



KIARA CÂNDIDO DUARTE DA SILVA

**Efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em embriões
e larvas de *Danio rerio***

LAVRAS-MG

2020

KIARA CÂNDIDO DUARTE DA SILVA

**Efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em embriões e larvas
de *Danio rerio***

Monografia apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Curso
de Ciências Biológicas, para a
obtenção do título de Bacharel.

Aprovada em 14 de julho de 2020

Prof. Dr. Luis David Solis Murgas

Orientador

Ms. Bárbara do Carmo Rodrigues Virote

Coorientadora

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus pelo dom da vida e Nossa Senhora Aparecida, minha mãe, que sempre me iluminou e me cobriu com o seu Manto Sagrado.

Aos meus pais, Vanderleia e Cláudio e ao meu irmão Adriel, por todo amor, carinho, incentivo e que não pouparam esforços para que o meu sonho tornasse realidade. Vocês são a minha vida. Amo vocês.

Ao meu namorado Alexandre, pelo amor, carinho, amizade, cumplicidade, pelas palavras incentivadoras e compreensão. Obrigado por tudo.

À minha afilhada, Júlia, pelo amor puro e sincero.

A todos meus familiares pelas palavras de incentivo e atitude de segurança.

À minha amiga, Paloma, que esteve comigo em todos os momentos e que realmente foi um anjo na minha vida enviado por Deus para que a trajetória mesmo árdua ficasse mais fácil ao lado dela.

As minhas amigas do apartamento 201, por me proporcionarem momentos inesquecíveis e se tornarem minha família em Lavras.

Ao professor e orientador Dr. Luís David Solis Murgas que admiro como pessoa e profissional, por todo apoio, incentivo, ajuda, oportunidade, por confiar no meu trabalho e, sobretudo pela amizade durante esses anos.

À minha coorientadora Ms. Bárbara do Carmo Rodrigues Virote, pela excelente orientação, sempre esteve presente durante a execução do trabalho me dando todo suporte, atenção, apoio, incentivo e sempre acreditando no meu potencial. Pela amizade, carinho e conselhos.

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

a Fatinha, que foi de suma importância para a realização desse estudo, pela amizade e conselhos.

À Universidade Federal de Lavras, a todos os meus professores que ajudaram na minha formação pessoal e profissional. À Rede Mineira de Bioterismo e à 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 essa etapa.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO GERAL

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem desde a antiguidade devido as suas propriedades terapêutica, sendo empregadas de diferentes maneiras como chás, xaropes, cataplasmas e óleo essencial. Os OE são metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas que ficam armazenados em estruturas especializadas. Esses líquidos aromáticos podem ser obtidos de diferentes partes das plantas. A finalidade desses óleos é a proteção contra organismos patogênicos ou animais e atração de dispersores. Porém, o óleo essencial da *C. citratus* (capim-limão), é utilizado nas indústrias farmacêuticas como, anti-hipertensivo, antiasmático, antisséptico, antitérmico, antirreumático e miorelaxante, nas indústrias alimentícias para conservação de alimentos frescos e cosméticos na produção de sabonetes e máscaras faciais. A necessidade por produtos obtidos diretamente das plantas tem crescido muito atualmente no mercado. Devido à grande utilização popular da *C. citratus* é necessário pesquisas para analisar a segurança desta planta, benefícios e efeitos em um modelo experimental animal. O *Danio rerio* (zebrafish) é um modelo animal de baixo custo, todos os estágios de vida pode ser obtido em laboratório, possui 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. Muitos compostos oriundos de plantas medicinais utilizados por seres humanos foram testados primeiramente no modelo zebrafish, principalmente em relação a possíveis efeitos tóxicos ou teratogênicos. Portanto, tornando-se um excelente modelo para pesquisas.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	9
1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3 ÓLEOS ESSENCIAIS	12
3.1 História e Importância econômica	12
3.2 Definição e Características	13
3.3 Métodos de obtenção	14
4 <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf Poaceae	19
4.1 Origem e Aspectos botânicos	19
4.2 Aspectos Etnobotânicos	22
4.3 Benefícios comprovados em modelos animais	23
5 <i>Danio rerio</i>	25
5.1 <i>Danio rerio</i> como modelo para avaliação de produtos naturais	27
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	30
SEGUNDA PARTE	37
ARTIGO: Efeitos do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> em embriões e larvas de <i>Danio rerio</i>	37
1 RESUMO	38
2 ABSTRACT	39
3 INTRODUÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Local do experimento	41

4. 2 Obtenção do material vegetal	41
4. 3 Extração do óleo	41
4. 4 Preparação e diluição das concentrações testes	41
4. 5 Manutenção dos animais	42
4. 6 Protocolo de reprodução para obtenção de embriões.....	42
4. 7 Teste de toxicidade aguda em embriões de <i>Danio rerio</i>	42
4. 8 Avaliação dose – resposta	44
4. 9 Análise estatística	44
5 RESULTADOS	44
5. 1 Os efeitos das concentrações do OE da <i>C. citratus</i> na taxa de sobrevivência dos embriões e larvas do zebrafish	44
5.2 Mortalidade avaliada como medida da potência de toxicidade da <i>C. citratus</i> em embriões e larvas do zebrafish	45
5. 3 Os efeitos das concentrações do OE da <i>C. citratus</i> na taxa de eclosão no zebrafish	46
5. 4 Alterações teratogênicas causadas pelas concentrações do OE da <i>C. citratus</i> na taxa de eclosão no zebrafish.....	47
6 DISCUSSÃO	48
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

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. Algumas substâncias presentes nos OE possuem alto valor comercial, podendo ser isoladas do óleo ou mesmo sintetizadas em laboratório, a *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf – Poaceae 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; 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 *C. citratus* é necessário pesquisas para analisar a segurança desta espécie (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; MILAM; ROE, 2001; DOOLEY; ZON, 2000; LEVIN; CHEN, 2004; RICO, 2007; SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999; ZANG; MADDISON; CHEN, 2018). Além disso, diversos compostos e medicamentos que são oriundos de plantas medicinais e que são utilizados pelos seres humanos, foram testados no zebrafish, devido a possíveis efeitos tóxicos ou teratogênico (DOS SANTOS, 2016).

Esses fatores permitiram com que o zebrafish torna-se um modelo excelente para pesquisas in vivo (CRAWFORD; ESGUERRA; WITTE; 2008). Desse modo, possibilita

novos estudos para descobertas de novas propriedades, moléculas e pesquisas que possam desvendar os efeitos e benefícios do óleo essencial da *C. citratus* em humano.

Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial tóxico do OE da *C. citratus* no desenvolvimento embrionário de zebrafish.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho foi executado com o objetivo de realizar a extração de óleo essencial da espécie *Cymbopogon citratus* e avaliar os efeitos do mesmo sobre os embriões e larvas de zebrafish.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a toxicidade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em embriões de zebrafish até 120 horas pós fertilização.
- Avaliar as alterações morfológicas em embriões e larvas da espécie *Danio rerio* submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.
- Verificar a taxa de sobrevivência e eclosão de embriões e larvas da espécie *Danio rerio* submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

3 ÓLEOS ESSENCIAIS

3.1 História e Importância econômica

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. O conhecimento sobre como os primeiros óleos foram preparados e para quais objetivos, são escassos e extremamente vagos (GUENTHER; ALTHAUSEN, 1948). Entretanto, especula-se que esses produtos eram preparados usando flores, raízes e folhas que continham óleos gordurosos. Somente depois de algum tempo os árabes desenvolveram a técnica de destilação de OE 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 óleos essenciais. O aprimoramento do

conhecimento de óleos essenciais 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 (GUENTHER; ALTHAUSEN, 1948)

Os OE são o 446º produto mais negociado do mundo e o 1018º produto mais complexo, pois apresenta centenas de compostos químicos, de acordo com o Índice de Complexidade do Produto (PCI). 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 bilhões), França (US\$ 444 milhões), Alemanha (US \$ 353 milhões), Reino Unido (US \$ 341 milhões) e Índia (US \$ 258 milhões) (SIMÕES; LANDRY; HIDALGO, 2010).

Na última década, o Brasil é um dos destaques na produção de OE ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os grandes produtores mundiais (MIRANDA, 2010). A industrialização dos OE no Brasil teve início a partir do século XX, baseado no extrativismo de essências nativas, principalmente do Pau-Rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke – Lauraceae). Após a crise na produção de OE nos países ocidentais a partir de 1940, em virtude da II Guerra Mundial, a produção OE no Brasil passou a ser feita de forma mais organizada, com a introdução de outras culturas para obtenção de óleos de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck- Rutaceae), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill- Myrtaceae), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf – Poaceae), e outros, voltada, basicamente, para o mercado externo (HOMMA, 2003). 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).

3.2 Definição e Características

Os OE são misturas complexas voláteis, naturais, geralmente odoríferas e líquidas. São substâncias solúveis em solventes apolares e possuem solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar soluções aquosas, evaporam rapidamente a temperatura ambiente, por isso, são chamados de essências, óleos voláteis ou etéreos. Os OE são metabólitos secundários produzidos por plantas aromáticas que ficam armazenados em estruturas especializadas, como tricomas, pêlos 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, madeira, frutas e raízes (PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006). A finalidade do OE é a proteção das plantas contra bactérias, vírus, fungos, inseticidas e herbívoros, reduzindo sua atração por elas. Além disso, os OE podem repelir ou atrair 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).

