC-FID). The samples were prepared by diluting the EO with ethyl acetate (10 mL/L). The injection volume was 1.0 μ L in *split* mode with an injection ratio of 50:1. An HP-5MS fused silica capillary column (30 m long x 250 μ m internal diameter x 0.25 μ m film thickness) was used (California, USA). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The injector temperature was 250 °C, and the detector temperature was 300 °C. The heating analysis conditions were an initial ramp from 60 °C to 300 °C with a heating rate of 3 °C/min. The content of the eluted constituents was expressed as the percentage of the relative area of the chromatographic peak \pm the standard deviation of the three samples analyzed (de Oliveira et al. 2018; Lorençoni et al. 2020; Marques et al. 2021). The qualitative analyses were performed using an Agilent® 7890A chromatograph coupled to an Agilent® MSD 5975C mass selective detector (Agilent Technologies, California, USA) operated with electron impact ionization at 70 V in scanning mode at a rate of 1.0 scan/s, with a mass acquisition interval of 40–400 m/z. The operating conditions were the same as those used in the GC-FID analyses. The chemical constituents were identified by comparing their retention indices relative to those obtained with the coinjection of a standard solution of n-alkanes (C8-C20; Sigma–Aldrich®, St. Louis, USA) using the equation of Van Den Dool and Dec. Kratz (1963). The constituents of the EO of *C. citratus* were identified based on the library of the mass spectral database of NIST (2014) and the retention indices described in the literature (Adams 2007).

Antioxidant activity of the oil

The determination of antioxidant activity using the β -carotene/linoleic acid method is based on the oxidation of β -carotene (discoloration) induced by the oxidative degradation products of linoleic acid, according to the method proposed by Rufino et al.

(2010). A 10 μL aliquot of the oil was diluted in 990 μL of ethyl alcohol (92.8%) to obtain a 1 mL solution. Subsequently, 22 μL of this dilution was transferred to a 96-well microplate, where 278 μL of the β -carotene/linoleic acid system solution was added. The microplate reader was read at 470 nm (EZ Read 2000, Biochrom®) and subsequently kept in a water bath at 40 °C, and another reading was performed after a 120-minute interval. The results are expressed as percent oxidation inhibition. The determination of antioxidant activity by the β -carotene/linoleic acid method was performed in triplicate.

The antioxidant activity determined by the phosphomolybdenum complex method is based on the reduction of Mo (VI) to Mo(V) by the sample analyte and the subsequent formation of a green phosphate Mo(V) complex at acidic pH as described by Prieto et al. (1999). First, a 2.5 μL aliquot of the oil was diluted in 997.5 μL of ethyl alcohol (92.8%) to obtain a 1 mL solution. Subsequently, 50 μL of the dilution was added to test tubes, to which were added 450 μL of distilled water and 1.5 mL of reagent solution (1.8 M sulfuric acid, 0.084 M monobasic sodium phosphate and 0.012 M ammonium molybdate). The tubes were incubated in a water bath at 95 °C for 90 minutes. After cooling the test tubes, the contents were transferred to a 96-well microplate with a volume of 300 μL , and the absorbance was read in a microplate reader (EZ Read 2000, Biochrom®) at 695 nm. The results are expressed in grams of ascorbic acid per hundred grams of fresh sample based on a calibration curve with different previously known concentrations of ascorbic acid. The determination of the antioxidant activity by the phosphomolybdenum complex method was performed in triplicate.

Maintenance of zebrafish and embryo collection

The animals were kept in a rack specific to the species (Hydrus rack, model ZEB-60) containing polycarbonate aquariums (11.5 cm x 34.5 cm x 15.5 cm, 2.5 L each)

temperature 27.93 ± 0.50 °C, pH 7.13 ± 0.22 and conductivity 0.47 ± 0.06 . One hundred adult zebrafish animals were used, and ten animals were kept per aquarium, where males and females were separated by a perforated acrylic partition in a recirculation system. The animals were kept in a photoperiod of 14:10 (light:dark) at a temperature of 28 °C and fed twice a day with flocculated feed and once a day with *Artemia nauplii*. Aquarium cleaning and water quality maintenance were performed by the automated rack system.

The partitions of the aquariums were removed in the morning, half an hour before the end of the dark period, and the animals were removed from the aquariums and conditioned in acrylic brooders. After a two-hour mating period, the eggs were collected using a Pasteur pipette and placed in a Petri dish with E3 medium (Zhao et al. 2019).

Embryotoxicity

The toxicity tests were performed according to the guidelines of OECD No. 236: *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. *C. citratus* EO was added to E3 medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄). The initial concentrations analyzed were 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.79, and 0.39 µg/mL diluted in 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO). The concentrations were chosen according to the methods proposed by Kim et al. (2017) and He et al. (2018). After reproduction, the embryos were subjected to their respective treatments in Petri dishes, with 40 embryos per plate, and subsequently moved to an incubator (Thermo Scientific Forma 311, MA, USA) where they were kept at a temperature of 28 ± 1 °C. After 24 hours postfertilization (hpf), 20 embryos were transferred to 96-well plates (1 embryo per well) in triplicate, totaling 60 embryos per treatment. To each of the wells, 200 µL of each tested solution was added. The plates were covered with Parafilm® to avoid the possible effects of evaporation and contamination and then incubated at 28 ± 1 °C. The rates of survival, hatching and

morphological changes of the embryos were evaluated using an optical microscope (Olympus, CX3, Tokyo, JP) daily at intervals of 24, 48, 72, 96 and 120 hpf (OECD 2013). The following characteristics were evaluated: nondevelopment of somites, development of the eyes, larval pigmentation, edema during the formation of the heart and yolk sac, no detachment of the tail, lack of heartbeat, growth retardation, lordosis and tail deformity (Hallare et al. 2004). Based on the normal parameters of the species, other characteristics that do not correspond to normal development were considered morphological changes (Kimmel et al. 1995). The embryos that survived after the toxicity test were euthanized with 250 mg/L tricaine overdose.

Antioxidant activity of larvae

To determine the activity of antioxidant enzymes, a *pool* of forty larvae per treatment in triplicate exposed to the EO was used immediately after fertilization up to 96 hpf (Santos et al. 2020). Subsequently, the larvae were placed in microtubes with 400 μL of cold phosphate buffered saline (PBS) and macerated with a glass rod. The homogenates were centrifuged at 4000 g at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 15 minutes, and the supernatant was collected and stored at -20 $^{\circ}\text{C}$ until analysis (Xiong et al., 2019a; Xiong et al. 2019b). The Bradford method was used to determine protein concentrations at 595 nm using bovine serum albumin as a standard (Bradford 1976). To evaluate catalase (CAT) activity, the method established by Claiborne (1985) was used. A total of 30 μL of the larvae homogenate supernatant diluted in 135 μL of PBS (pH 7.0) and 135 μL of H_2O_2 (30 mM) were added to a 96-well microplate. The decrease in absorbance was recorded at 240 nm for 2 min in a spectrophotometer, and the CAT activity level was estimated by the molar extinction coefficient (ϵ) of H_2O_2 ($43.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in triplicate. The results are expressed in μmol of hydrogen peroxide degraded per minute per mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity was measured according to Song et al., (2009). First, a solution of 100 μL of PBS (100 mM, pH 7.8), 2 μL of EDTA (10 mM), 40 μL of methionine, 11 μL of ultrapure water and 15 μL of nitroterazolium blue (NBT, 1 mM) was used to measure the activity of this enzyme. The readings were performed in triplicate in a spectrophotometer at 560 nm. One unit of SOD (U) activity was defined as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of the NBT photoreduction rate, and the results are expressed as units of SOD per mg of protein (Song et al. 2009; Gu et al. 2019). Glutathione s-transferase (GST) activity was determined according to the method proposed by Habig and Jakoby (1981). A total of 15 μL of homogenate, 50 μL of reduced glutathione-GSH (25 mM) and 180 μL (1 mM) of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (dissolved in 96% ethanol and diluted in buffer of 0.1 M sodium phosphate, pH 7.2) were added to 96-well plates. GST activity was measured by the formation of the glutathione-2,4-dinitrobenzene conjugate, which was estimated from the reduction in absorbance at 340 nm after 3 min in a spectrophotometer. GST activity was estimated by $\epsilon = 9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in terms of CDNB conjugate produced per minute per mg of protein and was assessed in triplicate. The results are expressed in units per mg of protein (Velki et al. 2019).

Reactive oxygen species

The content of free radicals in the whole body of the animals was measured using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Briefly, 20 μl of homogenate per well was pipetted in triplicate into a 96-well plate. Then, 80 μl of 50 mM phosphate buffer with pH 7.2 containing DCFH-DA at a final concentration of 10 μM was added to each well. Subsequently, the plate was incubated at 37 °C for 30 minutes protected from light. DCFH-DA is converted into DCF (a fluorescent compound) in the presence of reactive

oxygen species (ROS), and its fluorescence was detected in a spectrophotometer (Tecan, infinite 200 pro, Switzerland) with excitation/emission wavelengths of 485/530 nm. The ROS content was quantified using a DCF standard curve, and the results are expressed as pmol of DCF formed/mg of protein/minute (Driver et al. 2000).

Cellular apoptosis

For the identification of apoptotic cells, acridine orange (AO) staining was used (Xia et al. 2017; Zhao et al. 2019). Twenty larvae 72 hpf were used and washed twice with E3 medium. Subsequently, they were stained in a solution containing 5 $\mu\text{g/mL}$ AO and incubated for 20 minutes protected from light at room temperature. Then, the larvae were washed 3 times with E3 medium for 5 minutes each and finally anesthetized in a solution of tricaine (100 mg/L). The fluorescence intensity was evaluated in a spectrophotometer (Tecan, Infinite 200 Pro, Switzerland) (excitation = 490 nm and emission = 520 nm) and photographed under a fluorescence microscope (Zeiss V16 Axio Zoom with 546 nm filter).

Statistical analysis

The data were subjected to the Shapiro–Wilk normality test. When this assumption was met, analysis of variance (ANOVA) was performed. Significant differences were determined by Tukey’s post-hoc test at 5% significance using Minitab® version 18 software (Minitab LLC, Stage College, PA).

Results

Chromatography

According to the obtained chemical composition of *C. citratus* EO, the major compounds are geranial (43.72%) and neral (29%), with together form citral, followed by myrcene (18.30%) (Table 1). The chromatogram is shown in Figure 1. Similar results were found in other studies (Soliman et al. 2017; Rojas-Armas et al. 2020).

Antioxidant activity of the oil

The antioxidant activity of EO according to the β -carotene/linoleic acid and phosphomolybdenum complex methods was $28.11 \pm 4.33\%$ oxidation inhibition and 303.83 ± 9.46 mg ascorbic acid/100 g of fresh sample, respectively.

Survival rate as a measure of the potential toxicity of *C. citratus* in zebrafish embryos and larvae

The control groups (E3 and E3 with 0.5% DMSO) showed a normal survival rate for the species, above 95% until 120 hpf. However, the survival rate differed significantly with variations in the *C. citratus* EO concentration. A 100% mortality rate was observed in the first 24 hpf for exposed larvae at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ and at 72 hpf for larvae at a concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$. The larvae exposed to a concentration of 12.5 $\mu\text{g/mL}$ *C. citratus* EO showed a significantly lower survival rate than the larvae of the control group, reaching 25% at 120 hpf. The other concentrations tested did not differ significantly from the control group (Fig. 2).

Teratogenic changes caused by *C. citratus* EO in the embryonic development of zebrafish

The zebrafish larvae exposed to 6.25 $\mu\text{g/mL}$ *C. citratus* EO showed a higher rate of edema, tail deformity and lordosis than the other treatments (Table 2). However, the treatments with 1.56, 3.12 and 12 $\mu\text{g/mL}$ *C. citratus* EO showed higher rates of tail deformity than the 0.78 $\mu\text{g/mL}$ group and the control group (Table 2).

Antioxidant activity

Compared to the control, SOD activity was significantly reduced at concentrations higher than 0.78 $\mu\text{g/mL}$, and a significant reduction in CAT activity was observed at concentrations higher than 1.56 $\mu\text{g/mL}$. However, GST activity showed no significant difference from the control (Fig. 3).

Reactive Oxygen Species (ROS) and apoptosis

We observed a significant increase in ROS production at all concentrations tested when compared to the control (Fig. 4). However, the production of ROS did not show significant differences between the different concentrations of EO (Fig. 4). The toxic effect of *C. citratus* EO on apoptotic cells was evaluated by fluorescence intensity using AO dye. Concentrations higher than 0.39 $\mu\text{g/mL}$ were not toxic to the larvae, since they showed no significant difference from the control. However, the concentrations of 3.12 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$ showed a significant increase compared to the control (Fig. 4).

