



Uso do teste da formalina para avaliação do potencial antinociceptivo do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) utilizando o peixe *Danio rerio*

Use of the formalin test to evaluate the antinociceptive potential of lemongrass essential oil (*Cymbopogon citratus*) using the fish *Danio rerio*

<https://doi.org/10.32712/2446-4775.2023.1479>

Wolkers, Carla Patrícia Bejo^{1*}

 <https://orcid.org/0000-0001-5321-5732>

Pinheiro, Letícia Rodrigues¹

 <https://orcid.org/0000-0003-4712-0926>

¹Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Campus Pontal, Faculdade de Ciências Integradas do Pontal. Rua Vinte, 1600, Tupã, 38304402, Ituiutaba, MG, Brasil.

*Correspondência: carlawolkers@ufu.br.

Resumo

A dor é caracterizada como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano ou lesão tecidual, sendo detectada por meio dos receptores especializados denominados nociceptores. A antinocicepção é o processo em que há a inibição da transmissão da informação nociceptiva, sendo mediada por sistemas endógenos e alcançada por substâncias exógenas, como os fármacos. A necessidade de se buscar novos compostos farmacológicos que auxiliam no tratamento da dor compõe um amplo campo de estudo, sendo assim, o presente trabalho objetivou testar um modelo biológico utilizando o peixe *D. rerio* para avaliação do potencial antinociceptivo de substâncias extraídas de plantas. Utilizou-se 24 peixes que foram filmados por 5 min (linha de base), tratados com veículo (Controle, n=8), óleo essencial de *C. citratus* (200 mg/kg, n=8) ou dipirona (100 mg/kg, n=8), após 30 minutos os animais foram submetidos ao teste nociceptivo da formalina e novamente filmados por 5 min (pós-estímulo), para avaliação comportamental. Foi observada diminuição da atividade locomotora em resposta à formalina, sendo este efeito bloqueado pelo tratamento com dipirona. O óleo essencial (OE) não apresentou efeitos significativos sobre a nocicepção, sendo necessários estudos complementares para a determinação de seu potencial antinociceptivo.

Palavras-chave: Antinocicepção. Dor. Nocicepção. Zebrafish.

Abstract

Pain is characterized as an unpleasant sensory and emotional experience associated with tissue damage or injury, being detected through specialized receptors called nociceptors. Antinociception is the process where the transmission of nociceptive information is inhibited, being mediated by endogenous systems and achieved by exogenous substances, such as drugs. The research for new pharmacological compounds for pain treatment is a wide field of study, therefore, the present work aimed evaluate a new biological model using the fish *D. rerio* to analyze the antinociceptive potential of substances extracted from plants. Twenty-four fish were filmed for 5 min (baseline), treated with vehicle (Control, n=8), *C. citratus* essential oil (200 mg/kg, n=8) or dipyrone (100 mg/kg, n=8), after 30 minutes the animals were submitted to the formalin nociceptive test and filmed for 5 min (post-stimulus) for behavioral evaluation. Decreased locomotor activity was observed in response to formalin, and this effect was blocked by treatment with dipyrone. The essential oil (EO) did not present significant effects on nociception, requiring further studies to determine its analgesic potential.

Keywords: Antinociception. Pain. Nociception. Zebrafish.

Introdução

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) pode-se caracterizar dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano.” A dor pode ser descrita, portanto, como uma experiência sensorial complexa, que envolve atividades encefálicas, incluindo a cognição e afetividade, sendo considerada uma característica que favorece a sobrevivência, alertando possíveis danos letais ao organismo^[1].

A percepção da dor inicia-se a partir da detecção de estímulos nocivos, sendo eles térmicos, químicos ou mecânicos, por meio de nociceptores, que promovem a transdução e condução destes estímulos para o sistema nervoso central (SNC). A condução pode ser rápida ou lenta, sendo determinada pelo tipo de fibra envolvida neste processo (A δ ou C). Inicialmente a informação nociceptiva é conduzida ao tálamo, principalmente aos núcleos lateral e medial, a partir dos quais é enviada ao córtex somatossensorial, onde ocorre a interpretação das informações e conseqüentemente a percepção consciente do estímulo nocivo como dor. A percepção da dor auxilia na sobrevivência do indivíduo e, em determinadas situações, para que não ocorra prejuízo na execução de comportamentos importantes para sua sobrevivência, os mecanismos endógenos de analgesia podem ser ativados^[2-4].