Os trabalhos com OE demonstraram características terapêuticas interessantes como ação antibacteriana promovida pelo *C. citratus*, alecrim (*Rosmarinus officinalis* L. – Lamiaceae), orégano (*Origanum vulgare* L. – Lamiaceae), dente de alho (*Allium sativum* L. – Amaryllidaceae), açafrão (*Curcuma longa* L. – Zingiberaceae), e tomilho (*Thymus vulgaris* L. – Lamiaceae) (BASSOLE et al., 2003; BURT; REINDERS, 2003; FARAG et al., 1989; NEGI et al., 1999; SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998). O óleo de canela (*Cinnamomum verum* J. Presl – Lauraceae) possui ação antifúngica e antidiabéticos (BABU; PRABUSEENIVASAN; IGNACIMUTHU, 2007; MOREIRA et al., 2007), o de absinto (*Artemisia absinthium* L. - Asteraceae) possui fortes características antioxidante (KORDALI et al., 2005), e o óleo da *Croton flavens* L. (Euphorbiaceae) e conhecida popularmente como ti baume, copahu e croton amarelo, demonstrou ser eficiente no tratamento de duas linhas de células tumorais: linhas celulares A-549 (carcinoma do pulmão humano) e DLD-1 (adenocarcinoma do cólon humano) (SYLVESTRE et al., 2006).

Estudos demonstraram também que o OE de manjeriço-santo (*Ocimum tenuiflorum* Burm. F- Lamiaceae) possui atividade anti-inflamatória (SINGH; MAJUMDAR, 1999), o de *C. citratus* e gerânio (*Pelargonium graveolens*- Geraniaceae) pode melhorar o sistema imune e modular a microbiota intestinal e além disso possui ação vermífuga (AL-

SAGHEER et al., 2018; KPOVIESSI et al., 2014) e o óleo de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill. – Myrtaceae) possui efeito analgésico (SILVA et al., 2003).

3.3 Métodos de obtenção

Diversos 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.

Diante do exposto, foi visto que há diferentes maneiras de extração do óleo da *C. citratus*, planta escolhida para o atual estudo. É recomendado pela ASTA (1968, p.8- 11) uma amostra de 75g (massa seca) ou 200g (massa fresca) para a quantificação do rendimento do óleo.

Foi observado na literatura duas formas de extração da *C. citratus*, um método usando o microondas sem solvente e outra através da hidrodestilação no aparelho Clevenger (AJAIY; SADIMENKO; AFOLAYAN; 2016; LUCCHESI; CHEMAT; SMADJA; 2004).

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, geranilbutanoato e fitol (AJAIY; SADIMENKO; AFOLAYAN; 2016; LUCCHESI; CHEMAT; SMADJA; 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 -mirceno (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 trans-isômero neral, estavam presentes no óleo cerca de 73,3%. Encontrou-se neste óleo 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 apresentado o mesmo rendimento para o alecrim-pimenta e da *C. citratus* (MAGALHAES et al., 2013).

No Laboratório de Operações Unitárias (LOPE), situado na Faculdade de Engenharia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, os OE da citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor - Poaceae), que é do mesmo gênero da *C. citratus* e do alecrim, 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 minoritário, acetato de geraniol (2,75%), β- elemeno (1,16%), α-amorfeno + germacreno D (2,67%), δ-cadineno (1,90%) e elemol (1,18%). Os compostos majoritários do óleo de alecrim foram 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).

4 *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf - Poaceae

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 Cantabrigiensis), ganhando a expressão “*lemongrass*”, que significava popularmente capim-limão (STAPF, 1906). Foi inicialmente descrita como *Andropogon citratus* por De Candolle e re-classificada por Otto Stapf em 1906. Apresenta diversos sinônimos,

Andropogon ceriferus Hack, *Andropogon citratus* DC., *Andropogon citratus* DC. ex Nees, *Andropogon citriodorum* Hort. ex Desf., *Andropogon nardus* subesp. *ceriferus* (Hack) Hack, *Andropogon roxburghii* Nees ex Steud, *Andropogon schoenanthus* L. e *Cymbopogon 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 geralmente conhecida popularmente como capim-limão, erva-cidreira, capim-santo, capim-catinga, capim-de-cheiro, capim-cidrão, capim-cidrilho, capim-cidró e capim-ciri (GOMES; NEGRELLE, 2003; MARTINAZZO et al., 2007; SANTOS et al., 2009).

A *C. citratus* (FIGURA 1) 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 caniculada. O florescimento é raro e as flores são estéreis (GOMES; NEGRELLE, 2003).

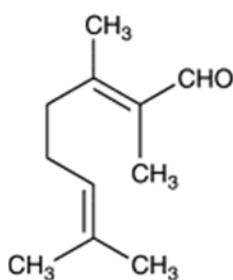
Figura 1- *Cymbopogon citratus*



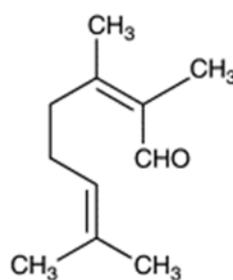
Fonte: Arquivo pessoal

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 2), 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 2- Estruturas moleculares dos estereoisômeros do citral (geranial e neral).



Geranial (trans)



Neral (cis)

4.2 Aspectos etnobotânicos

C. citratus é cultivada em países tropicais principalmente na América do Sul, África, Índia, Austrália e nos Estados Unidos. No Brasil, as regiões sul e sudeste se destacam. No Estado do Paraná, maior produtor de plantas medicinais aromáticas do país, a produção de *C. citratus* ocupa posição de destaque e é um dos produtos mais valorizados do estado. O valor bruto médio da produção agrícola de 2008 a 2012 foi de R\$ 717.647,00 \pm 274.560,00 (GOMES; NEGRELLE, 2015). A *C. citratus* começou a ser utilizado desde

o período pré-védicos 400 a.C- 1500 a.C., na medicina Ayurved, mais antiga da China (WILSON, 2018).

Essa espécie é cultivada fortemente para produção comercial de OE , sendo que, é utilizado principalmente em perfumaria e cosmética, na preparação de colônias, sabonetes e desodorantes. Porém, seu emprego na indústria farmacêutica vem aumentando, visto que, o citral é mais abundante na matéria-prima e relativamente barata, para obtenção de outros produtos com maior valor comercial, como por exemplo, a β -ionona, que é utilizada como intermediário na síntese da vitamina A (CRAVEIRO; DE QUEIROZ, 1993; IAC, 2007; LORENZI; MATTOS, 2002; NASCIMENTO et al., 2003; PRINS et al., 2008; SERRA; FUGANTI; BRENNAN, 2005).

A *C. citratus* é utilizada como, antinociceptivo, ou seja, anula ou reduz a percepção e transmissão de estímulos que causam dor (VIANA et al., 2000), possui potencial anti-inflamatório (SANTIN et al., 2009), antifúngico (BOUKHATEM et al., 2014), anti-helmíntico (ALMEIDA et al., 2003), inseticidas (RAJAPAKSE; VANEMDEN, 1997), anti-carcinogênico (PUATANACHOKCHAI et al., 2002). Apresenta ações também reconhecidas do óleo em indústrias farmacêuticas como anti-hipertensivo, antiasmático, antisséptico, para evitar mau hálito e placas bacterianas, antitérmico, antirreumático e miorrelaxante (SILVA, 2009; WILSON, 2018).

Na indústria alimentícia utilizam a *C. citratus* conservação dos alimentos comercializados frescos. Um estudo realizado Ahmad et al. (2012) demonstra que embalagens ativas à base de gelatina incorporado com o óleo de *C. citratus* podem ser utilizadas, pois mantêm as propriedades e prolonga a vida útil das fatias de robalo, já que retarda o crescimento microbiano e a oxidação lipídica. O óleo de *C. citratus* também vem sendo utilizado como biocida natural contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* que promovem a mastite bovina, melhorando a qualidade do leite (AIEMSAARD et al., 2011). Possui potencial para ser utilizado em produtos vegetais orgânicos frescos como um descontaminante alternativo no tratamento antimicrobiano contra *Salmonella newport* (MOORE-NEIBEL et al., 2012). Estudos comprovaram que o óleo também inibe o crescimento de patógenos como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* em suco de morango e em produtos de carne picada (DUAN; ZHAO, 2009; BARBOSA et al., 2009).

Na indústria cosmética o OE *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W. Watson que é do mesmo gênero da *C. citratus*, é utilizado como tônico capilar anti-caspa (CHAISSRIPIPAT; LOURITH; KANLAYAVATTANAKUL, 2015). Além disso, o OE

da *C. citratus* é utilizado em máscaras faciais, porque contém propriedades antioxidantes que neutraliza os radicais livres da pele e assim, aumenta a produção de colágeno (WILSON, 2018).

5.3 Benefícios comprovados em modelo animal

Os medicamentos fitoterápicos existem desde o período pré-histórico e foram utilizados na medicina chinesa, grega, egípcia e indiana para diferentes finalidades terapêuticas. O capim-limão tem sido utilizado na medicina Ayurved, que significa “Mãe de toda cura” e originária da Índia, existente desde o período pré-védicos (4000 a.C.-1500 a.C.) e é um dos sistemas mais tradicionais da china, que utiliza meios naturais como ervas, especiarias, minerais, cheiros, sons, dieta, meditações, ioga e exercícios para eliminar doenças (WILSON, 2018).

Tradicionalmente, a *C. citratus* era utilizado na forma de chás, óleos e também incorporados em cremes de pele. Era usado para o tratamento de cólicas menstruais, febre, redução de ansiedade, espasmos musculares, alívio de dores e tensões dos músculos e como sedativo (PARASURAMAN; THING; DHANARAJ, 2014; WILSON, 2018).