Discussion

C. citratus is widely known and applied in conventional medicine; however, the understanding of its toxicological properties using zebrafish is still limited. Studies evaluating the possible toxic effects of medicinal plants on embryonic development are of paramount importance. Many products derived from these plants enter the pharmaceutical market without toxicological information and may damage health (Alafiatayo et al. 2019). Thus, this study is the first to date to evaluate the toxicity of *C. citratus* EO using zebrafish embryos and larvae. In this study, it was observed that *C. citratus* EO showed toxicity at concentrations of 50 $\mu\text{g/mL}$ and 25 $\mu\text{g/mL}$ at 24 and 72 hpf, respectively. The concentration of 12.5 $\mu\text{g/mL}$ caused a mortality rate of 70%. The

concentration of 6.25 $\mu\text{g/mL}$ caused teratogenic effects, such as pericardial and yolk sac edema, tail deformity and lordosis. Concentration lower than 3.12 $\mu\text{g/mL}$ were not considered toxic or teratogenic for zebrafish embryos and larvae. The toxicity of *C. citratus* may be associated with the different constituents of its EO. The most commonly found constituents are citral, which is a mixture of two isomers, geranial (α -citral) and neral (β -citral), and minor compounds such as linalool (3,7-dimethyl-octa-1,6-dien-3-ol), geraniol (trans-3,7-dimethylocta-2,6-dien 1-ol) and myrcene (7-methyl-3-methyl-1,6-octadiene) (Oliveira et al. 2011). Some studies have demonstrated effects of these isolated compounds on model organisms. High concentrations of linalool and geraniol caused mortality of all zebrafish embryos at 5 hpf, and geraniol caused embryonic coagulation and teratogenic effects at lower concentrations (Singulani et al. 2018). In addition, the low survival of embryos at the highest concentrations can be explained by the presence of other compounds, such as citral, geranyl acetate and EO itself. These compounds act quickly on the organism and can affect respiratory rates, causing damage to physiological processes and muscle activities and resulting in permanent paralysis (Plata-Rueda et al. 2020).

Depending on the time of exposure to the oil, there was an increase in embryotoxicity, the survival of embryos exposed to 12.5 $\mu\text{g/mL}$ decreased with increasing exposure time. This result suggests that the accessibility of EO to embryos increases with prolonged exposure, leading to the observed toxicity (Alafiatayo et al. 2019). In addition, the increase in toxicity with increasing exposure time can be attributed to weakening of or damage to the protective layer of embryos. Ali et al. (2017) demonstrated that the zebrafish chorion undergoes continuous transformation according to the age of development. These same authors concluded that toxicity over time may be due to changes in the chorionic protein profile that lead to the opening or widening of

chorionic pore channels, allowing greater influx of external solutes. In addition, the animals that were exposed to the concentration of 6.25 µg/mL showed morphological changes, and citral may be responsible. Souza et al. (2019) observed that citral at high dosages can cause high cytotoxicity and genotoxic effects, while at intermediate concentrations, it can generate a mutagenic effect. At low concentrations, antioxidants prevent or delay ROS activity, protecting biological systems from reactions or processes that lead to the oxidation of macromolecules or cellular structures (Neha et al. 2019). In this study, EO showed 28% oxidative inhibitory activity and an activity of 304 g of ascorbic acid/100 g of fresh sample using the β-carotene/linoleic acid and phosphomolybdenum complex methods, respectively. This corroborates the results of the enzymatic activities of the larvae. In addition, antioxidants can be classified as endogenous and enzymatic (SOD, CAT and GST) or exogenous and nonenzymatic (Alves et al. 2010; Shahidi and Zhong 2010; Shahidi and Ambigaipalan 2015; Gulcin 2020). SOD converts harmful oxygen into hydrogen peroxide (H₂O₂), preventing direct reaction of molecules with superoxide radicals (Rolão 2010; Rodríguez-Fuentes et al. 2015). CAT is responsible for decomposing H₂O₂ into O₂ and H₂O at a fast and efficient rate (Wu et al. 2011; Taheri Mirghaed et al. 2020). In the present study, the concentration of 0.39 µg/mL was toxic to the larvae because there was an increase in the SOD level, causing the release of the enzyme to fight and protect the organism. Concentrations higher than 0.78 µg/mL showed no toxicity because the level of SOD activity decreased. The CAT results show that concentrations of 0.39 and 0.78 µg/mL were toxic to the larvae because there was an increase in enzyme activity, and concentration higher than 1.56 µg/mL promoted a decrease in the CAT levels produced by the organism, demonstrating that they are not toxic. These results can be explained by the composition of the EO. Most of the EO constituents identified in the chromatogram are monoterpenoids, which have

been associated with antioxidant activity in other studies (Miguel 2010; Bicas et al. 2011). The high content of these molecules may explain the decreases in SOD and CAT activity in the larvae, which indicate that the EO acted as a protector in the body against ROS. In addition, *C. citratus* EO showed an average antioxidant activity of 41% when compared to ascorbic acid, proving its efficiency in protecting against ROS (Figueirinha et al. 2008). Due to its high content, citral may be the cause of the decrease in the activity of SOD and CAT in the organisms (Bayala et al. 2018). A study using the β -carotene approach showed that EO and citral isolates showed significant antioxidant activity (Gustavo de Lima Guimarães et al. 2011). In addition, geraniol eliminated 3.5 times more ROS than the standard antioxidant Trolox, and other compounds, such as neral and citral, also showed significant antioxidant effects (Choi et al. 2000). GSTs are phase II biotransformation enzymes that play an important role in cell detoxification (Glisic et al. 2015). They aid in the biotransformation of xenobiotic and endobiotic compounds, eliminating ROS and lipoperoxidation products (Chatterjee and Gupta 2018). The enzymes act catalytically in association with GSH, neutralizing electrophilic sites and making target compounds less toxic, more soluble in water and easily excreted (Halliwell 2006; Domingues et al. 2010; Rezaei et al. 2013). *C. citratus* is composed of secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, terpenoids, carotenoids, tannins, glucosinolate, pigments, waxes, oils, sterols and chlorophyll (Dyalla et al. 2015). Studies indicate that flavonoids have a good ability to sequester superoxide anions and hydroxyl radicals and therefore have a protective effect against ROS that are involved in inflammatory and degenerative diseases (Roriz et al. 2014). In the present study, there was an increase in GST activity compared to the control, but the increase was not significant. However, this increase is possibly related to the presence of flavonoids in this oil. According to Lee-Hilz et al. (2006) and; Procházková et al. (2011), flavonoids induce phase II detoxifying enzymes, such as

NADPH:quinone oxidoreductase, UDP-glucuronyl transferase and glutathione S-transferase, which are the main defense enzymes against electrophilic toxic compounds and oxidative stress. In addition, flavonoids are typically xenobiotic in animals and humans and are metabolized and quickly removed from the circulation (Procházková et al. 2011). Therefore, the increase in GST activity in embryos/larvae exposed to the oil may be due to the stimulation of existing flavonoids to eliminate toxic compounds or due to the elimination of such flavonoids themselves as xenobiotics.

The excessive production of ROS is closely related to cell death because ionic imbalance can lead to direct and indirect damage to nucleic acids, change the structure and function of lipids and proteins, and ultimately lead to cell death (Newsholme et al. 2016; Agarwal et al. 2018; Cho et al. 2019). In the present study, concentrations higher than 0.39 µg/mL promoted a reduction in apoptotic cells compared to the control, but the difference was not significant. Conversely, concentrations of 3.12 and 6.25 µg/mL showed a significant increase in apoptotic cells compared to the control. The increase in apoptotic cells may be related to the main compound, citral, because studies have shown that this compound can inhibit cell growth and induce cell apoptosis, even when it is derived from different sources (Bailly 2020; Rojas-Armas et al. 2020). In vitro studies have demonstrated the induction of apoptosis or necrosis of cancer cells after treatment with citral (Maruoka et al. 2018; Bayala et al. 2018). Cell cycle arrest in phases G1/S and apoptosis have been characterized in many cases (Chaouki et al. 2009; Bayala et al. 2018). In addition, citral induces apoptosis in a dose-dependent manner compared to the control (Nigjeh et al. 2018).

Conclusion

The results of the present study indicate that *C. citratus* EO at the highest concentrations caused toxic and teratogenic effects in zebrafish embryos and larvae.

However, at lower concentration, the EO showed no toxicity. Therefore, this study corroborates and complements studies on the safe use of *C. citratus* EO, which are still scarce in the literature, and more detailed studies of its possible effects on animal models are necessary.

Author contribution statement **Kiara C. D. Silva:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, Project administration. **Bárbara C. R. Virote:** Conceptualization, Methodology, Validation, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing. **Maria F. Santos:** Methodology Investigation, Formal analysis, Writing - Review & Editing. **Tássia F. D. Castro:** Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - Review & Editing. **William F. Carneiro:** Methodology, Validation, Formal analysis, Data Curation, Writing - Review & Editing. **Moíses M. Azevedo:** Validation, Formal analysis, Data Curation, Writing - Review & Editing, Visualization. **Luis D. S. Murgas:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Project administration, Resources, Funding acquisition, Writing - Review & Editing.

Funding This study was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), grant number 308359/2019-4; the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) grant number 88881.117641/2016-01 and Rede Mineira de Bioterismo-FAPEMIG.

Declarations

Ethical Approval All experimental procedures in this study were conducted in strict accordance with the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Lavras (Universidade Federal de Lavras - UFLA), Lavras, MG, Brazil, under protocol no. 003/2021 and meet the guidelines of the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) for the care and use of laboratory animals.

Conflicts of interest/Competing interests The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose and no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

Consent to Participate Not applicable.

Reference

Abbas A, Lichtman A, Pillai S (2014) Cellular and molecular immunology E-book

Adams RP (2007) Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Illinois USA Allured Publ Corp Carol Stream 0–804

Agarwal A, Kasinathan A, Ganesan R, et al (2018) Curcumin induces apoptosis and cell cycle arrest via the activation of reactive oxygen species-independent mitochondrial apoptotic pathway in Smad4 and p53 mutated colon adenocarcinoma HT29 cells. *Nutr Res* 51:67–81. <https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2017.12.011>

Alafiatayo AA, Lai KS, Syahida A, et al (2019) Phytochemical Evaluation, Embryotoxicity, and Teratogenic Effects of *Curcuma longa* Extract on Zebrafish (*Danio rerio*). *Evidence-based Complement Altern Med* 2019:.. <https://doi.org/10.1155/2019/3807207>

Ali M, Taite D, Irving R, et al (2017) The Protective Layer of Zebrafish Embryo Changes Continuously with Advancing Ages of Embryo Development (AGED) *Biochemistry of the Alzheimer's disease View project Learning through Synchronous Synaptic Activity View project The Protective Layer of Zebrafish Embryo Changes Continuously with Advancing Age of Embryo Development (AGED)*

ALMEIDA MAO de, Botura MB, Santos MM, et al (2003) Efeitos dos extratos aquosos de folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (capimsanto) e de *Digitaria insularis* (L.) Fedde (Capim-açu) sobre cultivos de larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. *Rev Bras Parasitol Vet* 12:125–129

Alves CQ, David JM, David JP, et al (2010) Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quim Nova* 33:2202–2210.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>

Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, et al (2015) Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv* 33:1582–1614. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.08.001>

Aware CB, Patil DN, Suryawanshi SS, et al (2022) Natural bioactive products as promising therapeutics: A review of natural product-based drug development. *South African J Bot* 151:512–528. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2022.05.028>

Bailly C (2020) Targets and pathways involved in the antitumor activity of citral and its stereo-isomers. *Eur J Pharmacol* 871:172945. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2020.172945>

Bambino K, Chu J (2017) Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. *Curr Top Dev Biol* 124:331–367. <https://doi.org/10.1016/BS.CTDB.2016.10.007>

Barbosa LN, Rall VLM, Fernandes AAH, et al (2009) Essential Oils Against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria in Minced Meat. <https://home.liebertpub.com/fpd> 6:725–728. <https://doi.org/10.1089/FPD.2009.0282>

Bayala B, Bassole IHN, Maqdasy S, et al (2018) *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils have cytotoxic effects on tumor cell cultures. Identification of citral as a new putative anti-proliferative molecule. *Biochimie* 153:162–170. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2018.02.013>

Bicas JL, Neri-Numa IA, Ruiz ALTG, et al (2011) Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. *Food Chem Toxicol* 49:1610–1615. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2011.04.012>

Borges RS, Keita H, Ortiz BLS, et al (2018) Anti-inflammatory activity of nanoemulsions

- of essential oil from *Rosmarinus officinalis* L.: in vitro and in zebrafish studies. *Inflammopharmacology* 2018 264 26:1057–1080. <https://doi.org/10.1007/S10787-017-0438-9>
- Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, et al (2014) Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. <http://dx.doi.org/103402/ljm.v925431> 9:. <https://doi.org/10.3402/LJM.V9.25431>
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Caballero MV, Candiracci M (2016) Zebrafish as Toxicological Model for Screening and Recapitulate Human Diseases. <https://doi.org/10.20944/PREPRINTS201612.0103.V1>
- Caballero MV, Candiracci M (2018) Zebrafish as screening model for detecting toxicity and drugs efficacy. *J Unexplored Med Data* 3:4. <https://doi.org/10.20517/2572-8180.2017.15>
- Cabral B, Moura DE (2019) UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA Avaliação da toxicidade do óleo da semente da *Sterculia striata* em embriões de zebrafish
- Carvalho VF, Ramos L dos A, Silva CA da, et al (2020) In vitro anthelmintic activity of *Siparuna guianensis* extract and essential oil against *Strongyloides venezuelensis*. *J Helminthol* 94:. <https://doi.org/10.1017/S0022149X19000282>
- Chahardehi AM, Arsad H, Lim V (2020) Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants* 2020, Vol 9, Page 1345 9:1345.