A analgesia ocorre pela inibição de informações envolvidas na transmissão da nocicepção, por meio da liberação de substâncias como os opióides endógenos, por exemplo^[2-4]. Esta analgesia também pode ser alcançada por meio do uso de substâncias exógenas sintéticas ou extraídas de plantas. O primeiro analgésico utilizado foi o ópio, uma substância extraída da semente de uma planta, a papoula (*Papaver somniferum*), a partir do qual, mais tarde, foi isolada a morfina, um dos analgésicos mais amplamente utilizados até os dias atuais para o tratamento de dores graves, sendo uma prática incorporada ao longo de muitos anos devido sua capacidade de alívio imediato para dores intensas em curto prazo. No entanto, a eficácia da morfina para o tratamento de dores crônicas a longo prazo se mantém incerta, bem como os riscos e efeitos colaterais que podem ocasionar aos indivíduos que fazem seu uso de forma indiscriminada, podendo causar níveis acentuados de tolerância, dependência e outras neuroadaptações, comprometendo sua eficácia e segurança^[5-7].

Neste contexto, a definição de novas moléculas com potencial analgésico e menores efeitos colaterais é essencial para a criação de novos fármacos eficientes no tratamento da dor. A utilização de compostos extraídos de plantas vem se fazendo presente desde a antiguidade de forma empírica, por comunidades tradicionais. Esta terapêutica, denominada fitoterapia, utiliza os medicamentos cujos constituintes ativos são plantas ou derivados vegetais, e que tem a sua origem no conhecimento e uso popular^[8], sendo sua incorporação incentivada nos cuidados primários do Sistema Único de Saúde (SUS)^[9]. O Brasil apresenta grande potencial medicinal, especialmente devido à sua imensa biodiversidade vegetal. Entretanto, apesar de se ter uma farmacopeia diversa, a escassez de estudos nesta área impede que espécies nativas que possuem valor medicinal sejam incorporadas na fitoterapia^[10,11], sendo essencial a definição de novos modelos biológicos que permitam o estudo destes compostos de maneira detalhada.

A espécie *Cymbopogon citratus*, popularmente conhecida como capim-santo, capim-limão, e capim-cidreira, de acordo com o Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira^[12], é amplamente utilizada por suas propriedades antiespasmódicas, ansiolíticas e sedativas. Estudos farmacológicos também apontam potencial antioxidante^[13], antitumoral^[14], antimicrobiano^[15,16], antifúngico^[17], antidiarreico^[18], hipotensivo^[19], hipoglicêmico, hipolipidêmico^[20], anticonvulsivante^[21], além de um efeito antinociceptivo^[22,23]. Entretanto, o conjunto de evidências disponíveis na literatura sobre os efeitos do *C. citratus* ainda são escassos, especialmente no que concerne seu potencial antinociceptivo, tornando as preparações extraídas desta planta, um potencial objeto de estudo com vistas à sua aplicação fitoterápica efetiva como um analgésico.

Estudos farmacológicos são, geralmente, realizados utilizando-se modelos biológicos mamíferos, devido à sua proximidade genética e fisiológica com o organismo humano. Entretanto, o uso destes modelos, além de economicamente dispendioso, exige estruturas de manutenção de grandes dimensões agregando mais custos ao seu uso. Neste contexto, a busca por novos modelos biológicos que possam ser adequadamente aplicados à estudos farmacológicos é essencial^[24].

O peixe *Danio rerio* pertencente à família Cyprinidae, e é um teleósteo que apresenta alto grau de homologia morfológica, biológica e comportamental em relação aos mamíferos, apresentando aproximadamente 70% de semelhança^[25], além de apresentar forma de reprodução muito facilitada, com a postura de ovos a cada 2 ou 3 dias, baixo custo em relação à aquisição e manutenção diária, rápida absorção pelo SNC das substâncias que são adicionadas à água ou injetadas intraperitonealmente, favorecendo desta maneira o avanço das pesquisas nestas áreas de interesse e eficácia nos estudos relacionados a doenças humanas^[26,27]. Sendo assim, a padronização de um modelo biológico para o estudo da nocicepção e antinocicepção utilizando o *D. rerio* é essencial para o avanço desta área da ciência.

O presente estudo objetivou avaliar um modelo experimental para o estudo de plantas medicinais com potencial analgésico, utilizando o *zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo biológico. Avaliando a resposta comportamental do *D. rerio* ao teste da formalina e o efeito do pré-tratamento com óleo essencial (OE) de *C. citratus* nas respostas comportamentais do *D. rerio* ao teste da formalina.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados 24 juvenis de *D. rerio*, de ambos os sexos, obtidos a partir de criadores de peixes ornamentais. Antes do início dos experimentos os peixes foram mantidos em aquários de 10 L por 3 semanas, para adaptação às condições laboratoriais. Os animais foram submetidos a um ciclo claro/escuro de 12/12 h (dia subjetivo) e com temperatura de 27°C, mantido com climatização ambiente. A iluminação foi promovida por sistema composto por temporizador e lâmpada fluorescente 20 W de intensidade luminosa 1200 lx. O oxigênio dissolvido, através de sistema aerador, foi mantido em ~ 8 mg/L e o pH da água na faixa de 6,5 a 8. O oxigênio dissolvido e pH foram mensurados diariamente por meio de oxímetro e pHmetro, respectivamente. Os níveis de amônia, nitritos e nitratos foram mensurados diariamente e mantidos abaixo de 0,002 mg/L e 0,5 ppm, respectivamente. A limpeza dos tanques e alimentação foram realizadas diariamente utilizando ração comercial contendo 28% de proteína bruta (PB) e 3.100 kcal de energia digestível (ED) por quilo.