No momento atual, o chá das folhas da espécie é utilizada popularmente como ansiolítico, antipirético, para tosse, dor de cabeça e abdominais, reumáticas e alterações digestivas como dispepsia e flatulência (COSTA et al., 2005). O óleo é utilizado em problemas gastrointestinais (SAGRADAS et al., 2015), possui efeitos antioxidantes e antitumorais (THANGAM; SURESH; KANNAN, 2014), é usado como alternativas ou adjuvantes de terapias antiparasitárias, anti-inflamatória, antiespasmódico, analgésico, diurético, sedativo e imunológicos (SANTIN et al., 2009).

Houve um crescimento dos estudos sobre plantas medicinais ao longo dos últimos 22 anos, principalmente na Índia e no Brasil. A espécie mais estudada por pesquisadores brasileiros foi a *C. citratus*. Destacaram-se os estudos sobre atividade antiparasitária, antioxidante e anti-inflamatória (ZAGO; MOURA 2018).

O OE da *C. citratus* demonstrou ter atividade antifúngica em trabalho utilizando modelo de camundongo. A propriedade antifúngica pode ser responsabilidade dos compostos geranial e neral, pois possuem um amplo espectro de propriedade contra bactérias e fungos gram-positivo e gram-negativa. E foram encontrados em quantidade

considerável no óleo que foi extraído no processo de arraste a vapor (BOUKHATEM et al., 2014).

Para estudos anticonvulsivos em camundongos utilizaram dois tipos de plantas diferentes *C. citratus* e *C. winterianus*. Os resultados sugeriram que os OE possuem potencial de modificar o caminho dos episódios convulsivos, interferindo nas crises e/ou impedindo o desenvolvimento das crises (SILVA et al., 2010).

Trabalho com antioxidante, utilizou camundongos com lesão hepática aguda incentivado por acetaminofeno (APAP) e fizeram um pré-tratamento com o óleo e observou-se que diminuiu os níveis de alanina aminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP). A atividade da mieloperoxidase (MPO), produção de óxido nítrico (NO) nos fígados diminuíram. O óleo inibiu o deslocamento dos neutrófilos e demonstrou atividade antioxidante (UCHIDA et al., 2017).

No trabalho de atividade gástrica, avaliou-se o efeito gastroprotetor e cicatrizante gástrico do óleo essencial nas úlceras induzidas por etanol e úlcera crônica induzida por ácido acético em camundongo e coelho. O óleo aumentou o processo de cicatrização gástrica (VENZON et al., 2018).

Ewenighi et al. (2013) usaram o extrato da *C. citratus* em camundongos diabéticos induzidos por alaxona e foi demonstrado que o mesmo possui efeitos hipoglicêmicos e hipolipidêmicos, visto que, diminuiu os níveis de glicose no sangue, níveis de triglicerídeos (TG), lipoproteína de baixa densidade (LDL), colesterol total (CT) e aumentou o nível de HDL.

No trabalho de suplementação alimentar em tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*), foram utilizados OE da *C. citratus* que continha α -citral (31,80%), β -citral (27,75%), isoneral (5,36%), α -mirceno (4,44%), linalol (3,48%) e epóxi-linalolóxido (3,11%) e o óleo essencial de gerânio que apresentava em sua composição citronelol (32,54%), 3-metilpentano (11,96%) e isomentona (10,64%). Foi observado neste trabalho que os índices de crescimento, atividade da catalase, imunidade, resposta antioxidante e resistência a doenças melhoraram significativamente nos animais que receberam a suplementação com o óleo da *C. citratus* (AL-SAGHEER et al., 2018).

Existem também estudos em peixes sobre atividade anestésica do OE de *C. flexuosus* em alevinos de tambatinga (*Colossoma macropomum* (fêmea) e *Piaractus brachypomus* (macho)) e tetra negro (*Gymnocorymbus ternetzi*) que mostra que o óleo é eficaz como sedativo e anestésico (CALDAS, 2018; SOUZA, 2017).

5. *Danio rerio*

O peixe zebrafish (*Danio rerio*) pertence à família Cyprinidae. É um peixe de água doce de regiões tropicais, que possui estações chuvosas e secas bem estabelecidas, 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 de São Paulo (DAMMSKI; MÜLLER; GAYA, 2011; MCGONNELL; FOWKES, 2006). Vive em regiões alagadiças, encontrado principalmente em águas rasas, paradas ou com pouca movimentação, contendo vegetação aquática e lodo. 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 biotério. 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 3).

Figura 3: Ilustração de (*Danio rerio*) macho (A) e fêmea (B).



Fonte: AVDESH (2012).

Atingem a maturidade sexual de 3 a 6 meses pós fertilização. Na natureza o zebrafish se alimenta de insetos (terrestres e aquáticos) e fitoplâncton. No biotério, são utilizados alimentos vivos como, *Paramecium* spp., náuplios de artêmia (*Artemia salina*) e rotíferas nos estágios iniciais e após a fase larval é ofertado a ração floculada. A temperatura deve ser mantida a 28°C, pois apresentam maior taxa de crescimento e o PH na faixa de 7 e 8, visto que, estimula o desenvolvimento, reprodução e alimentação, além do mais é ideal para o desenvolvimento de bactérias que fazem a filtragem biológica (DAMMSKI; MÜLLER; GAYA, 2011).

George Streisinger na década de 1960 aplicou a análise mutacional para estudar o desenvolvimento embrionário do zebrafish (GRUNWALD; EISEN, 2002) e no final da década de 70, os pesquisadores começaram a usá-lo na neurociência, estudando a resposta detalhada das células de Mauthner, que foram descritas como neurônios de comando (SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999). Na atualidade, o zebrafish é empregado em diversas áreas de pesquisas, desde biologia do desenvolvimento, doenças metabólicas, genética humana, patologia humana, comportamento, toxicologia e neurociências (BROUGHTON; MILAM; ROE, 2001; DOOLEY; ZON, 2000; LEVIN; CHEN, 2004; RICO, 2007; SERRA; MEDALHA; MATTIOLI, 1999; ZANG; MADDISON; CHEN, 2018). A utilização desta espécie na pesquisa apresenta diversas vantagens como facilidade e baixo custo no cultivo de todos os estágios de vida em laboratório; alta performance reprodutiva com desova abundante; os embriões são translúcidos; (o que permite avaliação do desenvolvimento embrionário); tamanho pequeno; (que permite o cultivo em espaços reduzidos), é um vertebrado que possui cerca de 70% do seu genoma identificado permitindo assim estudos filogenéticos, anatomia e fisiologia semelhante aos humanos (BROUGHTON; MILAM; ROE, 2001; RICO, 2007; ZANG; MADDISON; CHEN, 2018).

6.1 *Danio rerio* como modelo para avaliação de produtos naturais

Compostos utilizados pelos seres humanos como flavonoides, alcaloides e alguns medicamentos advindos de plantas medicinais foram testados no modelo zebrafish, principalmente em relação a possíveis efeitos tóxicos ou teratogênicos (SANTOS, 2016).

Estudo da Universidade Federal do Amapá avaliou o extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin* L. (HELSm) no peixe *Danio rerio*. O extrato foi avaliado por administração oral e por imersão. A HELSm apresentou vários derivados de compostos

polifenólicos e flavonoides. Além disso, foi identificado ácido elágico e isoquercitrina. A maioria dos compostos identificados foram ácidos graxos, ésteres e álcoois, pelo cromatográfico gasoso. Os resultados mostraram que a administração aguda do HELSm produziu efeitos ansiolíticos e antidepressivos. Possivelmente, a presença de isoquercitrina nas folhas de *Spondias mombin* participou dos efeitos ansiolíticos e antidepressivos (SAMPAIO et al., 2018).

Foi avaliado o efeito ansiolítico do crisofanol presente no caule e na folha de *Senna cana* (Nees & Mart.) H.S.Irwin & Barn (Fabaceae) em zebrafish adulto, já que, esse composto apresenta atividades analgésica, anti-inflamatória, anticâncer e anticonvulsivante. Os dados permitiram concluir que *Senna cana* que é fonte de crisofanol, não alterou comportamento locomotor e não apresentou toxicidade aguda. Além disso, apresentou potencial ansiolítico (MONTEIRO et al., 2018).

Trabalho utilizando o extrato de *Curcuma longa* avaliou a fitoquímica do mesmo, embriotoxicidade e efeitos teratogênicos no zebrafish. A análise fitoquímica, demonstrou que o extrato é rico em flavonoides com catequina, epicatequina e naringenina. As doses acima de 62,50 µg/mL foram tóxicas para embriões e larvas, provocando mortalidades e efeitos teratogênicos, produzindo deformidades, como cauda torta, tronco dobrado e edema aumentado do saco vitelino. Esses resultados demonstram que, plantas com potencial terapêutica consumidas em doses altas apresentam ameaças, principalmente nos embriões (ALAFIATAYO et al., 2019).

No experimento de Ramos (2019) o objetivo foi testar os compostos bioativos de origem natural, como extratos de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia* DC. – Asteraceae), óleo vegetal de cajú (*Anacardium occidentale* L. – Anacardiaceae) e OE de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry – Myrtaceae) em diferentes níveis sob o desempenho zootécnico, atividade antioxidante na ração e seu efeito de toxicidade em larva de zebrafish com 8 dias pós-fertilização. O alecrim-do-campo apresenta flavonoides, terpenos e ácidos fenólicos em sua composição (SILVA et al., 2004; LOOTS et al., 2006; MENEZES, 2005; VEIGA et al., 2017). O óleo de cajú, contém uma grande quantidade de ácido anacárdico, cardol (13-20%) e cardanol (GEDAM; SAMPATHKUMARAN, 1986). O OE de cravo-da-índia apresenta o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), β-cariofileno em sua composição (CHAIEB et al., 2007; MULLA et al., 2017).