<https://doi.org/10.3390/PLANTS9101345>

Chaouki W, Leger DY, Liagre B, et al (2009) Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. *Fundam Clin Pharmacol* 23:549–556.

<https://doi.org/10.1111/J.1472-8206.2009.00738.X>

Chatterjee A, Gupta S (2018) The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. *Cancer Lett* 433:33–42. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2018.06.028>

Cho SH, Heo SJ, Yang HW, et al (2019) Protective Effect of 3-Bromo-4,5-Dihydroxybenzaldehyde from *Polysiphonia morrowii* Harvey against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress In Vitro and In Vivo. *J Microbiol Biotechnol* 29:1193–1203. <https://doi.org/10.4014/JMB.1904.04062>

Choi HS, Sun Song H, Ukeda H, Sawamura M (2000) Radical-Scavenging Activities of Citrus Essential Oils and Their Components: Detection Using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl. *J Agric Food Chem* 48:4156–4161. <https://doi.org/10.1021/JF000227D>

CLAIBORNE A (1985) Catalase activity. *CRC Handb methods Oxyg Radic Res* 283–284

Crawford AD, Esguerra C V., De Witte PAM (2008) Fishing for Drugs from Nature: Zebrafish as a Technology Platform for Natural Product Discovery. *Planta Med* 74:624–632. <https://doi.org/10.1055/S-2008-1034374>

Crawford AD, Liekens S, Kamuhabwa AR, et al (2011) Zebrafish Bioassay-Guided Natural Product Discovery: Isolation of Angiogenesis Inhibitors from East African Medicinal Plants. *PLoS One* 6:e14694. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0014694>

de Oliveira ER, Alves DS, Carvalho GA, et al (2018) Toxicity of *Cymbopogon flexuosus*

essential oil and citral for *Spodoptera frugiperda*. *Ciência e Agrotecnologia* 42:408–419. <https://doi.org/10.1590/1413-70542018424013918>

Domingues I, Oliveira R, Lourenço J, et al (2010) Biomarkers as a tool to assess effects of chromium (VI): Comparison of responses in zebrafish early life stages and adults. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 152:338–345. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2010.05.010>

dos Santos Sampaio TI, de Melo NC, de Freitas Paiva BT, et al (2018) Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). *J Ethnopharmacol* 224:563–578. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2018.05.037>

Driver AS, Kodavanti PRS, Mundy WR (2000) Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. *Neurotoxicol Teratol* 22:175–181. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00069-0)

Duan J, Zhao Y (2009) Antimicrobial Efficiency of Essential Oil and Freeze–Thaw Treatments against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* Ser. Enteritidis in Strawberry Juice. *J Food Sci* 74:M131–M137. <https://doi.org/10.1111/J.1750-3841.2009.01094.X>

Dyalla A, Lins F, Oliveira MN, et al (2015) Quantificação de Compostos Bioativos em Erva Cidreira (*Melissa officinalis* L.) e Capim Cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.]. *Gaia Sci* 9:17–21

Falcão MAP, de Souza LS, Dolabella SS, et al (2018) Zebrafish as an alternative method for determining the embryo toxicity of plant products: a systematic review. *Environ Sci Pollut Res* 25:35015–35026. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-3399-7/FIGURES/8>

- Francisco V, Figueirinha A, Neves BM, et al (2011) *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J Ethnopharmacol* 133:818–827. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.11.018>
- Fürst R, Zündorf I (2015) Evidence-Based Phytotherapy in Europe: Where Do We Stand? *Planta Med* 81:962–967. <https://doi.org/10.1055/S-0035-1545948>
- Gebrelibanos Hiben M, Kamelia L, de Haan L, et al (2019) Hazard assessment of *Maerua subcordata* (Gilg) DeWolf. for selected endpoints using a battery of in vitro tests. *J Ethnopharmacol* 241:111978. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2019.111978>
- Glisic B, Mihaljevic I, Popovic M, et al (2015) Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 158:50–62. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2014.10.013>
- GOMES EC, NEGRELLE RRB (2003) *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. *Visão Acadêmica* 4:
- Gu J, Zhang J, Chen Y, et al (2019) Neurobehavioral effects of bisphenol S exposure in early life stages of zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Chemosphere* 217:629–635. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.10.218>
- Gulcin İ (2020) Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Arch Toxicol* 2020 943 94:651–715. <https://doi.org/10.1007/S00204-020-02689-3>
- Gustavo de Lima Guimarães L, das Graças Cardoso M, Estevão de Sousa P, et al (2011) Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral 1. Antioxidant and fungitoxic activities of the lemongrass essential oil and citral. *42:464–472*
- Habig WH, Jakoby WB (1981) [51] Assays for differentiation of glutathione S-

- Transferases. *Methods Enzymol* 77:398–405. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77053-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77053-8)
- Hacke ACM, Miyoshi E, Marques JA, Pereira RP (2021) Cymbopogon citratus (DC.) Stapf, citral and geraniol exhibit anticonvulsant and neuroprotective effects in pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. *J Ethnopharmacol* 275:114142. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2021.114142>
- Hallare A V., Köhler HR, Triebkorn R (2004) Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. *Chemosphere* 56:659–666. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2004.04.007>
- Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97:1634–1658. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2006.03907.X>
- Han HS, Jang GH, Jun I, et al (2018) Transgenic zebrafish model for quantification and visualization of tissue toxicity caused by alloying elements in newly developed biodegradable metal. *Sci Reports* 2018 8:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32313-5>
- He JH, Gao JM, Huang CJ, Li CQ (2014) Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. *Neurotoxicol Teratol* 42:35–42. <https://doi.org/10.1016/J.NTT.2014.01.006>
- He YL, Shi JY, Peng C, et al (2018) Angiogenic effect of motherwort (*Leonurus japonicus*) alkaloids and toxicity of motherwort essential oil on zebrafish embryos. *Fitoterapia* 128:36–42. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2018.05.002>
- Jayasinghe CD, Jayawardena UA (2019) Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review. *Evidence-based Complement Altern*

- Med 2019:.. <https://doi.org/10.1155/2019/7272808>
- Kim SH, Sharma C, Kang SC (2017) Ajowan Oil Potentiates Ros-mediated Teratogenic Effect in Zebrafish Embryos. <http://dx.doi.org/101080/0972060X20171383193> 20:883–896. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1383193>
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203:253–310. <https://doi.org/10.1002/AJA.1002030302>
- Lee-Hilz YY, Boerboom AMJF, Westphal AH, et al (2006) Pro-Oxidant Activity of Flavonoids Induces EpRE-Mediated Gene Expression. *Chem Res Toxicol* 19:1499–1505. <https://doi.org/10.1021/TX060157Q>
- Li FS, Weng JK (2017) Demystifying traditional herbal medicine with modern approach. *Nat Plants* 2017 38 3:1–7. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.109>
- Li Y, Wang C, Tao Z, et al (2019) Enhanced Antioxidant and Antiproliferative Activities of Cymbopogon citratus (DC.) Stapf Essential Oils in Microemulsion. *ACS Sustain Chem Eng* 7:15173–15181. https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B01606/SUPPL_FILE/SC9B01606_SI_001.PDF
- Little JG, Marsman DS, Baker TR, Mahony C (2017) In silico approach to safety of botanical dietary supplement ingredients utilizing constituent-level characterization. *Food Chem Toxicol* 107:418–429. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.07.017>
- Liu X, Ji K, Jo A, et al (2013) Effects of TDCPP or TPP on gene transcriptions and hormones of HPG axis, and their consequences on reproduction in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 134–135:104–111. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2013.03.013>
- Lorençoni MF, Figueira MM, Toledo e Silva MV, et al (2020) Chemical composition and

- anti-inflammatory activity of essential oil and ethanolic extract of *Campomanesia phaea* (O. Berg.) Landrum leaves. *J Ethnopharmacol* 252:112562. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.112562>
- Lulekal E, Tesfaye S, Gebrechristos S, et al (2019) Phytochemical analysis and evaluation of skin irritation, acute and sub-acute toxicity of *Cymbopogon citratus* essential oil in mice and rabbits. *Toxicol Reports* 6:1289–1294. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2019.11.002>
- Magalhães B, Mara H, Aquino F, et al *Semina: Ciências Agrárias*. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n2p485>
- Marques GR, Fernandes RV de B, Lago AMT, et al (2021) Spray-dried thyme essential oil microparticles using different polymeric matrices. *J Ethnopharmacol* 39:1883–1894. <https://doi.org/101080/0737393720211871917>
<https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1871917>
- Martinazzo AP, Corrêa ;, Melo ;, Barbosa ; (2007) Difusividade efetiva em folhas de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf submetidas à secagem com diferentes comprimentos de corte e temperaturas do ar. *Rev Bras Pl Med* 68–72
- Maruoka T, Kitanaka A, Kubota Y, et al (2018) Lemongrass essential oil and citral inhibit Src/Stat3 activity and suppress the proliferation/survival of small-cell lung cancer cells, alone or in combination with chemotherapeutic agents. *Int J Oncol* 52:1738–1748. <https://doi.org/10.3892/IJO.2018.4314/HTML>
- Mendes Hacke AC, D’Avila da Silva F, Lima D, et al (2022) Cytotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf fractions, essential oil, citral, and geraniol in human leukocytes and erythrocytes. *J Ethnopharmacol* 291:115147. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2022.115147>

- Mendes Hacke AC, Miyoshi E, Marques JA, Pereira RP (2020) Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). *J Ethnopharmacol* 260:113036. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.113036>
- Miguel MG (2010) Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr J* 25:291–312. <https://doi.org/10.1002/FFJ.1961>
- Mizgirev I V., Revskoy S (2010) A new zebrafish model for experimental leukemia therapy. <http://dx.doi.org/104161/cbt91111667> 9:895–902. <https://doi.org/10.4161/CBT.9.11.11667>
- Newsholme P, Cruzat VF, Keane KN, et al (2016) Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. *Biochem J* 473:4527–4550. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>
- Nigjeh SE, Yeap SK, Nordin N, et al (2018) Citral induced apoptosis in MDA-MB-231 spheroid cells. *BMC Complement Altern Med* 18:1–10. <https://doi.org/10.1186/S12906-018-2115-Y/FIGURES/6>
- NIST N (2014) EPA/NIH Mass Spectral Library. Natl Inst Stand Technol Gaithersbg
- OECD (2013) Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidel Test Chem Sect 2, OECD Publ 2:1–22
- Oliveira MMM, Brugnera ;, Cardoso ;, et al Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Rev Bras Pl Med* 8–16
- PEREIRA EC (2019) Efeito do óleo essencial de capim santo (*Cymbopogon citratus*)(Stapf) DC.(Poaceae) em *Argulus* (Crustacea, Branchiura): *Argulus* sp e *Dolops discoidalis*. Universidade Federal do Oeste do Pará
- Pham D-H, De Roo B, Nguyen X-B, et al (2016) Use of Zebrafish Larvae as a Multi-

- Endpoint Platform to Characterize the Toxicity Profile of Silica Nanoparticles. *Sci Reports* 2016 6:1–13. <https://doi.org/10.1038/srep37145>
- Plata-Rueda A, Rolim GDS, Wilcken CF, et al (2020) Acute Toxicity and Sublethal Effects of Lemongrass Essential Oil and Their Components against the Granary Weevil, *Sitophilus granarius*. *Insects* 2020, Vol 11, Page 379 11:379. <https://doi.org/10.3390/INSECTS11060379>
- Porfiro De Oliveira L, Ribeiro J, Barcelos V, et al ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DO CAPIM-CIDREIRA (*Cymbopogon citratus*) PELO MÉTODO DPPH. https://doi.org/10.18677/EnciBio_2019A157
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999) Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. *Anal Biochem* 269:337–341. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1999.4019>
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N (2011) Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* 82:513–523. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2011.01.018>
- Ramos TR (2019) Extratos de *Baccharis dracunculifolia*, óleo vegetal de caju (*Anacardium occidentale*) e óleo essencial de cravo-de-índia (*Syzygium aromaticum*) na dieta de Zebrafish: crescimento animal e toxicidade
- Rezaei MK, Shobbar ZS, Shahbazi M, et al (2013) Glutathione S-transferase (GST) family in barley: Identification of members, enzyme activity, and gene expression pattern. *J Plant Physiol* 170:1277–1284. <https://doi.org/10.1016/J.JPLPH.2013.04.005>