Coleta da planta e extração do óleo essencial

Para realizar a extração do óleo essencial da planta *C. citratus* optou-se pela técnica de extração de destilação por arraste à vapor. As amostras foram coletadas de matrizes existentes no CT-Infra I da Universidade Federal de Uberlândia - *Campus* Pontal. Inicialmente foi realizado o processo de secagem, deixando a amostra em ambiente seco e escuro por aproximadamente 24 horas. A amostra foi cortada em pedaços menores, a fim de facilitar a pesagem e aumentar a superfície de contato com o balão volumétrico no processo de fervura. Após, foi pesado 30g da amostra e o conteúdo foi adicionado em um balão volumétrico de 1000 mL, e adicionou-se água. Por fim, o balão foi colocado no destilador tipo *cleverger*. Para a retirada do óleo, quando atingida a temperatura necessária, utilizou-se um tubo de ensaio e uma pipeta descartável. Ao término, a quantidade de óleo extraído foi armazenada em um freezer (-20°C) para manter suas características químicas^[28,29].

Procedimento experimental

Os peixes foram distribuídos individualmente em aquários de 10L, onde permaneceram por três dias para adaptação às condições experimentais. Após este período os peixes foram filmados por 5 minutos (linha de base), tratados com injeção intraperitoneal de veículo (0,01% (v/v) *polyoxyethylene sorbitan monooleate* (Tween 80®, Sigma–Aldrich) – Controle, n=8), óleo essencial de *C. citratus* (OE: 200 mg/kg, n=8)^[30] ou dipirona (DP: 100 mg/kg, n=8), e, após trinta minutos, foram submetidos ao teste nociceptivo, recebendo injeção subcutânea de 10 µL de formaldeído 3% na base da nadadeira dorsal utilizando-se uma seringa para microinjeção de 10 µL (Hamilton®) e retornaram ao aquário, sendo avaliados por 5 minutos (pós-estímulo). O teste da formalina foi baseado em estudos de Alves *et al.* e Wolkers *et al.* ^[31, 32].

O estudo do comportamento dos animais foi realizado por meio do *software* de monitoramento e quantificação comportamental *EthoVision XT 7.1*, sendo avaliadas a distância percorrida, velocidade de natação e tempo gasto no estrato superior do aquário. As análises de dados foram feitas comparando-se Linha de Base (LB) e Pós- Estímulo (PE) dentro de cada tratamento e o delta (Δ =PE-LB) foi utilizado para comparação dos efeitos dos tratamentos.

Análise dos dados

A distância percorrida, velocidade e tempo de permanência no estrato superior do aquário foram submetidos ao teste t ($p < 0,05$) para comparação entre a linha de base e pós-estímulo dentro de cada tratamento. Para comparar as alterações comportamentais entre os tratamentos, os dados de delta ($\Delta = PE - LB$) foram submetidos à análise de variância *One-way ANOVA* ($p < 0,05$).

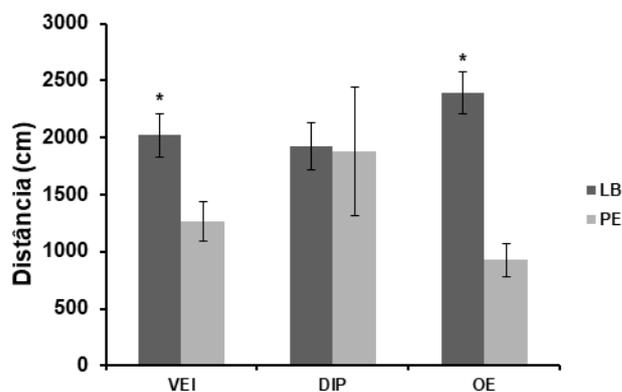
Nota ética

O trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (Protocolo nº 035/2019).