Uma mistura do extrato do alecrim-do-campo, óleo vegetal da castanha do cajú e OE da folha do cravo-da-índia podem ser utilizados na dieta de peixes, tendo o zebrafish

como modelo experimental, para melhor o desempenho de outros animais. Os produtos naturais nas dietas bloquearam a oxidação lipídica, visto que foi utilizando os métodos 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS) que sequestram os radicais livres. Estes compostos naturais podem ser usados em substituição às moléculas e compostos sintéticos que estão sendo proibidos no sistema de produção animal, devido à preocupação com sustentabilidade do sistema de produção, à saúde dos animais e dos seres humanos (RAMOS,2019).

Pesquisadores da Universidade Federal do Maranhão verificaram o perfil químico do geoprópolis da abelha *Melipona fasciculata* e analisaram a toxicidade desse extrato utilizando o zebrafish como modelo experimental. O geoprópolis apresenta em sua composição saponinas, terpenos e esteroides e demonstrou ter uma baixa toxicidade. Esses resultados mostraram que esse produto natural é favorável na busca de moléculas bioativas com potencial terapêutico e uma futura exploração biotecnológica (BARBOZA et al., 2019).

Um outro estudo investigou o potencial toxicológico e ecotoxicológico do corante natural eritrostominona (Ery), uma naftoquinona extraída de micro-organismo e Basic Red 51 (BR51) utilizando o *Danio rerio* em estágios iniciais como modelo experimental. Os resultados desse estudo demonstraram que esses corantes são tóxicos. Os embriões e larvas de zebrafish apresentaram alterações no desenvolvimento embrionário, no comportamento, induziu efeitos pró-oxidantes e alteração no balanço energético (ABE, 2017).

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, pois apresenta propriedades antioxidantes e na indústria alimentícia na conservação dos alimentos comercializados frescos.

Entretanto novos estudos se mostram necessário 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 BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F. R. Avaliação ecogenotoxicológica de corante natural extraído de micro-organismo. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

AHMAD, M. et al. Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 171-178, 2012.

AIEMSAARD, J. et al. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. **Research in veterinary science**, v.91, n.3, p. 31-37, 2011.

AJAYI, E. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. GC-MS evaluation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation 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.

ALMEIDA, M. et al. 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**, v. 12, n. 3, p. 125-129, 2003.

AL-SAGHEER, 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.

ASTA, et al. Official analytical methods of the American Spice Trade Association. **Englewood Cliffs: ASTA**, p.8-11,1968.

AVDESH, A. et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction. **Journal of Visualized Experiments**, v. 69, p. 1-8, 2012.

BABU, P. S.; PRABUSEENIVASAN, S.; IGNACIMUTHU, S. Cinnamaldehyde a potential antidiabetic agent. **Phytomedicine**, v. 14, n. 1, p. 15-22, 2007.

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

BARBOZA, J. R. et al. Abordagem química e toxicidade em modelo zebrafish de geoprópolis de melipona fasciculata Smith/Chemical approach and toxicity in zebrafish model of geipropolis of melipona fasciculata Smith. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 6, p. 5582-5594, 2019.

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.

BASSOLE, I. H. N. et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 209-212, 2003.

BOUKHATEM, M. N. et al. Lemon grass (*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.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas selecionados contra *Escherichia coli* O157: H7. **Cartas em microbiologia aplicada**, v. 36, n. 3, p. 162-167, 2003.

CALDAS, D. W. 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.

CHAIKRIPAT, W.; LOURITH, N; KANLAYAVATTANAKUL, M. Tônico capilar anti-caspa contendo óleo de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*). **Pesquisa em Medicina Complementar**, v. 22, n. 4, p. 226-229, 2015.

CHAIKIEB K. et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, 16 419 *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy**, p.501-506, 2007.

CARNEIRO, D. M. Ayurveda – Saúde e Longevidade. Goiânia. Editora UFG, 2007.

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

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. de. Química Nova, 1993, 16(3), 224- 228.

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.

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

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.

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.

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.

FARAG, R. et al. Atividade antimicrobiana de alguns óleos essenciais de especiarias egípcias. **Revista de proteção de alimentos**, v. 52, n. 9, p. 665-667, 1989.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, n. 8, p. 1056-1071, 2005.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **The Plant Cell**, v. 17, n. 7, p. 1866-1875, 2005.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 4, p. 861-905, 2009.

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.

GEDAM P.H.; Sampathkumaran P.S. Cashew nut shell liquid: Extraction, chemistry and applications. **Progress in Organic Coatings**, p. 115-157, 1968.

GOMES, E. C.; NEGRELLE, R. R. B. Análise da cadeia produtiva do capim limão: estudo de caso. **Rev. bras. plantas med**, p. 201-209, 2015.

GÓMEZ, M. E. D. B. Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. 149 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, 2003.

GRUNWALD, D. J; EISEN J. S. Head waters of the zebrafish emergence of a new model vertebrate. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.717-24, 2002.

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

HOMMA, A. K. O. O extrativismo do óleo essencial de pau-rosa na Amazônia. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2003.

IAC. Disponível em: http://www.iac.sp.gov.br/Tecnologias/capim_limao.htm. Acesso em 15 de Abril de 2020.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.

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

KORDALI, S. et al. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9452-9458, 2005.

KPOVIESSI, S. et al. Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon species* from Benin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 652-659, 2014.

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.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

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.

LOOTS, D. T. et al. Polyphenol composition and antioxidant activity of Kei-apple (*Dovyalis caffra*) juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, p. 1271-1276, 2006.

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.

MACHADO, B. F. M. T.; JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MAGALHÃES, H. M. et al. Ação alelopática de óleos essenciais de alecrim-pimenta e capim-santo na germinação de aquênios de alfaca. **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 Medicinais**, v.9, n.1, p.68-72, 2007.

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

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.

MENEZES, H. Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Baccharis 522 dracunculifolia* (Asteraceae). **Arquivos do Instituto Biológico**, p. 33-33, 2005.

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

MONTEIRO J. et al. Efeito ansiolítico-símile do crisofanol isolado de *Senna cana* I&B em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. **XXV Simpósio de plantas medicinais do Brasil**, p.189,2018.

MOREIRA, A. C. P. et al. Inhibitory effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae) essential oil and beta-pinene on the growth of dematiaceous moulds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 33-38, 2007.

MOORE-NEIBEL, K. et al. Atividade antimicrobiana do óleo de capim-limão contra *Salmonella enterica* em folhas verdes orgânicas. **Jornal de microbiologia aplicada**, p.485-492, 2012.

MULLA M. et al. Antimicrobial efficacy of clove essential oil infused into chemically modified LLDPE film 528 for chicken meat packaging. **Food Control**, p. 663-671, 2017.

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.

NEGI, P. S. et al. Atividade antibacteriana do óleo de açafrão: um subproduto da fabricação da curcumina. **Revista de química agrícola e de alimentos**, v. 47, n. 10, p. 4297-4300, 1999.

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

PARASURAMAN, S.; THING, G. S.; DHANARAJ, S. A. Polyherbal formulation: Concept of ayurveda. **Pharmacognosy reviews**, v. 8, n. 16, p. 73, 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.

PUATANACHOKCHAI, R. et al. Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. **Cancer letters**, v. 183, n. 1, p. 9-15, 2002.

RAJAPAKSE, R.; VAN EMDEN, H. F. Potential of four vegetable oils and ten botanical powders for reducing infestation of cowpeas by *Callosobruchus maculatus*, *C. chinensis* and *C. rhodesianus*. **Journal of Stored Products Research**, v. 33, n. 1, p. 59-68, 1997.

RAMOS, T. R. 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. 76 p. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2019.

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.

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

SAGRADAS, J. et al. Gastroprotective effect of *Cymbopogon citratus* infusion on acute ethanol-induced gastric lesions in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 173, p. 134-138, 2015.

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 (citrone) 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. 436-441, 2009.

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 (*Lemon grass*). **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 2, n. 1, p. 3, 2011.

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, F. A. A. et al. In-vitro trypanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds 574 from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p. 1195-1911, 2004.

SILVA, J. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 277-283, 2003.

SILVA, M. R. Estudo comparativo dos efeitos dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon winterianus* (POACEAE) no sistema nervoso central de camundongos. 126 p. Tese (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, 2009.

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.

SINGH, S.; MAJUMDAR, D. K. Effect of *Ocimum sanctum* fixed oil on vascular permeability and leucocytes migration. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, n. 11, p. 1136–1138, nov. 1999.

SIMÕES, A.; LANDRY, D.; HIDALGO, C., Observatory of Economic Complexity, 2010. Disponível em: <https://econfix.wordpress.com/>. Acesso em 13 de Maio de 2020.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, Lorna. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in applied microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

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, 2010.

SOUZA, J. F. V. de. Atividade anestésica do óleo essencial *Cymbopogon flexuosus* em alevinos de tambatinga, Monografia – Universidade Federal do Mato Grosso, 2017.

SYLVESTRE, M. et al. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of ethnopharmacology**, v. 103, n. 1, p. 99-102, 2006.

THANGAM, R.; SURESH, V.; KANNAN, S. Optimized extraction of polysaccharides from *Cymbopogon citratus* and its biological activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 65, p. 415-423, 2014.

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.

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.

VEIGA R.S. et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia*. **Journal of applied microbiology**, p.911-920, 2017.

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.

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.

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.