- Rodríguez-Fuentes G, Rubio-Escalante FJ, Noreña-Barroso E, et al (2015) Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 172–173:19–25. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2015.04.003>
- Rojas-Armas JP, Arroyo-Acevedo JL, Palomino-Pacheco M, et al (2020) The Essential Oil of *Cymbopogon citratus* Stapf and Carvacrol: An Approach of the Antitumor Effect on 7,12-Dimethylbenz- $[\alpha]$ -anthracene (DMBA)-Induced Breast Cancer in Female Rats. *Mol* 2020, Vol 25, Page 3284 25:3284. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25143284>
- Rolão MB (2010) Resposta antioxidativa de cafeeiros (*Coffea arabica*) expostos ao metal pesado cádmio. 69
- Roriz CL, Barros L, Carvalho AM, et al (2014) *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Res Int* 62:684–693. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.04.036>
- Rufino M do SM, Alves RE, de Brito ES, et al (2010) Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chem* 121:996–1002. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.01.037>
- Salariá D, Rolta R, Sharma N, et al (2020) In silico and In vitro evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant potential of *Cymbopogon citratus* from North-western Himalayas. *bioRxiv* 2020.05.31.124982. <https://doi.org/10.1101/2020.05.31.124982>
- Santin MR, Dos Santos AO, Nakamura CV, et al (2009) In vitro activity of the essential

oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res* 105:1489–1496. <https://doi.org/10.1007/S00436-009-1578-7/FIGURES/5>

Santos D, Félix L, Luzio A, et al (2020) Toxicological effects induced on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) after an acute exposure to microplastics alone or co-exposed with copper. *Chemosphere* 261:127748. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2020.127748>

Shahidi F, Ambigaipalan P (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *J Funct Foods* 18:820–897. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2015.06.018>

Shahidi F, Zhong Y (2010) Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur J Lipid Sci Technol* 112:930–940. <https://doi.org/10.1002/EJLT.201000044>

Silva MR, Ximenes RM, Da Costa JGM, et al (2010) Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 381:415–426. <https://doi.org/10.1007/S00210-010-0494-9/FIGURES/9>

Singulani JL, Pedroso RS, Ribeiro AB, et al (2018) Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. *Future Microbiol* 13:1637–1646. <https://doi.org/10.2217/FMB-2018-0200/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE2.JPEG>

Soliman WS, Salaheldin S, Amer HM (2017) Chemical Composition Evaluation of Egyptian Lemongrass, *Cymbopogon citratus*, Essential Oil. *Int J Sci Eng Res* 8:

Song Y, Zhu LS, Wang J, et al (2009) DNA damage and effects on antioxidative enzymes

in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biol Biochem* 41:905–909.
<https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2008.09.009>

Souza ACS, Silva LK, Queiroz TB, et al (2019) Citral presents cytotoxic and genotoxic effects in human cultured cells. <https://doi.org/101080/0148054520191585445>
 43:435–440. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1585445>

Stuart KA, Welsh K, Walker MC, Edrada-Ebel RA (2020) Metabolomic tools used in marine natural product drug discovery. <https://doi.org/101080/1746044120201722636> 15:499–522.
<https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1722636>

Tabassum N, Tai H, Jung DW, Williams DR (2015) Fishing for Nature's Hits: Establishment of the Zebrafish as a Model for Screening Antidiabetic Natural Products. *Evidence-based Complement Altern Med* 2015:.
<https://doi.org/10.1155/2015/287847>

Taheri Mirghaed A, Paknejad H, Mirzargar SS (2020) Hepatoprotective effects of dietary *Artemisia* (*Artemisia annua*) leaf extract on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia. *Aquaculture* 527:735443.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735443>

Teame T, Zhang Z, Ran C, et al (2019) The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Anim Front* 9:68–77. <https://doi.org/10.1093/AF/VFZ020>

Tibenda JJ, Yi Q, Wang X, Zhao Q (2022) Review of phytomedicine, phytochemistry, ethnopharmacology, toxicology, and pharmacological activities of *Cymbopogon* genus. *Front Pharmacol* 13:3388.
<https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.997918/BIBTEX>

Tofiño-Rivera A, Ortega-Cuadros M, Galvis-Pareja D, et al (2016) Effect of *Lippia alba*

- and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. *J Ethnopharmacol* 194:749–754. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2016.10.044>
- Uchida NS, Silva-Filho SE, Aguiar RP, et al (2017) Protective Effect of *Cymbopogon citratus* Essential Oil in Experimental Model of Acetaminophen-Induced Liver Injury. *Am J Chin Med* 45:515–532. <https://doi.org/10.1142/S0192415X17500318>
- Valdez A, Vinícios M, Ferreira S, et al DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM-LIMÃO FRENTE AO MÉTODO DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL)
- van Den Dool H, Dec. Kratz P (1963) A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr A* 11:463–471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
- Velki M, Lackmann C, Barranco A, et al (2019) Pesticides diazinon and diuron increase glutathione levels and affect multixenobiotic resistance activity and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Environ Sci Eur* 2019 311 31:1–18. <https://doi.org/10.1186/S12302-019-0186-0>
- Venzon L, Mariano LNB, Somensi LB, et al (2018) Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomed Pharmacother* 98:118–124. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.12.020>
- Viana GSB, Vale TG, Pinho RSN, Matos FJA (2000) Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *J Ethnopharmacol* 70:323–327. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00168-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00168-3)
- Vieira JF, Souza DE UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO-UFMA CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS-CCAA CURSO:

ZOOTECNIA MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO

Werneck Caldas D ÓLEO DE CAPIM LIMÃO, *Cymbopogon flexuosus*, COMO ANESTÉSICO PARA TETRA NEGRO, *Gymnocorymbus ternetzi*

Wu M, Xu H, Shen Y, et al (2011) Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. *Environ Toxicol Chem* 30:2335–2341. <https://doi.org/10.1002/ETC.634>

Xia Q, Luo J, Mei X, et al (2017) A developmental toxicity assay of *Carpesii Fructus* on zebrafish embryos/larvae. *Toxicol Res (Camb)* 6:460–467. <https://doi.org/10.1039/C7TX00005G>

Xiong G, Zou L, Deng Y, et al (2019) Clethodim exposure induces developmental immunotoxicity and neurobehavioral dysfunction in zebrafish embryos. *Fish Shellfish Immunol* 86:549–558. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.12.002>

Yumnamcha T, Devi MD, Roy D, Nongthomba U (2020) Evaluation of developmental toxicity and genotoxicity of aqueous seed extract of *Croton tiglium* L. using zebrafish. <https://doi.org/101080/0148054520191708094> 45:398–406. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1708094>

Yumnamcha T, Roy D, Devi MD, Nongthomba U (2015) Evaluation of developmental toxicity and apoptotic induction of the aqueous extract of *Millettia pachycarpa* using zebrafish as model organism. <http://dx.doi.org/101080/0277224820151093750> 97:1363–1381. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1093750>

Zhang JL, Laurence Souders C, Denslow ND, Martyniuk CJ (2017) Quercetin, a natural product supplement, impairs mitochondrial bioenergetics and locomotor behavior in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Appl Pharmacol* 327:30–38. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2017.04.024>

Zhao C, Jia Z, Li E, et al (2019) Hepatotoxicity evaluation of *Euphorbia kansui* on zebrafish larvae in vivo. *Phytomedicine* 62:152959.
<https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2019.152959>

Table 1- Chemical constituents of the EO of *Cymbopogon citratus* identified by GC-MS and their respective levels.

Constituents	RI calc.	RI lit.	Content (%)
Myrcene	990	988	18.30 ± 0,15
(Z)-β-Ocimene	1035	1032	0.36 ± 0,00
Linalool	1099	1095	0.55 ± 0,01
(Z) Isocitral	1163	1160	1.38 ± 0,00
Isocitral	1182	1177	1.78 ± 0,00
Neral	1241	1235	29.0 ± 0,04
Geranial	1254	1264	43.72 ± 0,10
Geraniol	1272	1261	2.28 ± 0,01
Other			2.63
Total			100

The data are expressed as the percentages of the mean ± standard deviation.

Table 2- Deformity rate of *Danio rerio* embryos and larvae at 120 hpf exposed to the EO of *Cymbopogon citratus* at different concentrations

Concentration (µg/mL)	Edema	Caudal deformity	Lordosis
Control	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A
0.39	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A
0.78	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	0.0 ± 0.0 ^A
1.56	0.3 ± 0.1 ^A	3.01 ± 0.5 ^B	0.67 ± 0.1 ^A
3.12	0.6 ± 0.1 ^A	10.67 ± 1.2 ^B	1.00 ± 0.2 ^A
6.25	7.34 ± 0.7 ^B	24.34 ± 2.2 ^C	7.34 ± 0.7 ^B

The data are expressed as the percentages of the mean ± standard deviation. Means that do not share the same letter in each column are significantly different (p < 0.05).