Resultados e Discussão

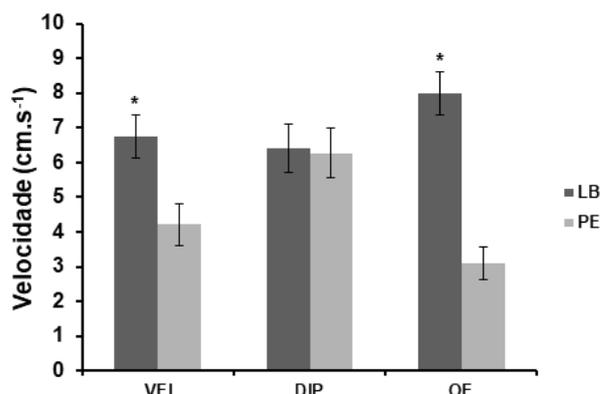
Foi observado que a injeção de formaldeído 3% promoveu redução na locomoção dos peixes, sendo observada redução na distância percorrida e na velocidade de natação ($t = 2,908$; $GL = 12$; $p = 0,013$), sem alteração na posição de natação no aquário ($t = -0,431$; $GL = 12$; $p = 0,674$). Nos peixes submetidos à injeção intraperitoneal de dipirona, não foi observada diferença na distância percorrida, na velocidade de natação ($t = 0,145$; $GL = 12$; $p = 0,887$) e na posição de natação no aquário ($t = 0,680$; $GL = 12$; $p = 0,510$). No tratamento com injeção intraperitoneal de OE foi observada redução na locomoção (distância percorrida e velocidade: $t = 6,265$; $GL = 12$; $p < 0,001$), sem alteração na posição de natação no aquário ($t = 0,592$; $GL = 12$; $p = 0,565$) (FIGURAS 1, 2 e 3).

FIGURA 1: Distância percorrida (cm) por *D. rerio* submetidos à injeção subcutânea de formaldeído à 3% após tratamento com injeção intraperitoneal de veículo (VEI), dipirona (DIP) e óleo essencial de *C. citratus* (OE). LB: linha de base; PE: pós estímulo. * indica diferença significativa entre LB e PE dentro do mesmo tratamento.



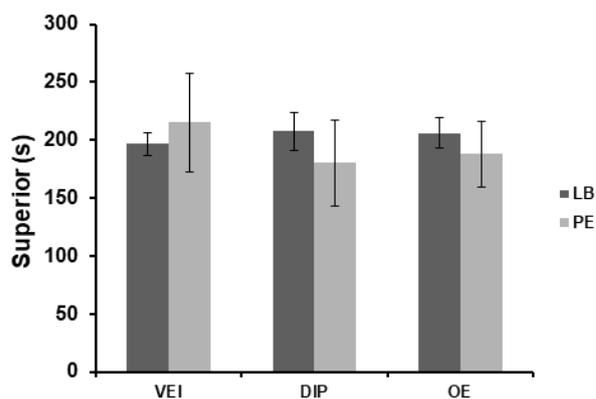
Fonte: os autores.

FIGURA 2: Velocidade ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$) por *D. rerio* submetidos à injeção subcutânea de formaldeído à 3% após tratamento com injeção intraperitoneal de veículo (VEI), dipirona (DIP) e óleo essencial de *C. citratus* (OE). LB: linha de base; PE: pós estímulo. * indica diferença significativa entre LB e PE dentro do mesmo tratamento.



Fonte: os autores.

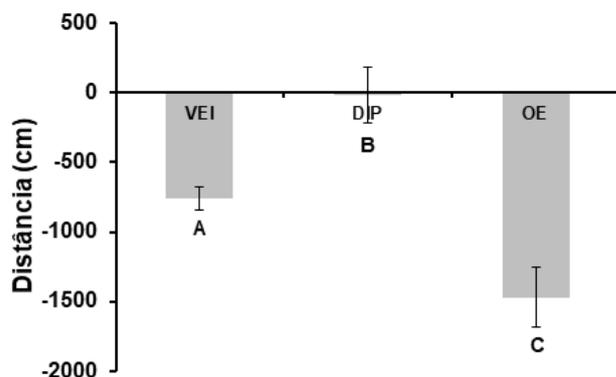
FIGURA 3: Permanência no estrato superior do aquário (s) por *D. rerio* submetidos à injeção subcutânea de formaldeído à 3% após tratamento com injeção intraperitoneal de veículo (VEI), dipirona (DIP) e óleo essencial de *C. citratus* (OE). LB: linha de base; PE: pós estímulo. * indica diferença significativa entre LB e PE dentro do mesmo tratamento.



Fonte: os autores.

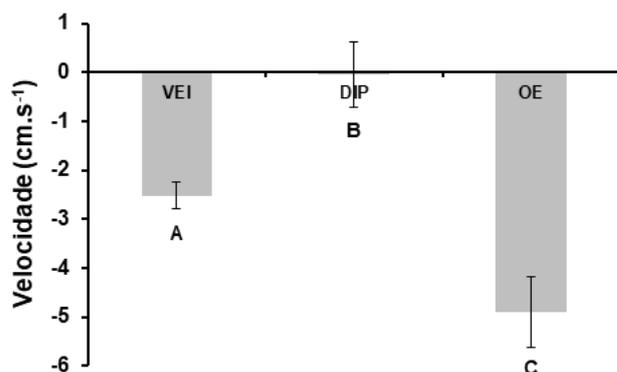
O tratamento com dipirona bloqueou a diminuição da atividade locomotora promovida pela injeção subcutânea de formaldeído 3%, enquanto o tratamento com OE promoveu uma redução ainda maior na locomoção ($F_{20,18}=17,077$; $p<0,001$). A permanência no estrato superior do aquário não foi influenciada pelo tratamento ($F_{20,18}=0,394$; $p=0,680$) (**FIGURAS 4, 5 e 6**).