ZAGO, L. M. S. de; MOURA, M. E. P. de. Vinte e dois anos de pesquisa sobre plantas medicinais: uma análise cienciométrica. **Tecnia**, v. 3, n. 1, p. 157-173, 2018.

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 – ARTIGO**Efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em embriões e larvas de *Danio rerio***

Kiara Cândido Duarte da Silva¹, Bárbara do Carmo Rodrigues Virote², Maria de Fátima Santos³, Luis David Solis Murgas^{1 2}

¹Graduação, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia;

²Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária;

³Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Agronomia;

^{1 2} Orientador, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária

RESUMO

A ampla utilização popular da *C. citratus* tornou-se necessário pesquisas para analisar a segurança do uso terapêutico, comprovar seus benefícios e efeitos utilizando um modelo animal. Objetivou-se avaliar a toxicidade do OE da *C. citratus* sobre os embriões e larvas do *Danio rerio*. A extração do OE foi realizada pela técnica arraste por vapor de água por 3 horas. Os zebrafish adultos reprodutores foram mantidos em uma raque específica para a espécie (Rack Hidrus, modelo ZEB-40). Foram testadas 8 concentrações do OE da *C. citratus* (50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,79; 0,39 µg/mL) diluídas em 0,5% de DMSO na solução *Egg Water* e dois controles, um tratamento apenas com a solução *Egg Water* e outro com a solução *Egg Water* e diluída a 0,5% de DMSO. Para a observação das taxas de sobrevivência, eclosão e possíveis alterações morfológicas, os embriões foram avaliados utilizando-se microscópico (Olympus, modelo CX31) diariamente nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 hpf em exposição. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, atendido ao pressuposto foi realizada análise de variância (ANOVA) pelo programa Minitab® versão 1.8 (Minitab LLC, Stage College, PA). Os resultados demonstraram que as três maiores concentrações testadas, são consideradas altamente tóxicos. A concentração de 6,25 µg/mL provocou efeitos teratogênicos nos animais e as menores concentrações não são consideradas tóxicas e nem teratogênicas para os embriões de zebrafish. Portanto, o OE da *C. citratus* possui efeitos tóxicos e teratogênicos, especialmente em maiores concentrações, ao contrário das menores concentrações.

Palavras-chave: Capim-limão. Zebrafish. Toxicidade. Teratogenicidade. Extração.

ABSTRACT

The widespread popular use of *C. citratus* has become necessary research to analyze the safety of therapeutic use, to prove its benefits and effects using an animal model. The objective of this study was to evaluate the toxicity of OE of *C. citratus* on embryos and larvae of *Danio rerio*. The extraction of the OE was carried out by the technique of steam dragging for 3 hours. The breeding adult zebrafish were kept in a specie-specific rack (Rack Hidrus, model ZEB-40). Eight concentrations of *C. citratus* OE (50; 25; 12.5; 6.25; 3.12; 1.56; 0.79; 0.39 $\mu\text{g} / \text{mL}$) diluted in 0.5% DMSO were tested. in the *Egg Water* solution and two controls, one treatment only with the *Egg Water* solution and the other with the *Egg Water* solution and diluted to 0.5% DMSO. To observe survival rates, hatching and possible morphological changes, the embryos were evaluated using microscopic (Olympus, model CX31) daily in the intervals of 24, 48, 72, 96 and 120 hpf on display. The data were submitted to the Shapiro Wilk normality test, given the assumption, analysis of variance (ANOVA) was performed using the Minitab® version 1.8 program (Minitab LLC, Stage College, PA). The results showed that the three highest concentrations tested are considered highly toxic. The concentration of 6.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ caused teratogenic effects in the animals and the lowest concentrations are neither considered toxic nor teratogenic for the zebrafish embryos. Therefore, *C. citratus* OE has toxic and teratogenic effects, especially in higher concentrations, as opposed to lower concentrations.

Keywords: Lemongrass. *Danio rerio*. Toxicity. Teratogenicity. Extraction

1. INTRODUÇÃO

C. citratus, conhecida como capim-limão é utilizado na medicina popular mundialmente na forma de chás e OE. É uma planta utilizada popularmente no tratamento de cólicas menstruais, febre, redução de ansiedade, espasmos musculares, alívio de dores e tensões dos músculos e como sedativo (PARASURAMAN; THING; DHANARAJ, 2014; WILSON, 2018). Sua utilização na indústria vem se expandindo visto que, estudos científicos demonstram que a espécie possui potencial anti-inflamatório (SANTIN et al., 2009), antifúngico (BOUKHATEM et al., 2014), anti-parasitário (GOMES, 2017) e anti-carcinogênico (EKPENYONG; AKPAN; NYOH, 2015). Além disso, OE da *C. citratus* possui benefícios reconhecidos em indústrias farmacêuticas como anti-hipertensivo, antiasmático, antisséptico, antitérmico, antirreumático e miorelaxante (SILVA, 2009; WILSON, 2018).

Devido à grande utilização popular da *C. citratus* tornou-se necessário pesquisas para analisar a segurança do uso terapêutico da planta (COSTA et al., 2005), o que ainda está escasso na literatura, e comprovar seus benefícios e efeitos utilizando um modelo animal.

A partir disso, o zebrafish (*Danio rerio*) demonstra ser um excelente modelo para essa área de pesquisa. Por ser um organismo modelo empregue em diferentes áreas de estudos, desde biologia do desenvolvimento, doenças metabólicas, genética humana, patologia humana, comportamento, toxicologia e neurociência (BROUGHTON; MILAM; ROE, 2001; DOOLEY; ZON, 2000; LEVIN; CHEN, 2004; RICO, 2007; SERRA; MEDALHA; MARTTIOLI, 1999; ZANG; MADDISON; CHEN, 2018). Além disso, compostos utilizados pelos seres humanos como flavonoides, alcaloides e alguns medicamentos provenientes de plantas medicinais foram testados primeiramente no modelo zebrafish, principalmente em relação a possíveis efeitos tóxicos ou teratogênicos (SANTOS, 2016) e testes de embriotoxicidade que são realizados com os embriões de zebrafish, são de suma importância, para que a eficácia e a segurança dos produtos medicinais sejam garantidas e comprovadas (BRIGANTE, 2019; CHAVES, 2019; SILVA, 2016).

Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a toxicidade do OE da *C. citratus* sobre os embriões do zebrafish.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos

O experimento foi realizado na Ala de Peixes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. O projeto foi aprovado e protocolado com antecedência pela Comissão de Ética no Uso de Animais, protocolo nº 023/19 e toda manipulação dos peixes foram realizadas de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Fitoquímica, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, de acordo com a proposta de Magalhães et al. (2013).

2.2 Obtenção do material vegetal

A *C. citratus* foi coletada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais (21° 13' 48.8'' S; 44° 58' 28.5'' W). Coletada no dia 15 de janeiro de 2020, as oito horas da manhã horário de Brasília (GUIMARÃES et al., 2008; LAKUŠIĆ et al., 2013;) Foi coletado a parte aérea das plantas, cortadas em tamanhos menores e posteriormente pesadas em balança analítica (M214AI-BIVOLT), para a realização da obtenção do óleo essencial vegetal.

2.3 Extração do óleo essencial

Utilizou-se 996,14 g de folhas frescas e 8 litros de água destilada, a amostra foi submetida a técnica arraste por vapor de água por 3 horas. Após a extração o OE foi purificado por decantação e armazenado no freezer (-4°C) por 24 horas. Para melhor purificação do óleo, o mesmo foi colocado em um eppendorf e levado a centrífuga (ISBOR, 1580R) por 5 minutos à 13.000 rpm (rotação por minuto). Posteriormente, o OE foi pesado na balança analítica e o rendimento de extração do óleo foi expresso em mg/g massa seca da planta (CARVALHO et al., 2020). O material foi mantido em temperatura ambiente e protegido da luz até a realização dos ensaios biológicos.

2.4 Preparação e diluição das concentrações teste

O OE da *C. citratus* foi diluído em um meio específico para o desenvolvimento embrionário e larval do zebrafish chamado *Egg Water*, que contém água destilada com

sais que beneficiam o seu bom desenvolvimento. O meio *Egg Water* é composto por 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄, e 0,1% de azul de metileno (ASAD; SACHIDANANDAN, 2020)

Foram utilizadas oito concentrações que seguiram as diretrizes da OECD N° 236: *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET) Test, espaçadas por um fator constante para atender aos requisitos estatísticos. As concentrações do OE da *C. citratus* analisadas foram de 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,79; 0,39 µg/mL em solução de 0,5% de DMSO. As concentrações foram escolhidas de acordo com a proposta de He et al. (2018) e Kim, Sharma e Kang (2017).

2.5 Manutenção dos animais

Todos os zebrafish adultos foram mantidos em uma raque específica para a espécie (Rack Hidrus, modelo ZEB-40), em aquários de policarbonato, com tamanho de 11,5 cm x 34,5 cm x 15,5 cm, em um sistema de recirculação, o qual possuía quarenta aquários de 2,5L cada, sendo mantidos dez animais por aquário, que possuíam uma divisória de acrílico perfurada, separando machos e fêmeas no mesmo aquário.

Durante o período experimental os animais foram mantidos em fotoperíodo com 14:10 (luz:escuro), temperatura de 28°C e alimentados 2 vezes ao dia com ração floculada e 1 vez ao dia com náuplios de artêmia (*Artemia salina*) (SCOPEL et al., 2019).

A limpeza dos aquários e manutenção da qualidade de água foi realizada pelo próprio sistema automatizado da raque.