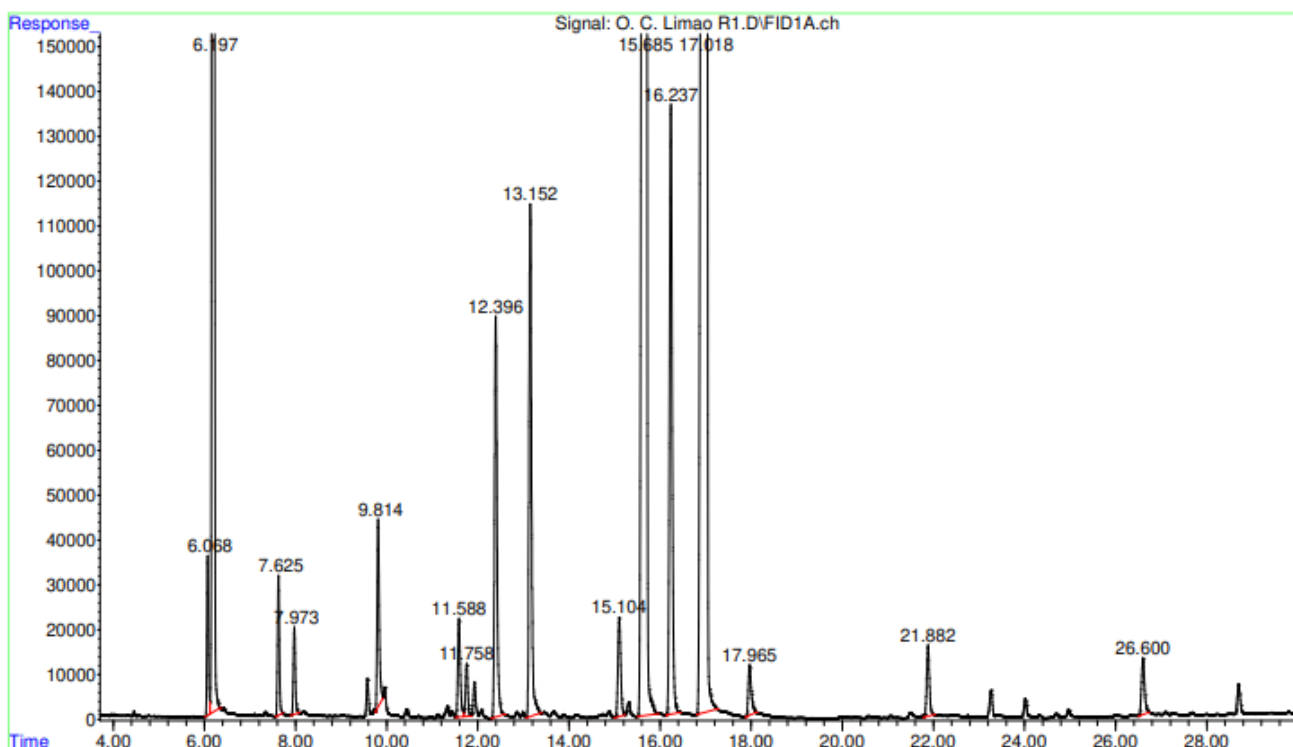


Fig.1 GC-MS chromatogram of *C. citratus* EO

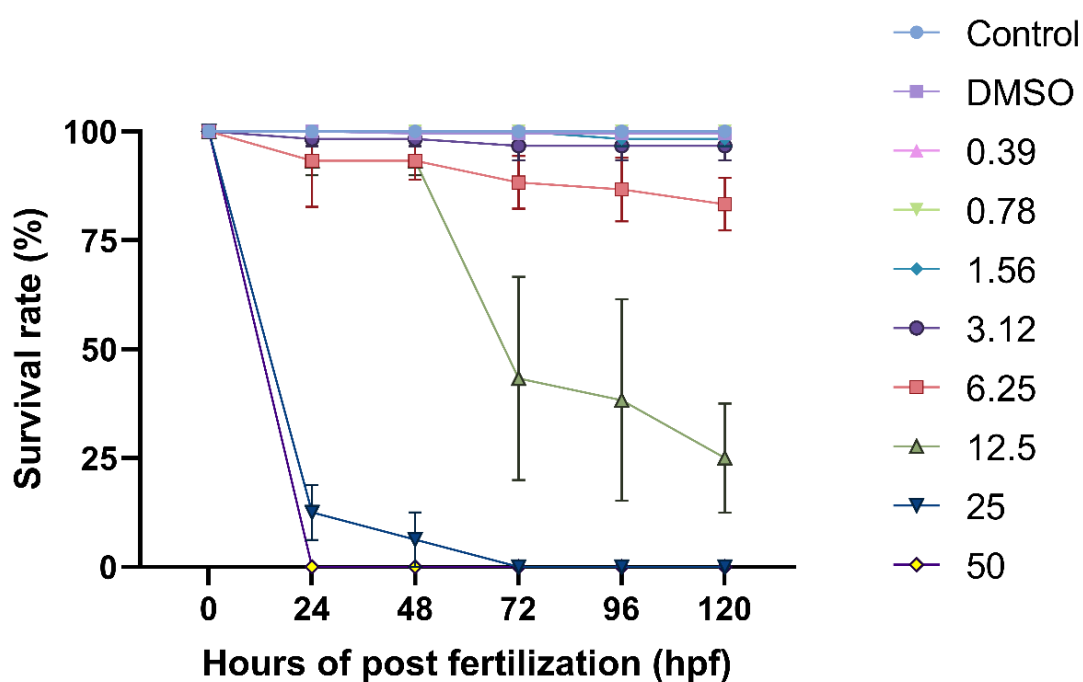


Fig. 2 Survival rate (%) of zebrafish (*Danio rerio*) embryos/larvae at 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h after exposure to different concentrations (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, and 0.39 $\mu\text{g/mL}$) of *Cymbopogon citratus* EO

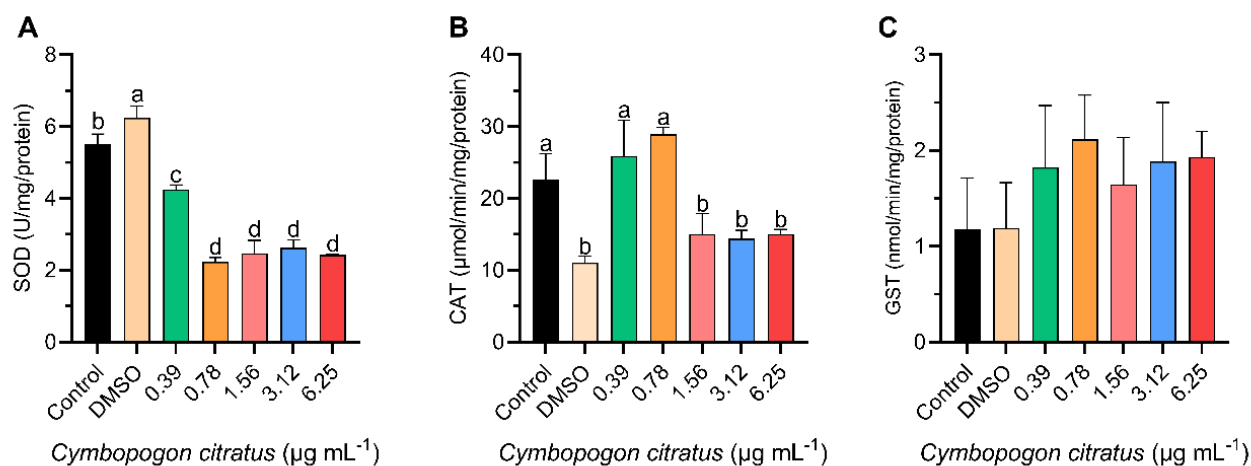


Fig. 3 Effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* on the activity of the antioxidant enzymes SOD (A), CAT (B) and GST (C) in zebrafish embryos/larvae at 96 hpf. Data are expressed as the mean \pm SEM (n = 120 larvae per treatment). Different superscript letters indicate significant differences between groups by Tukey's test

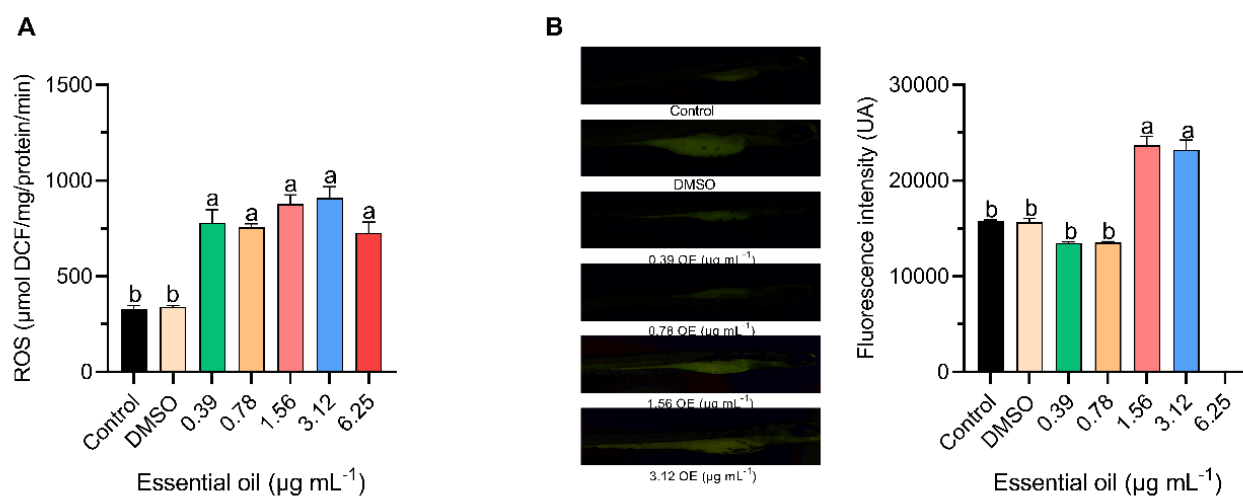


Fig. 4 Effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* on the ROS production (A) e effect of *Cymbopogon citratus* EO on cell apoptosis in zebrafish larvae (B). Data are expressed as the mean \pm SEM in % relative to the control group (n = 120 larvae per treatment)

ARTIGO 2 – Avaliação do potencial anti-inflamatório e antioxidante do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em zebrafish

Artigo elaborado conforme as normas NBR 6022 (ABNT 2018)

Avaliação do potencial anti-inflamatório e antioxidante do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em zebrafish

Kiara Cândido Duarte da Silva^a, Maria de Fátima Santos^b, Bárbara do Carmo Rodrigues Virote^a, Tássia Flávia Dias Castro^c, João Paulo Lima de Oliveira^b, William Franco Carneiro^a, Luis David Solis Murgas^a

^a Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, 37200-900, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, 37200-900, Minas Gerais, Brazil

^c Institute of Biomedical Sciences da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

RESUMO

A *Cymbopogon citratus* DC. Stapf (*Poaceae*), é popularmente conhecida como capim-limão e vários atributos dessa planta já foram relatados. No entanto, o uso de seu óleo essencial (OE) em embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*) ainda é limitado. Por esta razão, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial anti-inflamatório, através da regeneração da nadadeira caudal, recrutamento de neutrófilos e avaliação do efeito protetor do OE da *C. citratus* contra o estresse oxidativo, apoptose e espécies reativas de oxigênio induzido por peróxido de hidrogênio no zebrafish. Foram testadas cinco concentrações do OE da *C. citratus* (6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39 µg/mL) e seus efeitos foram analisados na migração de neutrófilos, regeneração da nadadeira caudal, atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-transferase (GST), apoptose e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), em embriões e larvas de zebrafish. Os resultados mostraram uma redução significativa na migração de neutrófilos em todos os tratamentos com OE, quando comparados com os do grupo controle. As maiores concentrações de OE (3,12 e 6,25 µg/ml) apresentaram uma redução significativa do processo de regeneração da nadadeira caudal. Além disso, foi observada uma redução significativa da atividade da SOD em todas as concentrações do OE. A atividade da CAT foi significativamente menor no grupo 3,12 µg/ml. Por outro lado, a atividade da GST aumentou significativamente nos grupos 0,78 e 1,56 µg/ml, quando comparados ao grupo controle. Não houve diferença significativa na produção de ROS. Uma redução da apoptose celular foi observada em todas as concentrações do OE, quando comparadas com o controle H₂O₂. Os resultados do presente estudo, indicam que o OE da *C. citratus* possui potencial para efeito anti-inflamatório, regenerativo, e proteção contra formação de radicais livres.

Palavras-chave: *Danio rerio*. Radicais livres. Capim-limão. Planta medicinal.

1. Introdução

O uso de plantas medicinais tem sido a base da medicina tradicional há milhares de anos, mas menos de 10% dessa biodiversidade é utilizada (RAJCEVIC et al., 2022). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% dos países em desenvolvimento utilizam a medicina tradicional apenas na atenção primária à saúde, dos quais 85% utilizam plantas medicinais e extratos vegetais (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012). Existem vários fatores motivadores para o uso de plantas medicinais no Brasil, como a diversidade de plantas e o baixo custo associado aos tratamentos, que têm despertado o interesse de programas e profissionais de saúde (SANTOS et al., 2011).

A *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf é popularmente conhecida como capim-limão e é uma das plantas medicinais mais reportadas no Brasil, no que se refere a sua aplicação na saúde humana (KARAMI et al., 2021). Os efeitos medicinais da espécie são provenientes do óleo essencial (EO) (KARAMI et al., 2021). OE é um produto derivado de metabólitos secundários produzidos por espécies vegetais e é uma fonte rica para o desenvolvimento de novos fármacos (BOULOURI et al., 2022), tal fato, propicia o direcionamento de investigações fitoquímicas do OE nas espécies de *Cymbopogon* (KARAMI et al., 2021). Segundo o levantamento bibliográfico conduzido por Tibenda et al. (2022), o OE de *C. citratus* demonstrou efeito antiprotozoário, antibacteriano, antifúngico, antimalária e inseticida.

O estudo de compostos naturais e substâncias derivadas de plantas é complexo, visto que, são combinações de múltiplos metabólitos que podem sofrer alterações em sua atividade quando retirados do meio ambiente (LI e WENG, 2017). Para averiguar se uma planta possui potencial como medicamento, é de suma importância pesquisar diversos fatores, incluindo cultivo, etnofarmacologia, utilização, extração e caracterização de ingredientes ativos, eficácia, segurança e avaliação pré-clínica e clínica (STUART et al., 2020). Além disso, avaliações toxicológicas em animais são necessárias para determinar as possíveis consequências negativas e, diante das múltiplas configurações químicas encontradas em substâncias naturais, é possível descobrir novas moléculas que possam ser transformadas em medicamentos (AWARE et al., 2022).

O zebrafish (*Danio rerio*) é um modelo vantajoso para estudos de drogas com potencial para tratar doenças (MIZGIREV e REVSKOY, 2010) e é um substituto adequado para animais de laboratório, tais como ratos, camundongos e coelhos (MODARRESI CHAHARDEHI; ARSAD; LIM, 2020) e devido às semelhanças

morfológicas, genéticas e fisiológicas com humanos (TEAME et al., 2019). O zebrafish permite obter resultados rápidos e precisos sobre várias substâncias e seus possíveis impactos, o que é um dos principais objetivos das pesquisas que envolvem toxicidade (BAMBINO e CHU, 2017; HAN et al., 2018). Além do mais, é de fácil manuseio, rápido desenvolvimento (CABALLERO; CANDIRACCI, 2016), baixo custo, utilização de todos os estágios de vida (JAYASINGHE e JAYAWARDENA, 2019), genoma sequenciado (PHAM et al., 2016), reprodução externa e embriões transparentes (HE et al., 2014). Desse modo, a utilização desse modelo fornecerá informações sobre mecanismos de toxicidades de plantas medicinais e facilitará a identificação e descoberta de novos medicamentos para o tratamento de doenças (MODARRESI CHAHARDEHI; ARSAD; LIM, 2020).

Portanto, o presente estudo avaliou o potencial anti-inflamatório, através da regeneração da nadadeira caudal, recrutamento de neutrófilos e avaliação do efeito protetor do OE da *C. citratus* contra o estresse oxidativo, apoptose e espécies reativas de oxigênio (ROS) induzido por peróxido de hidrogênio no zebrafish.