FIGURA 4: Delta ($\Delta=PE-LB$) da distância percorrida (cm) por *D. rerio* submetidos à injeção subcutânea de formaldeído à 3% após tratamento com injeção intraperitoneal de veículo (VEI), dipirona (DIP) e óleo essencial de *C. citratus* (OE). LB: linha de base; PE: pós estímulo. Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos.



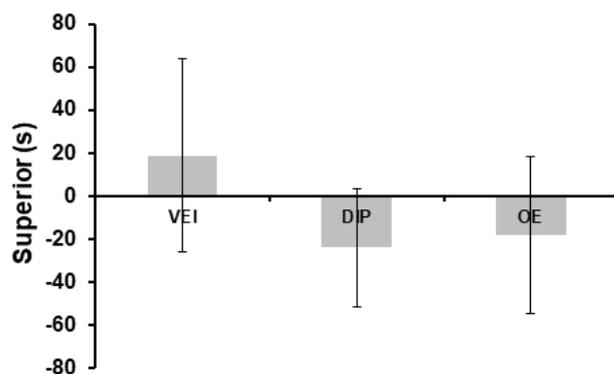
Fonte: os autores

FIGURA 5: Delta ($\Delta=PE-LB$) da velocidade ($cm.s^{-1}$) por *D. rerio* submetidos à injeção subcutânea de formaldeído à 3% após tratamento com injeção intraperitoneal de veículo (VEI), dipirona (DIP) e óleo essencial de *C. citratus* (OE). LB: linha de base; PE: pós estímulo. Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos.



Fonte: os autores.

FIGURA 6: Delta ($\Delta=PE-LB$) da permanência no estrato superior do aquário (s) por *D. rerio* submetidos à injeção subcutânea de formaldeído à 3% após tratamento com injeção intraperitoneal de veículo (VEI), dipirona (DIP) e óleo essencial de *C. citratus* (OE). LB: linha de base; PE: pós estímulo. Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos.



Fonte: os autores.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o *D. rerio* apresentou redução da atividade locomotora quando submetido ao teste nociceptivo da formalina, sendo esta redução bloqueada pelo tratamento prévio com dipirona, sem efeitos significativos do tratamento com óleo essencial de *C. citratus*, indicando que o teste da formalina pode ser aplicado para a avaliação de substâncias com potencial antinociceptivo em peixes.

O teste da formalina foi utilizado para avaliação comportamental do peixe frente a um estímulo nocivo químico e os efeitos do OE de *C. citrus* e da dipirona sobre seu comportamento. O teste da formalina, como um teste nociceptivo, foi desenvolvido em mamíferos^[33], e se caracteriza, neste animais, pela administração de injeção subcutânea de formalina nas patas dianteiras e traseiras do animal, sendo observadas duas fases de resposta comportamental, uma fase inicial aguda, causada pela dor neurogênica (primeira fase), seguida de um período mais prolongado causado pela dor inflamatória (segunda fase), caracterizadas por atividade comportamental aumentada, que pode durar até cerca de uma hora. Este teste tem a vantagem de permitir a avaliação da resposta do animal à dor moderada e contínua gerada por dano tecidual, possibilitando o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação^[34-37].

Em peixes, o teste da formalina foi adaptado^[31], sendo a aplicação subcutânea realizada na base da nadadeira do animal, ou nos lábios, e permite avaliar alterações comportamentais como indicadores fisiológicos da nocicepção. Em piaçu, a aplicação da formalina induz o intenso aumento de atividade locomotora, com um padrão de natação errático que se inicia após sua administração, além do aumento na frequência ventilatória^[31,32]. Entretanto, as respostas comportamentais e fisiológicas de peixes à estímulos nocivos parecem ser espécie-específicas^[38].

O presente estudo demonstrou uma redução da atividade locomotora após a aplicação da injeção de formaldeído a 3%. Outro estudo utilizando o *D. rerio* também demonstrou que a injeção intramuscular de solução de formaldeído (3 e 5 µL à 0,1%) na cauda ou lábios promoveu uma resposta comportamental caracterizada pela redução da atividade locomotora, tanto na fase neurogênica (0-5 min) quanto na fase inflamatória (15-30 min) da resposta à formalina^[39]. Este resultado corrobora o observado no presente estudo, sugerindo que a resposta desta espécie à injeção de formalina, independente do local de aplicação, se caracteriza pela redução significativa da atividade locomotora que pode ser observada utilizando-se diferentes métodos de análise comportamental e diferentes linhas do tempo, com avaliação apenas do estágio neurogênico, como realizado no presente estudo, ou, ainda, do estágio inflamatório como realizado por Magalhães *et al.*^[39]. Além disso, a utilização de outras substâncias químicas como agente nocivo em *D. rerio*, como o ácido acético, também promove a diminuição da atividade locomotora, sendo que a administração de ácido acético à 0,5; 1,0; 2,5 ou 5,0% (10 µL)^[40,41] na linha média entre as nadadeiras pélvicas promovem redução significativa na locomoção.