2.6 Protocolo de reprodução para obtenção de embriões

As divisórias dos aquários eram removidas pela manhã, meia hora antes do término do período escuro e os animais eram retirados dos aquários específicos da raque e eram condicionados em criadeiras de acrílico. Nessas criadeiras os animais reprodutores tinham contato direto para ocorrer a fecundação dos gametas (SPENCE et al., 2008). As criadeiras possuíam uma placa perfurada, permitindo com que os ovos caíssem na parte inferior do aquário e assim ficassem protegidos do canibalismo (WESTERFIELD, 2007). Após um período de duas horas de acasalamento dos animais, os ovos eram coletados utilizando uma pipeta de Pasteur e colocados em uma placa de petri com o meio *Egg Water*. Esse meio consiste em padronizar o desenvolvimento embrionário do zebrafish, além de evitar contaminações por fungos (ASAD; SACHIDANANDAN, 2020).

2.7 Teste de toxicidade aguda em embriões de *Danio rerio*

Os ensaios de toxicidade foram realizados de acordo com as diretrizes da OECD N^o 236: *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test*. Para a realização do teste, os ovos de zebrafish passaram por uma triagem inicial que os classificavam de duas formas: embriões viáveis ou inviáveis.

Eram considerados ovos viáveis todos que se apresentam morfologicamente normais, ou seja, com divisão dos blastômeros e descrito como transparente, perfeitamente esférico, com início claro e simétrico das clivagens, sendo considerado embriões fertilizados (FERNÁNDES-PALACIOS et al., 1995; KJ ØRSVIK; MANGOR-JENSEN; HOLMEFJORD, 1990). E os ovos classificados como inviáveis eram todos que apresentavam coloração opaca e/ ou com célula (s) rompida (s) dentro do córion (AVDESH et al., 2012). Os ovos inviáveis eram descartados e somente os embriões considerados viáveis eram mantidos para a realização do ensaio.

Foram testadas 8 concentrações do óleo essencial do capim-limão, sendo elas 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,79; 0,39 µg/mL diluídas em 0, 5% de DMSO na solução *Egg Water*. Além dessas concentrações foram realizados dois controles, um tratamento apenas com a solução *Egg Water* e outro com a solução com *Egg Water* com a diluição de 0, 5% de DMSO.

Quando os embriões viáveis completavam 5 horas pós fertilização (hpf) eram submetidos aos seus respectivos tratamentos em placas de petri, sendo 40 embriões por placa, e posteriormente eram levados para estufa (Thermo Scientific Forma 311) na temperatura de 28±1°C.

Após 24 hpf, 20 embriões eram transferidos para placas de 96 poços, (1 embrião por poço). Em cada um dos poços foi adicionado 200 µL de cada solução testada. As placas foram cobertas com Parafilm® para evitar o possível efeito de evaporação e contaminação e em seguida incubadas a 28±1°C.

Para a observação das taxas de sobrevivência, eclosão e possíveis alterações morfológicas, os embriões foram avaliados utilizando-se microscópio (Olympus, modelo CX31) diariamente nos intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120 hpf em exposição (OECD, 2013). Foram avaliadas as seguintes características: não fertilização, não desenvolvimento de somitos, desenvolvimento dos olhos, pigmentação da larva, edema durante a formação do coração e do saco vitelínico, não descolamento de cauda, falta de batimento cardíaco, retardo de crescimento, lordose e deformidade de cauda (HALLARE; KOHLER; TRIEBSKORN, 2004). Com base nos parâmetros normais da espécie

(KIMMEL et al., 1995), outras características que não correspondessem ao desenvolvimento da espécie eram consideradas como alterações morfológicas. Os embriões que sobreviverem após o teste de toxicidade foram sacrificados com superdosagem de anestésico benzocaína (250 mg/L).

2.8 Avaliação de dose-resposta

A análise de dose-resposta foi calculada de acordo com procedimentos descritos por Alafiatayo et al. (2019). Utilizou-se o programa Graph Pad Prisma 7.0.1 para a criação de curvas de concentração-resposta para os dados de letalidade. Os dados foram apresentados em forma de curvas sigmoidais. A curva de concentração-resposta foi utilizada na determinação dos valores de LC₅₀ (letalidade). As diferenças foram consideradas significativas usando nível de significância de 5%.

2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk, atendido ao pressuposto foi realizada análise de variância (ANOVA) pelo programa Minitab® versão 1.8 (Minitab LLC, Stage College, PA).

3. RESULTADOS

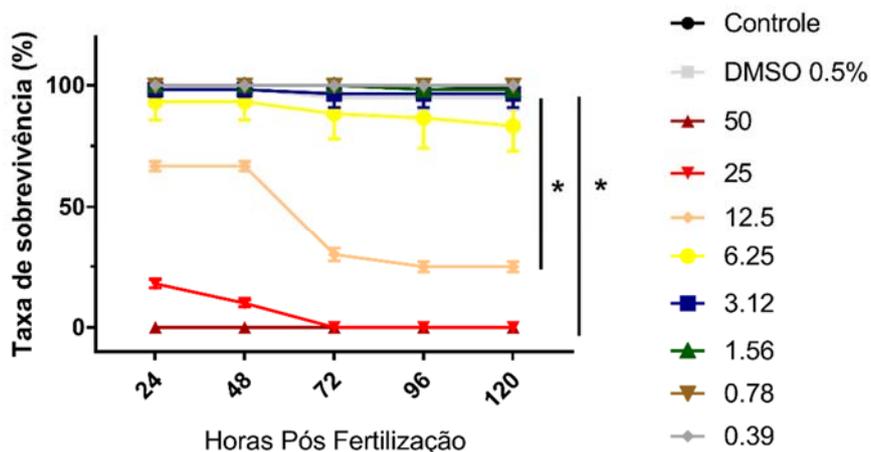
OS EFEITOS DAS CONCENTRAÇÕES DO OE DA *C. citratus* NA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES E LARVAS DO ZEBRAFISH

Os grupos controles, *Egg Water* e *Egg Water* com 0,5% de DMSO, sem exposição ao OE da *C. citratus* demonstraram uma taxa de sobrevivência normal para a espécie, acima de 95% até as 120 horas pós fertilização (hpf). Entretanto, a taxa de sobrevivência foi significativamente diferente ($p < 0.05$) de acordo com a concentração testada do OE da *C. citratus*.

As concentrações de 50 e 25 µg/mL, sendo as maiores concentrações testadas, promoveram taxa de sobrevivência nula as 72 hpf demonstrando ser altamente tóxicas para os embriões de zebrafish. A concentração de 12,5 µg/mL demonstrou causar uma taxa de sobrevivência significativamente ($p < 0.05$) menor que dos grupos controle, chegando a 25% as 120 hpf. As demais concentrações testadas, abaixo de 6,25 µg/mL,

não demonstraram diferença significativa ($p > 0.05$) em relação aos grupos controle (Figura 1).

Figura 1: Taxa de sobrevivência de embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao OE da *C. citratus* em diferentes concentrações.



Legenda: Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. (*) Significa diferenças significativas ($P < 0,05$) em comparação ao grupo controle.

MORTALIDADE AVALIADA COMO MEDIDA DA POTÊNCIA DE TOXICIDADE DA *C. citratus* EM EMBRIÕES E LARVAS DE ZEBRAFISH

Para todas as concentrações de OE da *C. citratus* testadas, o efeito da toxicidade em cada indivíduo foi dependente da concentração. Utilizando a porcentagem de indivíduos mortos para cada concentração, foi produzida uma curva de dose-resposta para cada ponto do tempo (Figura 2). Os dados de LC_{50} (para letalidade) foram obtidos para as curvas de concentração-resposta para todos os tempos avaliados (Tabela 1).

Figura 2: Curvas de dose-resposta para mortalidade de embriões e larvas de zebrafish em diferentes horas de pós fertilização (hpf) em diferentes concentrações de OE da *C. citratus*.

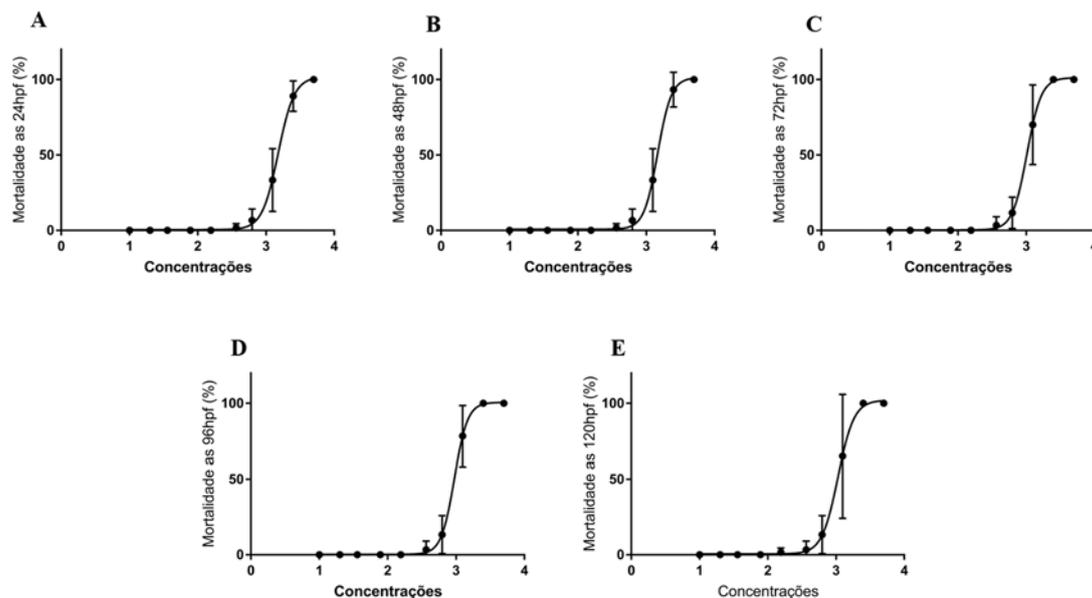


Tabela 1: Valores da LC_{50} como derivados das curvas de dose-resposta para as concentrações do OE da *C. citratus*.