2. Material e Métodos

2.1 Declaração ética em experimentos com animais

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as orientações éticas para o cuidado e uso de animais de laboratório, conforme aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Lavras-UFLA, Lavras, MG, Brasil, sob o protocolo nº 003/2021 e de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.2 Material vegetal e preparação do óleo essencial

A coleta de *C. citratus* foi realizada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, MG, Brasil (21° 13' 48.8'' S; 44° 58' 28.5'' W). A espécie foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Lavras (ESAL18409). As folhas foram cortadas e pesadas em balança analítica para a obtenção do OE vegetal. A extração do OE foi realizada no Laboratório de Fitoquímica da UFLA,

seguindo os procedimentos descritos por (MAGALHÃES et al., 2013). Utilizando 996,14 g de folhas frescas e 8 litros de água destilada, as amostras foram tratadas pela técnica de arraste a vapor por 3 horas. Após a extração, o OE foi purificado por decantação e armazenado no freezer (-4°C) por 24 horas. A taxa de extração do óleo foi expressa em mg/g de massa seca da planta (CARVALHO et al., 2020). O material foi mantido em temperatura ambiente e protegido da luz até a realização dos bioensaios. As concentrações do OE utilizadas foram 6,25; 3,12; 1,56; 0,79; 0,39 µg / mL diluídas em 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO). As concentrações foram determinadas conforme proposto por (HE et al., 2018; KIM et al., 2017).

2.3 Manutenção do zebrafish e coleta de embriões

Os animais foram mantidos em uma rack específica para a espécie (Rack Hidrus, modelo ZEB-60). Foram utilizados 100 animais adultos de zebrafish linhagem selvagem (WT), sendo mantidos dez animais por aquário, onde machos e fêmeas foram separados por uma divisória de acrílico perfuradas no sistema de recirculação. Os animais foram mantidos em fotoperíodo com 14:10 (luz:escuro), temperatura de 28°C e alimentados duas vezes ao dia com ração floculada e uma vez ao dia com náuplios de artêmia.

Pela manhã, as divisórias dos aquários eram retiradas meia hora antes do término do período escuro e os animais eram acondicionados em criadeiras de acrílico para acasalamento. Após duas horas, os embriões eram coletados e colocados em uma placa de petri com o meio E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄), até a realização dos ensaios biológicos (ZHAO et al., 2019).

2.4 Atividade inflamatória

2.4.1 Migração de neutrófilos

Para avaliar a migração de neutrófilos, foram utilizados 60 embriões por tratamento, em triplicata, com 8 hpf expostos a 0,003% de 1-fenil-2-tioureia (PTU; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) para bloquear sua melanização. Após 72 horas pós fertilização (hpf), as larvas foram expostas às diferentes concentrações do OE durante 2 horas antes de serem submetidas a uma lesão na nadadeira caudal. Em seguida, as larvas foram anestesiadas com 0,016% de triclaína, colocadas em uma placa de petri e os

primórdios das barbatanas cortados com uma lâmina de bisturi cirúrgico logo após a notocorda, utilizando um estereomicroscópio (HASEGAWA et al., 2017). As larvas foram então retornadas para às soluções testadas e incubadas a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 horas (POLEDNIK et al., 2018).

Após as 6 horas, as larvas foram fixadas com uma solução de paraformaldeído a 4% durante a noite e coradas usando Sudan Black por 20 min. (POLEDNIK et al., 2018). Em seguida, foram lavadas em etanol 70% para remover o excesso de coloração e facilitar a visualização de neutrófilos individuais (WALTER et al., 2009). As imagens foram fotografadas e a contagem foi realizada utilizando um estereomicroscópio (Olympus, CX31, Tóquio, JP).

2.4.2 Regeneração de cauda

Para avaliar a capacidade de regeneração de cauda, foram utilizadas vinte larvas de zebrafish, seguindo o protocolo descrito por Sun et al. (2019). Os embriões foram cultivados no meio E3 até 72 horas pós-fertilização (hpf). Posteriormente, as larvas foram anestesiadas com 0,016% de triclaína e colocadas em uma placa de Petri. Utilizando um estereomicroscópio (Olympus, CX31, Tokyo, Japão), os primórdios das barbatanas caudais foram cortados com uma lâmina de bisturi cirúrgico na região logo após a notocorda (HASEGAWA et al., 2017). As larvas foram imediatamente fotografadas após a amputação (0 hora pós-amputação (hpa)) utilizando um microscópio (Olympus, modelo Tóquio, JP). Em seguida, as larvas foram colocadas em suas respectivas concentrações de OE em uma placa de 96 poços (1 larva por poço) com 200 μl e fotografadas novamente 72 horas pós-amputação (hpa). A área regenerada da nadadeira caudal da larva foi quantificada usando o software Motic Image Plus 3.0.

2.5 Atividade antioxidante e apoptótica induzida por peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para analisar o efeito antioxidante e apoptótico do OE foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como indutor intracelular do estresse oxidativo (KIM et al., 2021). Este composto químico se difunde facilmente através da membrana celular reagindo com os íons intracelulares, originando a geração de radicais hidroxila, altamente reativos e induzindo a morte celular via sinalização oxidativa (JANG et al., 2009; JAYASINGHE e

JAYAWARDENA, 2020; KANG et al., 2015; SIES, 2017). Os embriões logo após a reprodução foram expostos as concentrações do OE por 1 hora. Em seguida, adicionou-se 7,5 mM de H₂O₂ em cada placa (KANG et al., 2015; SANTOS et al., 2020). Este método foi realizado para ambas análises (itens 2.5.1 e 2.5.2).

2.5.1 Atividade antioxidante das larvas

Para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes, foram utilizadas um *pool* de 40 larvas por tratamento, com 96h de exposição às diferentes concentrações do OE (SANTOS et al., 2020). Subsequentemente, as larvas foram colocadas em microtubos juntamente com 400 µL de tampão-fosfato salino (PBS) frio (0°C) e maceradas com um bastão de vidro. Os homogenatos foram então centrifugados a 4000 g por 15 minutos a 4° C, e o sobrenadante foi coletado e armazenada -20°C até a realização das análises (XIONG et al., 2019a; XIONG et al., 2019b).

A albumina de soro bovino foi usada como padrão para calcular as concentrações de proteína usando o método de (BRADFOORD, 1976) a 595 nm. A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo método de (CLAIBORNE, 1985) e os resultados foram expressos em µ/mol de H₂O₂ degradado por minuto por mg de proteína. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com Song et al. (2009), em que uma unidade de atividade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima que causou uma redução de 50% na taxa de fotorredução do NBT e os resultados foram expressos como unidades de SOD por mg de proteína (GU et al., 2019; SONG et al., 2009). Habig e Jakoby (1981) propuseram um método para medir a atividade da Glutathione-S-transferase (GST). A atividade da GST foi mensurada por meio da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno que foi estimada pela redução da absorbância a 340 nm por 3 min, em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em unidade por mg de proteína (VELKI et al., 2019).

2.5.2 Apoptose celular

Para a identificação das células apoptóticas utilizou-se vinte larvas com 72 hpf tratadas com OE, em seguida, foram lavadas 2 vezes com meio E3. Posteriormente, foram coradas em uma solução contendo 5 µg / mL de laranja de acridina (AO) por 20 minutos

em ambiente escuro e temperatura ambiente (XIA et al., 2017; ZHAO et al., 2019). Logo após, lavadas 3 vezes com E3 durante 5 minutos cada e finalmente anestesiada com triclaína a 100 mg/L. A intensidade de fluorescência foi avaliada no espectrofotômetro (Tecan, Infinite 200 Pro, Suíça) (excitação = 490 nm e emissão = 520 nm) e fotografadas no microscópio de fluorescência (Zeiss V16 Axio Zoom com filtro de 546 nm).

3. Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, quando atendido a este pressuposto foi realizada análise de variância (ANOVA), diferenças significativas foram determinadas pelo teste de post-hoc de Tukey à 5% de significância, utilizando o programa Minitab® versão 18 (Minitab LLC, Stage College, PA).

4. Resultados

4.1 Migração de neutrófilos

Foi observada uma redução significativa na migração de neutrófilos em todos os tratamentos com OE em comparação com os do grupo controle.

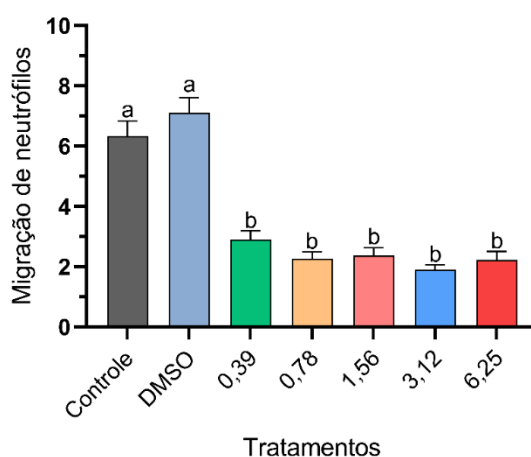


Figura 1- Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na migração de neutrófilos. Os dados são expressos como média \pm SEM (n = 140 larvas por tratamento). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey.

4.2 Regeneração de cauda

Durante o processo de regeneração caudal, as concentrações mais baixas do OE (0,39; 0,78 e 1,56 $\mu\text{g/ml}$) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle corte, no entanto, as concentrações mais altas (3,12 e 6,25 $\mu\text{g/ml}$) inibiram o processo de regeneração, pois houve diferenças significativas em relação ao grupo controle e ao controle corte.

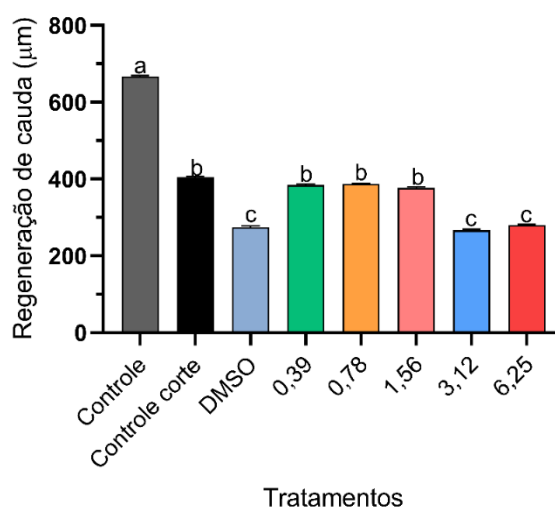


Figura 2- Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na regeneração de cauda. Os dados são expressos como média \pm SEM (n = 140 larvas por tratamento). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey.

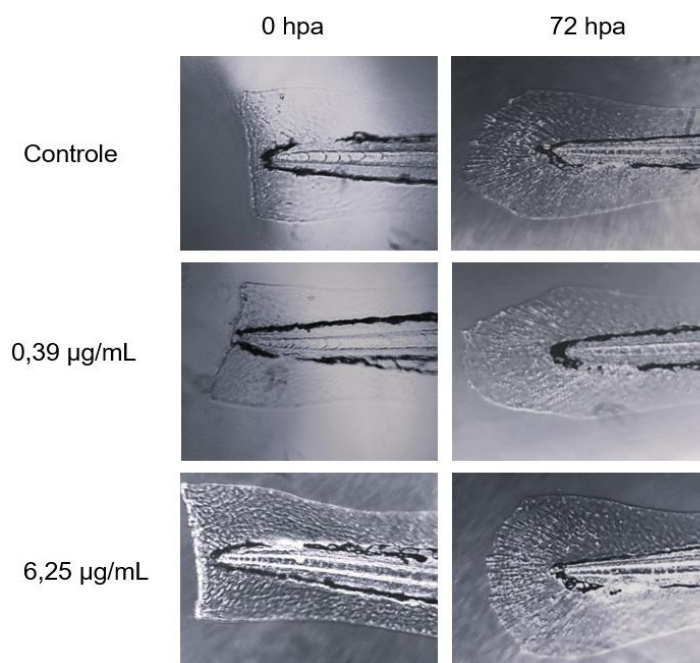


Figura 3- Imagens microscópicas da regeneração de cauda em larvas expostas ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus* à 0 e 72 horas pós amputação (hpa).

4.3 Atividade antioxidantes induzida por H₂O₂

A atividade da SOD foi reduzida significativamente em todas as concentrações. No entanto, atividade da CAT não demonstrou diferença significativa com o controle, exceto, na concentração 3,12 µg/ml. Houve um aumento significativo na atividade da GST 0,78 e 1,56 µg/ml (Fig.3).