O estímulo doloroso pode ser visto como um aspecto fisiológico de proteção, porém, quando este estímulo se torna clínico, é de suma importância a intervenção farmacológica visando a manutenção da saúde e qualidade de vida do acometido. Diversas abordagens terapêuticas farmacológicas são utilizadas para o tratamento da dor incluindo o uso de analgésicos como a dipirona, o acetaminofeno (paracetamol), os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) e os opioides^[42]. No presente estudo, a dipirona foi utilizada como controle positivo para a avaliação dos efeitos do OE de *C. citratus* sobre a alteração comportamental desencadeada pela formalina. Os resultados demonstram que a dipirona (100 mg/kg) foi capaz de reverter os efeitos da formalina sobre o comportamento dos peixes, indicando um efeito antinociceptivo. A dipirona

é um anti-inflamatório não-estereoidal, com mecanismo de ação provavelmente periférico, bloqueando a dor inflamatória por meio da inibição de prostaglandinas e inibindo a liberação de fatores nociceptivos no local da lesão^[43,44]. Há, ainda, evidências de ação central deste medicamento ocasionando assim inibição da transmissão do impulso na medula espinhal^[45].

A avaliação do potencial antinociceptivo do *C. citratus* no presente estudo não demonstrou efeitos significativos, considerando o protocolo de administração em única dose (agudo) e a dosagem utilizada. Embora não tenham sido encontrados estudos avaliando seu efeito sobre a nocicepção em peixes, o OE de *C. citratus* parece apresentar efeitos centrais, havendo evidências de que possa promover inibição mediada pelo sistema GABAérgico^[46,47]. Além disso, efeitos do *C. citratus* como imunoestimulante^[48], anti-helmíntico^[49], ansiolítico^[46] e anticonvulsante^[47] foram demonstrados, sugerindo que peixes são sensíveis aos princípios ativos desta planta. Sendo assim, a ausência de efeitos do OE de *C. citratus* no presente estudo pode se dever à dosagem utilizada e ao protocolo de administração aguda. Em outros estudos que observaram efeitos centrais do OE de *C. citratus* em *D. rerio*^[46,47], embora também tenham realizado tratamentos agudos, utilizou-se a imersão como via de administração, não sendo possível traçar um paralelo entre as concentrações utilizadas por esses autores e a utilizada no presente estudo, que empregou a administração intraperitoneal, com dosagem baseada em estudos com mamíferos^[50].

Estudo utilizando o OE de *C. citratus* em camundongos submetidos ao teste de contorções induzidas por ácido acético e ao teste de formalina demonstrou efeitos antinociceptivos desta planta. No teste de contorção induzida por ácido acético a 0,6% os animais foram tratados com OE (5 e 10 mg / kg) e observou-se a diminuição significativa das contorções. Já no teste da formalina, demonstrou-se que a aplicação de OE (a partir da dosagem de 50 mg/ kg) foi efetiva na indução de antinocicepção na segunda fase da resposta à formalina (1%), indicando um possível efeito anti-inflamatório, já que esta fase é conhecida como fase inflamatória do teste da formalina^[50]. Em estudo realizado com ratos, utilizando a infusão (extrato) de *C. citratus* (68,24 mg/ Kg e 136,48 mg Kg - administração via oral) também foi observada a diminuição significativa das contorções induzidas por ácido acético, sendo que os flavonóides e os taninos parecem contribuir para esta atividade analgésica periférica^[51].

Embora os estudos supracitados sugiram um efeito antinociceptivo do *C. citratus* este efeito não é consistente na literatura científica. De fato, no estudo realizado por Morón Rodríguez *et al.*^[51], houve a ausência de ação antinociceptiva da administração do extrato fluído de *C. citratus* à 30%, por via oral, corroborando os resultados encontrados no presente estudo. As diferenças nos resultados encontrados podem ser resultado da dosagem, via de administração, preparação da planta utilizada e sua composição fitoquímica. No presente estudo, a composição fitoquímica não foi analisada, não sendo possível avaliar as concentrações de compostos potencialmente analgésicos como o citral, o mirceno, os compostos polifenóis, os flavonoides e os taninos no OE utilizado, que poderiam contribuir para uma a atividade antinociceptiva, de acordo com estudos prévios^[23,45,50].