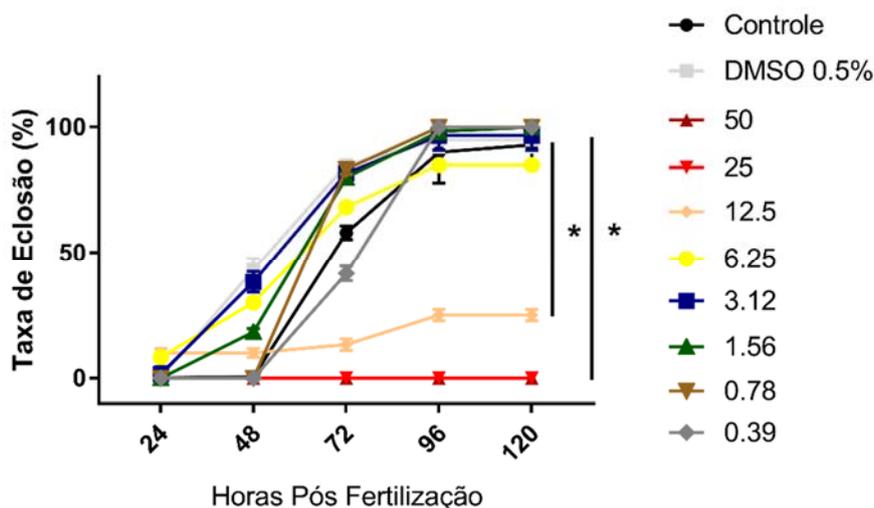
HORAS PÓS FERTILIZAÇÃO (hpf)	LC_{50}
24	1.51
48	1.46
72	1.03
96	1.04
120	1.06

OS EFEITOS DAS CONCENTRAÇÕES DO OE DA *C. CITRATUS* NA TAXA DE ECLOSÃO NO ZEBRAFISH

A taxa de eclosão dos embriões de zebrafish expostos a concentrações variáveis de OE de *C. citratus* demonstrou ser significativamente ($p < 0.05$) menor na concentração de 12,50 $\mu\text{g/mL}$, enquanto nenhuma eclosão foi observada nas maiores concentrações testadas de 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ como um resultado da mortalidade dos embriões. Entre os demais tratamentos não houve diferença estatística ($p > 0.05$) com os grupos controles,

tendo como média uma taxa de eclosão superior a 90% a partir das 96 hpf (Fig. 3), O que segundo a OECD é aceitável para o FET.

Figura 3: Taxa de eclosão de embriões de zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao óleo essencial de “capim-limão” em diferentes concentrações



Legenda: Os valores são apresentados como média \pm desvio padrão. (*) Significa diferenças significativas ($P < 0.05$) em comparação ao grupo controle.

ALTERAÇÕES TERATOGÊNICAS CAUSADAS PELAS CONCENTRAÇÕES DO OE DA *C. citratus* NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DO ZEBRAFISH

Em relação as alterações identificadas no desenvolvimento embrionário foi observada uma grande influência da concentração de 6,25 $\mu\text{g/ml}$ no desenvolvimento embrionário do zebrafish (Tabela 2). Mesmo não gerando letalidade ou atraso na taxa de eclosão embrionária, a concentração de 6,25 $\mu\text{g/ml}$ do OE da *C. citratus* desencadeou no embrião do zebrafish o desenvolvimento de edema, deformidade de cauda e lordose (Figura 4). As demais concentrações promoveram taxas menores que 6% de edema nos embriões, e menor que 10% para deformidade de cauda e 3% para lordose para as larvas demonstrando não terem diferenças significativas ($p > 0.05$) com os grupos controle.

Tabela 2: Taxa de deformidades de embriões e larvas de zebrafish (*Danio rerio*) expostos ao OE de *C. citratus* em diferentes concentrações.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	Edema	Deformidade na cauda	Lordose
Controle	0.0 ± 0.0^A	0.0 ± 0.0^A	0.0 ± 0.0^A
DMSO 0.5%	0.0 ± 0.0^A	0.0 ± 0.0^A	0.0 ± 0.0^A
50	0.0 ± 0.0^A	0.0 ± 0.0^A	0.0 ± 0.0^A
25	1.26 ± 0.3^A	0.0 ± 0.0^A	2.51 ± 0.7^A
12.5	2.34 ± 0.3^A	4.34 ± 2.8^B	2.01 ± 0.4^A
6.25	7.34 ± 0.7^B	24.34 ± 2.2^C	7.34 ± 0.7^B
3.12	0.6 ± 0.1^A	10.67 ± 1.2^B	1.00 ± 0.2^A
1.56	0.3 ± 0.1^A	3.01 ± 0.5^B	0.67 ± 0.1^A
0.78	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

Legenda: Os dados são expressos com as porcentagens das médias \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Figura 4: Características morfológicas encontradas durante o ensaio de embriotoxicidade e teratogenicidade em diferentes concentrações do óleo essencial de capim-limão;



Fonte: Arquivo pessoal

Legenda: A) Larva de zebrafish com 120 hpf, grupo controle apresentando características normais para a espécie;

B) Larvas de zebrafish com 96 hpf, grupo da concentração 6,25 µg/ml I) edema;

C) Larvas de zebrafish com 72 hpf, grupo da concentração 6,25 µg/ml II) lordose;

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi demonstrado que as maiores concentrações testadas 50 e 25 µg/mL causaram 100% de mortalidade nos embriões de zebrafish, sendo considerados altamente tóxicos e além disso, a concentração de 12,5 µg/mL apresentou uma taxa de mortalidade alta em torno de 70% nos embriões em 72 hpf. Embora a concentração de 6,25 µg/mL não tenha causado mortalidade para os embriões, foi verificado que essa concentração pode provocar efeitos teratogênicos nos animais como edema, deformidade de cauda e lordose. As menores concentrações 3,12; 1,56; 0,79 e 0,39 µg/mL não foram consideradas tóxicas e nem teratogênicas para os embriões de zebrafish.

A análise da toxicidade de plantas medicinais no desenvolvimento embrionário é de suma importância, porque muitos produtos derivados destas plantas ganham espaços no mercado da indústria farmacêutica sem informações sobre toxicologia e os possíveis efeitos na saúde (ALAFIATAYO et al., 2019).

Estudos encontrados na literatura que submeteram os embriões de zebrafish a outros tipos de OE, também relataram que as maiores concentrações causam letalidade nos embriões da espécie alvo. No trabalho de He et al. (2018) com o OE de *Leonurus japonicus* Houtt. (erva-mãe) foi observado que o óleo é altamente tóxico nas maiores concentrações e afeta negativamente o desenvolvimento dos embriões. Em outra pesquisa utilizando embriões de zebrafish, expuseram os animais ao óleo de *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague (Ajowan) onde verificaram que e as maiores concentrações induziram a letalidade grave a 96 hpf e apresentaram uma redução significativa na taxa de eclosão (KIM; SHARMI; KANG, 2017).

No experimento de Elsayed et al. (2020) foi realizada diluição seriada dos OE das sementes de *Moringa oleífera* Lam. e *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori também em testes com embriões de zebrafish e demonstraram que altas concentrações (≥ 50 µg/mL) causaram mortalidade em 100% dos embriões, comprovando sua toxicidade.

A toxicidade da *C. citratus* pode estar relacionada aos seus diferentes constituintes químicos presente no OE. Os mais encontrados são, o citral, que é a mistura de dois isômeros, geranial (α -citral) e neral (β -citral) e também é identificado a presença de compostos minoritários como, linalol (3,7-dimetil-octa-1,6-dien-3-ol), geraniol (trans-3,7-dimetil-octa-2,6-dien-1-ol) e mirceno (7-metil-3-metilen-1,6-octadieno) (OLIVEIRA et al., 2011; VELOSO et al., 2012).

Há estudos sobre o efeito que esses compostos puros podem ocasionar em organismos modelos, como o trabalho realizado por Singulani et al. (2018) no qual os embriões de zebrafish foram submetidos a diferentes concentrações de linalol e geraniol, o mesmo demonstrou que o geraniol foi o composto mais tóxico. As concentrações mais altas testadas de linalol e geraniol causaram a morte de todos os embriões em 5 hpf e as demais concentrações de geraniol provocaram coagulação embrionária e efeitos teratogênicos. Já o composto linalol nas menores concentrações não promoveu diferença significativa na curva de sobrevivência com o grupo controle, isso pode justificar os resultados obtidos no presente trabalho, onde em maiores concentrações provocaram à morte dos embriões e as menores doses não afetaram significativamente o desenvolvimento do embrião e larva da espécie *Danio rerio*.

Estudo realizado com os adultos de *Sitophilus granarius* (caruncho-do-trigo) utilizando concentrações de OE da *C. citratus*, demonstrou que o composto do óleo acetato de geranil tem uma toxicidade de contato mais forte do que o citral, sendo que ambos compostos causam efeitos significativos na mortalidade, esgotamento da respiração, indicando estresse fisiológico como uma das principais explicações para a toxicidade do óleo (PLATA-RUEDA et al., 2020).