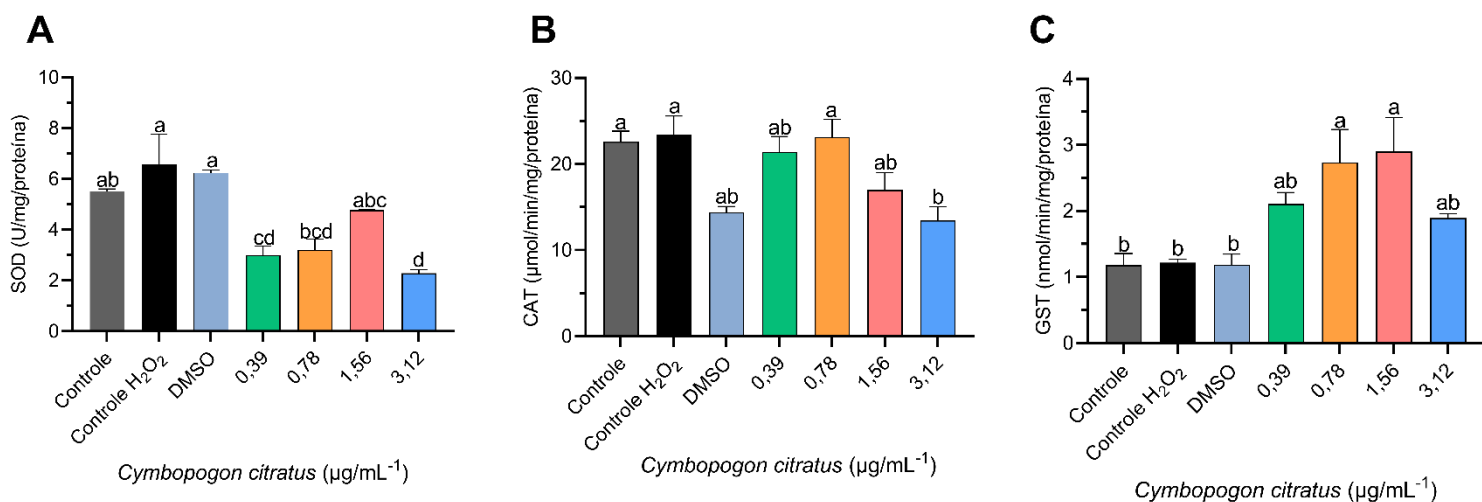


Figura 4- Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* na atividade das enzimas antioxidantes SOD (A), catalase (B), GST (C) em embriões/larvas de zebrafish a 96 hpf. Os dados são expressos como média \pm SEM (n = 120 larvas por tratamento). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey.

4.4 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose

Não houve diferença significativa na produção de ROS quando comparado com o controle. Os resultados da apoptose demonstrou que concentração 0,39 $\mu\text{g/ml}$ apresentou uma redução na apoptose quando comparado aos demais tratamentos, porém não houve diferença significativa com o controle. A concentração 3,12 $\mu\text{g/ml}$ teve uma inclinação a reduzir também, porém foi igual as concentrações 0,78 e 1,56 $\mu\text{g/ml}$.

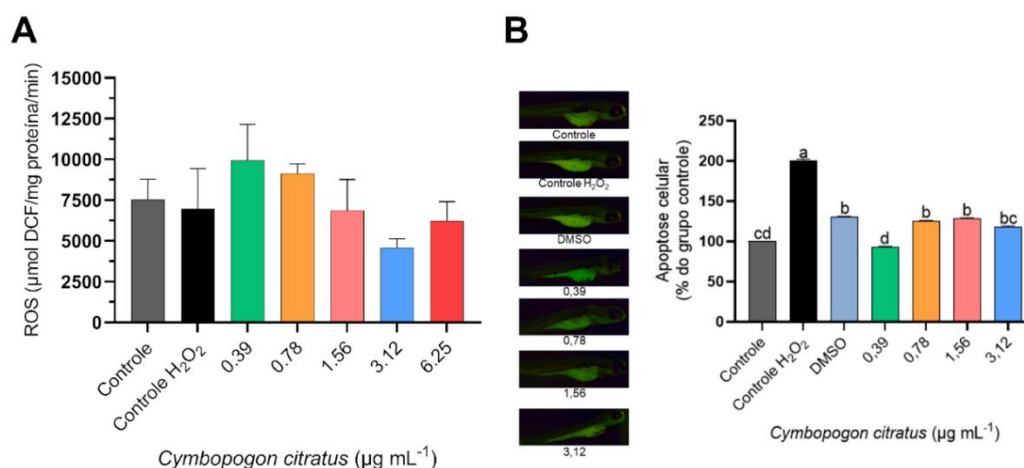


Figura 5-Efeito do OE de *Cymbopogon citratus* na produção de ROS (A) e na apoptose celular em larvas de zebrafish submetidas ao H_2O_2 a 96 hpf (B). Os dados são expressos como média \pm SEM da % do grupo controle (n = 120 larvas por tratamento). Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos pelo teste de Tukey.

5. Discussão

No presente estudo todas as concentrações do OE de *C. citratus* demonstraram um efeito anti-inflamatório, visto que, reduziu significativamente a infiltração de neutrófilos durante a resposta inflamatória em relação ao grupo controle. A migração de neutrófilos é fundamental para respostas fisiológicas a lesões e infecções ao tecido. São os primeiros leucócitos recrutados para os locais de inflamação, onde fagocitam e eliminam microrganismos produzindo EROs e/ou proteínas antibacterianas (KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013). O número de leucócitos migratórios é considerado uma medida da gravidade da resposta inflamatória (HE et al., 2020), ou seja, quanto menor o número de neutrófilos presentes menor é a resposta inflamatória. Além disso, a atividade descontrolada e excessiva de neutrófilos pode levar inflamação persistente, dano tecidual ou ao surgimento de doenças (YANG et al., 2018).

No estudo de Leite et al. (2010) o OE de *C. winterianus* inibiu a migração de neutrófilos induzida por carragenina em camundongos de forma dose-dependente. Esse bloqueio pode ser atribuído a inibição de mediadores inflamatórios, tais como, óxido nítrico, prostaglandina E₂, interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α que estão envolvidos na migração celular (LORAM et al., 2007). Várias moléculas, incluindo alguns monoterpenos (neral e geranial), presentes no OE da *C. citratus*, podem contribuir para a inibição parcial da liberação de substâncias inflamatórias (PÉREZ et al., 2011). Estudos também demonstraram que o citral inibe a produção de IL-1b, IL-6 e TNF- α (EMÍLIO-SILVA et al., 2020; LIN et al., 2008). Além disso, estudo com OE de capim-limão, gerânio e hortelã que contêm compostos como, citral, geranial, neral e carvona também demonstraram que esses compostos inibem a produção de citocinas pró-inflamatória (ABE et al., 2003; BOUKHATEM et al., 2014).

A migração de neutrófilos está intimamente relacionada com o processo de regeneração tecidual. É um processo pelo qual estruturas danificadas são capazes de se reconstituir parcialmente ou completamente. O zebrafish apresenta regeneração epimórfica com alta capacidade regenerativa de várias estruturas complexas como, barbatanas, coração, cérebro, retina e outros tecidos (GERMBERLING et al., 2013). Durante esse processo dois tecidos característicos, a epiderme da ferida e o blastema, são induzidos em resposta à amputação tecidual, e suas ações coordenadas regulam a proliferação e morfogênese celular e, assim, levam à regeneração (HASEGAWA et al., 2017). A aplicação do OE de *C. citratus* para a avaliação da regeneração da cauda nas larvas de zebrafish ainda não foi relatado na literatura. No presente estudo, as menores concentrações não apresentaram diferença significativa com o controle corte, no entanto,

as maiores concentrações 3,12 e 6,25 µg/ml, o processo de regeneração foi inibido, afetando assim a regeneração da nadadeira caudal, mesmo o OE tendo um resultado positivo na migração de neutrófilos. O que pode estar relacionado com os resultados no teste de embriotoxicidade em que as larvas nessas mesmas concentrações apresentaram alterações morfológicas como, lordose e deformidade de cauda. Estudos demonstram que esses efeitos teratogênicos podem ser ocasionados pelos compostos encontrados no OE como, citral, linalol, geraniol, acetato de geranila e a própria combinação dos compostos do OE (SINGULANI et al., 2018; SOUZA et al., 2020). Visto que, atuam rapidamente sobre o organismo podendo afetar as taxas respiratórias acarretando danos aos processos fisiológicos e atividades musculares, ocasionando paralisia permanente (PLATA-RUEDA et al., 2020). Podendo explicar assim, a inibição da regeneração nas maiores concentrações.

Os estudos sobre regeneração estão interligados com estudos sobre desenvolvimento embrionário (VIERA-VERA; GARCÍA-ARRARÁS, 2019). Por esse motivo, moléculas sinalizadoras conhecidas por regular processos de desenvolvimento são objeto de muitas pesquisas sobre regeneração. Um exemplo é o ácido retinóico (AR), que está envolvido em vários processos regenerativos, como a regeneração das nadadeiras e do coração no zebrafish (GUDAS, 2012).

O citral, que é um dos compostos do OE da *C. citratus*, tem sido utilizado como inibidor da via de sinalização do AR, afetando a regeneração tecidual. Estudo com larvas e adultos de zebrafish expostas ao citral demonstram que houve inibição da sinalização de AR prejudicando assim o epitélio da ferida, formação de blastema e bloqueando a regeneração da nadadeira (MATHEW et al., 2009). Pesquisa com pepino do mar, demonstra que houve uma redução significativa no rudimento intestinal, divisão e desdiferenciação celular nos tecidos regenerados quando comparado com o controle (VIERA-VERA, GARCÍA-ARRARÁS, 2019). Em um estudo com axalote demonstram que o citral causou uma taxa mais lenta de regeneração dos membros anteriores prejudicando gravemente o padrão dos membros (SCADDING, 1999) e inibiu a formação da metade posterior do intestino (esôfago, estômago, intestino) após amputação (KANEKO et al., 2010).

O organismo sofre várias reações químicas de oxidação e redução de elétrons que são de suma importância para os processos metabólicos (GULCIN, 2011; GULCIN, 2020). Quando há o desacoplamento de elétrons na última camada de valência tem-se a geração de radicais livres, que são altamente instáveis e reativos (GULCIN, 2020; NEHA

et al., 2019). A produção excessiva de radicais livres ou uma deficiência dos sistemas antioxidantes, origina a condição de estresse oxidativo (GULCIN, 2020; NEHA et al., 2019).

Enzimas antioxidantes como, SOD, CAT e GST são conhecidas por desempenhar papéis centrais nos mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo induzido por radicais livres (ISLEKEL et al., 1999; NITA et al., 2001). SOD é a principal enzima de defesa contra a superprodução de O_2^- , convertendo-o em H_2O_2 . (NITA et al., 2001). A CAT degrada o H_2O_2 em H_2O e O_2 (MIRGHAED; PAKNEJAD; MIRZARGAR, 2020; WU et al., 2011). As GSTs são enzimas que agem diretamente na biotransformação de compostos exógenos e endógenos, desintoxicando o organismo das EROs (DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000; CHATTERJEE e GUPTA, 2018; GLISIC et al., 2015). Este estudo utilizou o H_2O_2 como indutor intracelular do estresse oxidativo e apoptose celular, uma vez que este radical livre induz a morte celular através da sinalização oxidativa (JAYAWARDENA et al., 2020; SIES, 2017). H_2O_2 é uma molécula estável que se difunde rapidamente através da membrana celular como um transportador específico e é convertida em radicais hidroxila altamente reativos (JANG et al., 2009).

No presente estudo, os animais foram tratados previamente com o OE de *C. citratus*. Os níveis da SOD diminuíram significativamente, podendo indicar que o OE agiu como antioxidante, visto que, o organismo não produziu SOD para combater as EROs. As reduções observadas podem ser atribuídas a um mecanismo de ação antioxidante simultânea entre os compostos (ANDRADE et al., 2014), como, os monoterpenos, principalmente o citral, que mostrou sua atividade antioxidante em outras pesquisas (BICAS et al., 2011; MIGUEL, 2010). Um estudo que utilizou o OE de *C. martinii* na inalação de ratos demonstrou redução na atividade da SOD, devido a ação concomitante dos compostos linalol e β -cariofileno (ANDRADE et al., 2014), que podem ser encontrados no OE de *C. citratus*, mostrado em nosso estudo anterior. Dado que, a capacidade de sequestro de radicais livres necessita do número de radicais de hidroxila na molécula (FAINE et al., 2006), a utilização do OE *C. citratus* pode ter contribuído para a redução na formação de EROs.

Ocorreu aumento nos níveis da CAT, exceto na maior concentração que obteve uma diminuição significativa em relação ao controle. Os resultados da CAT podem ser explicados pelas dosagens utilizadas. As concentrações inferiores a 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não foram suficientes para inibir a ação das EROs presente no organismo (ANDRADE et al., 2014), uma vez que, a indução do estresse no organismo disponibilizou muito H_2O_2 no

meio. Dados experimentais mostraram que os terpenóides, que são os principais componentes dos OEs, são responsáveis por sua ação antioxidante (GRABMANN, 2005; FADEL et al., 1999), podendo explicar a diminuição da atividade da SOD e da CAT.