Conclusão

A aplicação do teste da formalina em *D. rerio* mostrou-se uma alternativa interessante e eficiente para o estudo de substâncias exógenas com potencial analgésico em substituição a outros modelos biológicos, em especial ao uso de roedores. A possibilidade do uso da dipirona como o controle positivo eficiente

favorece a análise de dados, permitindo a avaliação destas substâncias com base em um analgésico já conhecido, com eficácia comprovada mediante inúmeros estudos e amplamente utilizado, possibilitando desta forma, validar o modelo biológico escolhido. Para a avaliação eficiente de substâncias extraídas de plantas é necessária a realização de ensaios com diferentes dosagens, preparações e tempos de tratamento que permitam a demonstração de seus potenciais efeitos analgésicos, podendo torná-las uma opção ao uso de fármacos industrializados e alopatícos.

Fontes de Financiamento

Universidade Federal de Uberlândia.

Conflito de Interesses

Não há conflito de interesses.

Agradecimentos

Agradecemos ao Biotério Zebrafish da Universidade Federal de Uberlândia por prover o espaço físico e o material necessários à execução dos experimentos.

Colaboradores

Concepção do estudo: CPBW; LRP

Curadoria dos dados: CPBW

Coleta de dados: CPBW; LRP

Análise dos dados: LRP

Redação do manuscrito original: LRP

Redação da revisão e edição: CPBW.

Referências

1. IASP (International Association for the Study of Pain). Pain terms: a list with definitions and notes on usage. **Pain**, 1979; 6: 249. [<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/460932/>].
2. Osterweis M, Kleinman A, Mechanic D. Illness Behavior and the Experience of Pain. In: Pain and Disability: Clinical, Behavioral, and Public Policy Perspectives. **National Academies Press (US)**, 1987. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK219238/>].
3. Basbaum AI, Jessell T. The Perception of Pain. In: Kandel ER, Schwartz JH. Principles of Neural Science. **Elsevier**. 2000; 4: 1227-1246.
4. Purves D *et al.* **Neurociências**. Artmed Editora. 2010. 4ª ed.
5. IASP (International Association for the Study of Pain). IASP Statement on Opioids. 2019. Disponível em: [<https://www.iasp-pain.org/Advocacy/Content.aspx?ItemNumber=7194>]. [acesso em: 30 jun. 2019].

6. Ballantyne JC, Mao J. Opioid Therapy for Chronic Pain. **New Engl J Med**. 2003; 349 (20): 1943-1953. [<https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra025411>].
7. Raffa RB. Pharmacology of oral combination analgesics: rational therapy for pain. **J Clin Pharm Therap**. 2001; 26 (4): 257-264. [<https://doi.org/10.1046/j.1365-2710.2001.00355.x>].
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Cadernos de Atenção Básica nº 31– Brasília: Ministério da Saúde, 2012. [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf].
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p. [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf].
10. Mendonça RA, Felfili JM, Walter BMT, Silva Jr. MC, Rezende AV, Filgueiras TS *et al*. Flora vascular do cerrado. In: Sano SM, Almeida SP. (ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: Embrapa.1998; 287-556.
11. Taufner CF, Ferraço EB, Ribeiro LF. Uso de plantas medicinais como alternativa fitoterápica nas unidades de saúde pública de Santa Teresa e Marilândia, ES. **Natureza**. 2006; 4(1): 30-39. [<http://www.naturezaonline.com.br/>].
12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2011. **Formulário de fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p. Disponível em: [<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/8080json-file-1>]. [acesso em: 29 mai. 2021].
13. Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J, Schmeda-Hirschmann G. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). **J Agric Food Chem**. 2005; 53(7): 2511-2517. [<https://doi.org/10.1021/jf0479766>].
14. Kauderer B, Zamith H, Paumgarten FJ, Speit G. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells in vitro. **Environ Mol Mutagen**. 1991; 18(1): 28-34. [<https://doi.org/10.1002/em.2850180106>].
15. Bassolé IHN, Lamien-Meda A, Bayala BOLC, Obame LC, Ilboudo AJ, Franz C *et al*. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine**. 2011; 18(12): 1070-1074. [<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.05.009>].
16. Danlami U, Rebecca A, Machan DB, Asuquo TS. Comparative study on the antimicrobial activities of the ethanolic extracts of Lemon grass and Polyalthia longifolia. **J Appl Pharm Sci**. 2011; 1(9): 174. [https://japsonline.com/admin/php/uploads/284_pdf.pdf].
17. Silva CDBD, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EE. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. **Braz J Infect Dis**. 2008; 12(1): 63-66. [<https://www.scielo.br/j/bjid/a/v4Y6YQjVGyzsyYWtgkJ8z6t/?format=pdf&lang=en>].
18. Tangpu V, Yadav AK. Antidiarrhoeal activity of *Cymbopogon citratus* and its main constituent, citral. **Pharmacology**. 2006; 2: 290-298. [https://www.researchgate.net/publication/273776815_Antidiarrhoeal_activity_of_Cymbopogon_citratus_and_its_main_constituent_citral].
19. Maniçoba HSNA. **Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-santo) sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos normotensos**. Aracaju, SE, 2013. Trabalho de Conclusão de

Curso [Graduação em Medicina] - Departamento de Medicina, Universidade Federal de Sergipe, UFS, Aracaju. [<http://ri.ufs.br/jspui/handle/riufs/8145>].