Há estudos que sugerem que a toxicidade embrionária aumenta de acordo com o tempo de exposição ao extrato, visto que, a camada protetora do embrião fica debilitada, permitindo assim que o embrião entre em contato com o meio (ALAFIATAYO et al., 2019). No trabalho de Ali et al. (2017) foi observado que a medida que o processo de desenvolvimento avançava ocorria a redução na proteção do córion, podendo influenciar no aumento da abertura e no alargamento do canal de poro coriótico, permitindo maior influxo de solutos externos. Foi demonstrado que em ovos mais velhos, o papel do córion parecia apenas para impedir os embriões de grandes macromoléculas e parasitas. O que pode explicar o que ocorreu com a concentração 12,5 $\mu\text{g/mL}$, pois ao longo do tempo tornou-se tóxica para os embriões.

O óleo da *C. citratus* foi utilizado para avaliar a taxa de eclosão dos ovos da espécie *Sarcóptes*, onde foram testadas concentrações do OE verificando que a *C. citratus* levou a diminuição significativa na eclosão dos ovos nas maiores concentrações (LI et al., 2020). Estudos demonstram que falha na eclosão pode ser devido a alterações na liberação digestiva da enzima corionase e/ou movimento muscular enfraquecido por causa de defeitos comportamentais (MANIGANDAN et al., 2015).

Outro trabalho utilizou o composto citral em células humanas demonstrou que concentrações elevadas podem ocasionar alta citotoxicidade e efeitos genotóxicos. Entretanto em concentrações intermediárias pode gerar efeito mutagênico, semelhante ao que ocorreu na concentração testada de 6, 25 µg/mL (SOUZA et al., 2020).

É importante ressaltar que as menores concentrações do OE da *C. citratus*, que não apresentaram efeitos letais ou teratogênicos, podem promover efeitos terapêuticos como visto no estudo utilizando OE das sementes de *M. oleifera* e *M. peregrina*. Nesse estudo, as menores concentrações não apresentaram efeitos tóxicos ou teratogênicos e interferiram significativamente no processo de formação de vasos sanguíneos angiogênicos em embriões de zebrafish. Esses resultados demonstraram que os óleos possuem atividades antiangiogênicas, que podem ser um dos mecanismos possíveis pelos quais o óleo de moringa exerce sua atividade anticâncer (ELSAYED et al., 2020).

Em estudos utilizando OE da *C. citratus* em células de ovário de hamster chinês (CHO) usado em baixas concentrações foi evidenciado que o mesmo não apresentou risco de mortalidade ou toxicidade as células (TOFIÑO-RIVERA et al., 2016). Ou seja, os resultados apresentados nesse trabalho fornecem dados de concentrações seguras para pesquisas posteriores dos efeitos terapêuticos do OE da *C. citratus*.

O efeito citotóxico do OE da *C. citratus* foi avaliado contra uma linha celular de queratinócitos humanos (HaCaT) avaliado na faixa de 0,25 a 25 mg / ml⁻¹. A menor concentração apresentou 98% e a maior atingiu 85% de viabilidade celular, demonstrando que o OE da *C. citratus* possui baixa toxicidade (OLIVEIRA et al., 2017).

Lulekal e seus colaboradores (2019) forneceram OE da *C. citratus* oralmente para os ratos e formularam uma pomada com 10% do mesmo, aplicando-a sobre a pele de coelho. Os resultados indicaram ausência de toxicidade aguda e subaguda. Além disso, garantiram a segurança de utilizar o óleo para uso cosmético.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo indicam que o OE da *C. citratus* nas maiores concentrações causaram efeito tóxico e teratogênico nos embriões e larvas de *Danio rerio*. Porém, os embriões e larvas expostos as menores concentrações (3,12; 1,56; 0,79 e 0,39 µg/mL) não apresentaram toxicidade e deformações ao longo do desenvolvimento embrionário.

Portanto, esse trabalho corrobora e complementa estudos, sobre a utilização segura da planta e seus possíveis efeitos manipulando um modelo animal, o que ainda é escasso na literatura. Sendo necessário mais estudos sobre protocolos de segurança do OE da *C. citratus*.

REFERÊNCIAS

ALAFIATAYO, 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, M. et al. The protective layer of zebrafish embryo changes continuously with advancing age of embryo development (AGED). **J. Toxicol. Pharmacol**, v. 1, n. 2, 2017.

ASAD, Z.; SACHIDANANDAN, C. Chemical screens in a zebrafish model of CHARGE syndrome identifies small molecules that ameliorate disease-like phenotypes in embryo. **European Journal of Medical Genetics**, v. 63, n. 2, p. 103661, 2020.

AVDESH, A. et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 69, p. e4196, 2012.

BRIGANTE, T. Avaliação de toxicidade de psicofármacos com potencial terapêutico. 2019. 21 p. Tese (Doutorado em Toxicologia) - Universidade de São Paulo, 2019.

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.

CARVALHO, V. et al. In vitro anthelmintic activity of *Siparuna guianensis* extract and essential oil against *Strongyloides venezuelensis*. **Journal of helminthology**, v. 94, 2020.

CHAVES, H. A S. da. Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) realizado no Laboratório de Ecofisiologia E Comportamento Animal (LECA-UFRPE). Recife-PE. 2019.

COSTA, L. 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.

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.

EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E.; NYOH, A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. **Chinese journal of natural medicines**, v. 13, n. 5, p. 321-337, 2015.

ELSAYED, E. et al. Evaluation of developmental toxicity and anti-angiogenic potential of essential oils from *Moringa oleifera* and *Moringa peregrina* seeds in zebrafish (*Danio rerio*) model. **South African Journal of Botany**, v. 129, p. 229-237, 2020.

FERNÁNDEZ-PALACIOS, H. et al. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). **Aquaculture**, v. 132, n. 3, p. 325-338, 1995.

GOMES, E. N. da. Estudos da atividade anti-parasitária, toxicológica e histopatológica dos extratos etanólicos de *Solanum paniculatum* e *Cymbopogon citratus*. 2017.44 p. Tese (Mestrado em Morfotecnologia) - Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

HALLARE, A.V.; KOHLER, H. R.; TRIEBSKORN, R. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to diclofenac and its solvent, DMSO. **Chemosphere, Oxford**, v. 56, n. 7, p. 659-666, Aug. 2004.

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.

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.

KIMMEL, C. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, New York, v. 203, n. 3, p. 253-310, July 1995.

KJØRSVIK, E.; MANGOR-JENSEN, A.; HOLMEFJORD, I. Egg quality in fishes. In: **Advances in Marine biology**. Academic Press, 1990. p. 71-113.

LAKUŠIĆ, D. et al. Seasonal variations in the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae). **Natural product communications**, v. 8, n. 1, p. 1934578X1300800132, 2013.

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

LI, M. et al. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil: A promising miticidal and ovicidal agent against *Sarcoptes scabiei*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 4, p. 0008225, 2020.

LULEKAL, E. et al. Phytochemical analysis and evaluation of skin irritation, acute and sub-acute toxicity of *Cymbopogon citratus* essential oil in mice and rabbits. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 1289-1294, 2019.

MAGALHÃES, H. et al. Allelopathic action essential oils of alecrim-pimenta and lemongrass in germination of lettuce achenes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 485-496, 2013.

MANIGANDA, K. et al. Taxifolin mitigates oxidative DNA damage in vitro and protects zebrafish (*Danio rerio*) embryos against cadmium toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39: 1252-61, 2015.

OLIVEIRA, M. et al. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. **Brazilian oral research**, São Paulo, 06 nov., v. 31, 2017.

OLIVEIRA, M. et al. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 08-16, 2011.

PARASURAMAN, S.; THING, G. S.; DHANARAJ, S. A. Polyherbal formulation: Concept of ayurveda. **Pharmacognosy reviews**, v. 8, n. 16, p. 73, 2014.

PINTO, J. E.B.P; BERTOLUCCI, S. K. V. Cultivo e processamento de plantas medicinais. Editora Ufla: Universidade Federal de Lavras, 2002.

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.

RICO, E. P. Influência do metanol e do etanol sobre a atividade e a expressão gênica das ectonucleotidases e acetilcolinestrases em cérebro de zebrafish (*Danio rerio*), 2007.114p. Tese (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

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

SANTOS, I. 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.

SERRA, E. L.; MEDALHA, C.C; MATTIOLI, R. Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) environment. **Brazilian journal of medical and biological research**, v.32, n.12, p. 1551-1553, 199.

SCOPEL, C. F. V. et al. Toxicidade do bisfenol-A durante o desenvolvimento embrionário de Zebrafish. 2019. 55 p. Tese (Mestrado em Ciências Aplicadas a Saúde) - Universidade Federal de Goiás, 2019.

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

SILVA, L. L. S de. Avaliação da toxicidade de extrato e lectina de sementes de *Moringa oleifera* (WsMol) sobre larvas de *Danio rerio* (peixe paulistinha). 2016.57 p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SILVA, M. R. Estudo comparativo dos efeitos dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon winterianus* (POACEAE) no sistema nervoso central de camundongos, 2009.

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

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.

SPENCE, R. et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. **Biological reviews**, v. 83, n. 1, p. 13-34, 2008.

TG236, O. E. C. D. OECD guidelines for the testing of chemicals section 2: Effects on biotic systems test No 236: fish embryo acute toxicity (FET) test. **Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France**, 2013.

TOFIÑO-RIVERA, A. et al. Effect of *Lippia alba* and *Cymbopogon citratus* essential oils on biofilms of *Streptococcus mutans* and cytotoxicity in CHO cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 749-754, 24 Dez., 2016

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

WESTERFIELD, M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of the zebrafish (*Danio rerio*). **University of Oregon Press**. 2007.

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.