Os níveis da GST aumentaram principalmente nas concentrações 0,78 e 1,56 µg/ml. Buch et al. (2012) avaliou o efeito neuroprotetor do OE de *C. martinii* contra o estresse oxidativo induzido por isquemia/reperfusão cerebral (I/R) global em ratos, demonstrou resultado semelhante na atividade da GST.

A superprodução de ROS está correlacionada com a morte celular, pois o desequilíbrio iônico pode levar a danos diretos e indiretos aos ácidos nucleicos, alterar a estrutura e a função de lipídios e proteínas celulares e, por fim, levar à morte celular (GULCIN, 2020; NEHA et al., 2019). Os resultados deste estudo mostraram que todas as concentrações do OE não foram diferentes quando comparado com os grupos controles. No entanto, os resultados da apoptose demonstram que todas as concentrações do OE reduziram a apoptose em comparação com o grupo controle H₂O₂. As concentrações 0,39 e 3,12 µg/ml reduziram a apoptose celular, porém não foi observado diferença significativa quando comparado com o controle e a concentração 3,12 µg/ml foi igual as concentrações 0,78 e 1,56 µg/ml e ao DMSO.

Os possíveis responsáveis por essa inibição da apoptose celular pode ser a própria composição do OE, visto que, existe estudo que mostrou o efeito positivo do OE na neuroproteção da necrose celular induzida pelo glutamato (TAYEBOON et al., 2013). Além disso, estudo com *Litsea cubeba* que possui o citral como composto ativo, o majoritário do OE da *C. citratus*, demonstrou possível potencial renoprotetor para inflamação renal com base no seu efeito antiapoptótico (YANG et al., 2013). Portanto, OE pode ter exercido um efeito protetor nas larvas expostas ao H₂O₂.

6. Conclusão

Os resultados do presente estudo indicam que o OE da *C. citratus* possui potencial anti-inflamatório e protetor contra radicais livres. Portanto, esse trabalho corrobora e complementa estudos, sobre a utilização segura do OE da *C. citratus* o que ainda é escasso na literatura e se faz necessário estudos mais detalhados dos seus possíveis efeitos manipulando um modelo animal.

Referências

- ABE, S. et al. Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. **Mediators of inflammation**, v. 12, n. 6, p. 323-328, 2003.
- ANDRADE, B. F. M. T. et al. Effect of inhaling *Cymbopogon martinii* essential oil and geraniol on serum biochemistry parameters and oxidative stress in rats. **Biochemistry research international**, v. 2014, 2014.
- AWARE, C. B. et al. Natural bioactive products as promising therapeutics: A review of natural product-based drug development. **South African Journal of Botany**, 2022.
- BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in toxicology and environmental health. **Current topics in developmental biology**, v. 124, p. 331-367, 2017.
- BICAS, J. L. et al. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 7, p. 1610-1615, 2011.
- BOUKHATEM, M. N. et al. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J Med.* 2014; 9: 10.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BUCH, Prakruti et al. Neuroprotective activity of *Cymbopogon martinii* against cerebral ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 35-40, 2012.
- CABALLERO, M. V.; CANDIRACCI, M. Zebrafish as Toxicological model for screening and recapitulate human diseases. 2016.
- CHATTERJEE, A.; GUPTA, S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. **Cancer letters**, v. 433, p. 33-42, 2018.
- CARVALHO, V. F. et al. In vitro anthelmintic activity of *Siparuna guianensis* extract and essential oil against *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of helminthology**, v. 94, 2020.
- CLAIRBORNE, A. Catalase activity. In: RA, G. (Ed.), *CRC handbook of methods in oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 283–284, 1985.
- DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain: metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 16, p. 4912-4916, 2000.

EMÍLIO-SILVA, M. T. et al. Hypothermic Effect of Acute Citral Treatment during LPS-induced Systemic Inflammation in Obese Mice: Reduction of Serum TNF- α and Leptin Levels. **Biomolecules**, v. 10, n. 10, p. 1454, 2020.

FADEL, H. et al. Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of *Eucalyptus camaldulensis* var. *brevirostris* leaf oils. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A**, v. 208, n. 3, p. 212-216, 1999.

FAINE, L. A. et al. Effects of olive oil and its minor constituents on serum lipids, oxidative stress, and energy metabolism in cardiac muscle. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 84, n. 2, p. 239-245, 2006.

GEMBERLING, M. et al. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 11, p. 611-620, 2013.

GRABMANN, J. Terpenoids as plant antioxidants. **Vitamins & Hormones**, v. 72, p. 505-535, 2005.

GUDAS, L. J. Emerging roles for retinoids in regeneration and differentiation in normal and disease states. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1821, n. 1, p. 213-221, 2012.

GU, J. et al. Neurobehavioral effects of bisphenol S exposure in early life stages of zebrafish larvae (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 217, p. 629-635, 2019.

GÜLCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345-391, 2012.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. **Archives of toxicology**, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.

GLISIC, B. et al. Characterization of glutathione-S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic toxicology**, v. 158, p. 50-62, 2015.

HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Method. Enzymol**, v.77, 398–405, 1981.

HAN, H.S. et al. Transgenic zebrafish model for quantification and visualization of tissue toxicity caused by alloying elements in newly developed biodegradable metal. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 2018.

HASEGAWA, T. et al. Transient inflammatory response mediated by interleukin-1 β is required for proper regeneration in zebrafish fin fold. **Elife**, v. 6, p. e22716, 2017.

HE, J.H. et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicol Teratol**, v. 42, p.35-42, 2014.

HE, Y. et al. Angiogenic effect of motherwort (*Leonurus japonicus*) alkaloids and toxicity of motherwort essential oil on zebrafish embryos. **Fitoterapia**, v. 128, p.

36-42, 2018.

HE, M. et al. Ginsenoside Rg1 acts as a selective glucocorticoid receptor agonist with anti-inflammatory action without affecting tissue regeneration in zebrafish larvae. **Cells**, v. 9, n. 5, p. 1107, 2020.

IŞLEKEL, S. et al. Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion. **Research in Experimental Medicine**, v. 199, n. 3, p. 167-176, 1999.

JANG, J. S. et al. Taurine chloramine activates Nrf2, increases HO-1 expression and protects cells from death caused by hydrogen peroxide. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 45, n. 1, p. 37-43, 2009.

JAYASINGHE, C. D.; JAYAWARDENA, U A. Toxicity assessment of herbal medicine using zebrafish embryos: A systematic review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

JAYAWARDENA, T. U. et al. Antioxidant potential of sulfated polysaccharides from *Padina boryana*; Protective effect against oxidative stress in in vitro and in vivo zebrafish model. **Marine Drugs**, v. 18, n. 4, p. 212, 2020.

KANEKO, N. et al. Regeneration of the gut requires retinoic acid in the budding ascidian *Polyandrocarpa misakiensis*. **Development, growth & differentiation**, v. 52, n. 5, p. 457-468, 2010.

KANG, M. et al. Antioxidant activity of polysaccharide purified from *Acanthopanax koreanum* Nakai stems in vitro and in vivo zebrafish model. **Carbohydrate polymers**, v. 127, p. 38-46, 2015.

KIM, S. H., SHARMA, C., KANG, S. C. *Ajowan* Oil Potentiates Ros-mediated Teratogenic Effect in Zebrafish Embryos. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 20, n.4, p.883–896, 2017.

KIM, S. et al. Antioxidant effects of turmeric leaf extract against hydrogen peroxide-induced oxidative stress In Vitro in vero cells and in vivo in zebrafish. **Antioxidants**, v. 10, n. 1, p. 112, 2021.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature reviews immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.

LEITE, B. L. S et al. Assessment of antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 10, p. 1164-1169, 2010.

LIN, C. T. et al. Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 18, p. 8783-8787, 2008.

LORAM, L. C. et al. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory

hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **The Journal of Pain**, v. 8, n. 2, p. 127-136, 2007.

MAGALHÃES, H. M. et al. Ação alelopática de óleos essenciais de alecrim-pimenta e capim-santo na germinação de aquênios de alface. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 485-495, 2013.

MATHEW, L. K. et al. Comparative expression profiling reveals an essential role for *raldh2* in epimorphic regeneration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 48, p. 33642-33653, 2009.

MIRGHAED, A. T.; PAKNEJAD, H.; MIRZARGAR, S. S. Hepatoprotective effects of dietary *Artemisia (Artemisia annua)* leaf extract on common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient ammonia. **Aquaculture**, v. 527, p. 735443, 2020.

MIZGIREV, I. V.; REVSKOY, S. A new zebrafish model for experimental leukemia therapy. **Cancer biology & therapy**, v. 9, n. 11, p. 895-902, 2010.

MODARRESI CHAHARDEHI, A.; ARSAD, H.; LIM, V. Zebrafish as a successful animal model for screening toxicity of medicinal plants. **Plants**, v. 9, n. 10, p. 1345, 2020.

NEHA, K. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 178, p. 687-704, 2019.

NITA, D. Al et al. Oxidative damage following cerebral ischemia depends on reperfusion-a biochemical study in rat. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 5, n. 2, p. 163-170, 2001.

PÉREZ, G. S. et al. Anti-inflammatory activity of some essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, n. 5, p. 38-44, 2011.

PHAM, D.H. et al. Use of zebrafish larvae as a multi-endpoint platform to characterize the toxicity profile of silica nanoparticles. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

POLEDNIK, K. M.; KOCH, A. C.; FELZIEN, L. K. Effects of essential oil from *Thymus vulgaris* on viability and inflammation in zebrafish embryos. **Zebrafish**, v. 15, n. 4, p. 361-371, 2018.

PLATA-RUEDA, A. et al. Acute Toxicity and Sublethal Effects of Lemongrass Essential Oil and Their Components against the Granary Weevil, *Sitophilus granarius*. **Insects**, v. 11, n. 6, p. 379, 2020.

SANTOS, D. et al. Toxicological effects induced on early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) after an acute exposure to microplastics alone or co-exposed with copper. **Chemosphere**, v. 261, p. 127748, 2020.

SCADDING, S. R. Citral, an inhibitor of retinoic acid synthesis, modifies pattern

formation during limb regeneration in the axolotl *Ambystoma mexicanum*. **Canadian journal of zoology**, v. 77, n. 11, p. 1835-1837, 1999.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox biology**, v. 11, p. 613-619, 2017.

SINGULANI, J. L. et al. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. **Future Microbiology**, v. 13, n. 15, p. 1637-1646, 2018.

SONG, Y. et al. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 905-909, 2009.

SOUZA, A. C. S et al. Citral presents cytotoxic and genotoxic effects in human cultured cells. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 4, p. 435-440, 2020.

STUART, K. A. et al. Metabolomic tools used in marine natural product drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 15, n. 4, p. 499-522, 2020.

SUN, L. et al. Effects of 17 α -ethinylestradiol on caudal fin regeneration in zebrafish larvae. **Science of the Total Environment**, v. 653, p. 10-22, 2019.

TAYEBOON, G. S. et al. Efeitos dos extratos de *Cymbopogon citratus* e *Ferula assa-foetida* na neurotoxicidade induzida por glutamato. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 49, n. 9, p. 706-715, 2013.

TEAME, T. et al. The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. **Animal Frontiers**, v. 9, n. 3, p. 68-77, 2019.

VELKI, M. et al. Pesticides diazinon and diuron increase glutathione levels and affect multixenobiotic resistance activity and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. **Environmental Sciences Europe**, v. 31, n. 1, p. 4, 2019.

VIERA-VERA, J.; GARCÍA-ARRARÁS, J. E. Retinoic acid signaling is associated with cell proliferation, muscle cell dedifferentiation, and overall rudiment size during intestinal regeneration in the sea cucumber, *Holothuria glaberrima*. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 873, 2019.

WALTERS, K. B. et al. Muscle degeneration and leukocyte infiltration caused by mutation of zebrafish *Fad24*. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 238, n. 1, p. 86-99, 2009.

WU, M. et al. Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 30, n. 10, p. 2335-2341, 2011.

XIA, Q. et al. A developmental toxicity assay of *Carpesii fructus* on zebrafish embryos/larvae. **Toxicology research**, v. 6, n. 4, p. 460-467, 2017.

XIONG, G. et al. The hepatoprotective effects of *Salvia plebeia* R. Br. extract in zebrafish (*Danio rerio*). **Fish & shellfish immunology**, v. 95, p. 399-410, 2019a.

XIONG, G. et al. Clethodim exposure induces developmental immunotoxicity and neurobehavioral dysfunction in zebrafish embryos. **Fish & shellfish immunology**, v. 86, p. 549-558, 2019b.

YANG, S.M. et al. Citral is renoprotective for focal segmental glomerulosclerosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis and activating Nrf2 pathway in mice. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e74871, 2013.

YANG, Y. et al. Anti-inflammatory and proresolution activities of bergapten isolated from the roots of *Ficus hirta* in an in vivo zebrafish model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 496, n. 2, p. 763-769, 2018.

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