20. Adeneye AA, Agbaje EO. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. **J Ethnopharmacol.** 2007; 112(3): 440-444. [<https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.03.034>]

21. Blanco MM, Costa CARA, Freire AO, Santos Jr JG, Costa M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine.** 2009; 16(2-3): 265-270. [<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.04.007>]

22. Lorenzetti BB, Souza GE, Sarti SJ, Santos Filho D, Ferreira SH. Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. **J Ethnopharmacol.** 1991; 34(1): 43-48. [[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90187-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90187-1)]

23. Mota CM, Rodrigues-Santos C, Carolino RO, Anselmo-Franci, JA, Branco, LG. Citral-induced analgesia is associated with increased spinal serotonin, reduced spinal nociceptive signaling, and reduced systemic oxidative stress in arthritis. **J Ethnopharmacol.** 2020; 250: 112486. [<https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112486>]

24. Fukushima H, Bailone RL, Baumgartner, I, Borra RC, Correa T, de Aguiar L *et al.* (2020). Potenciais usos do modelo animal Zebrafish *Danio rerio* em pesquisas na Medicina Veterinária. **Rev Educ Contin Med Veter Zootec CRMV-SP.** 2020; 18(1). [<https://doi.org/10.36440/recmvz.v18i1.38049>]

25. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Teucke M. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature.** 2013; 496(7446): 498-503. [<https://doi.org/10.1038/nature12111>]

26. Lee KY, Jang GH, Byun CH, Jeun M, Searson PC, Lee KH. Zebrafish models for functional and toxicological screening of nanoscale drug delivery systems: promoting preclinical applications. **Bioscience reports.** 2017; 37(3). [<https://doi.org/10.1042/BSR20170199>]

27. Basnet RM, Zizioli D, Taweedet S, Finazzi D, Memo M. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. **Biomedicines.** 2019; 7(1): 23. [<https://doi.org/10.3390/biomedicines7010023>]

28. Oreopoulou A, Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Extraction of polyphenols from aromatic and medicinal plants: an overview of the methods and the effect of extraction parameters. **Polyphenols in plants.** 2019; 243-259. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00025-6>]

29. Biasi LA, Deschamps C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial.** Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009.

30. Viana GSB, Vale TG, Pinho RSN, Matos FJA. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **J Ethnopharmacol.** 2000; 70(3): 323-327. [[https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00168-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00168-3)].

31. Alves FL, Júnior AB, Hoffmann A. Antinociception in piauçu fish induced by exposure to the conspecific alarm substance. **Physiol Behav.** 2013; 110: 58-62. [<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.12.003>].

32. Wolkers CPB, Barbosa Junior A, Menescal-de-Oliveira L, Hoffmann A. Stress-induced antinociception in fish reversed by naloxone. **PloS one.** 2013; 8(7): e71175. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071175>].

33. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain.** 1977; 4: 161-174. [[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90130-0](https://doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0)].

34. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. 1987; 30(1): 103-114. [[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1)].
35. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. 1992; 51(1): 5-17. [[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-T](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-T)].
36. Randolph BC, Peters MA. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. **Anesth Prog**. 1997; 44(1): 11-16. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2148858/>].
37. Silva JC, Lima-Saraiva SRG, Oliveira-júnior RGD, Almeida JRGS. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Braz J Pharm**. 2013; 94: 18-23. [https://www.researchgate.net/publication/265124434_Modelos_experimentais_para_avaliacao_da_atividade_antinociceptiva_de_produtos_naturais_uma_revisao].
38. Sneddon LU. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. **Appl Anim Behav Sci**. 2003; 83(2): 153-162. [[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(03\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(03)00113-8)].
39. Magalhães FEA, de Sousa CÁP, Santos SAAR, Menezes RB, Batista FLA, Abreu AO, Campos AR. Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception. **Zebrafish**. 2017; 14(5): 422-429. [<https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1436>].
40. Correia AD, Cunha SR, Scholze M, Stevens ED. A novel behavioral fish model of nociception for testing analgesics. **Pharmaceuticals**. 2011; 4(4): 665-680. [<https://doi.org/10.3390/ph4040665>].
41. Costa FV, Rosa LV, Quadros VA, Santos AR, Kalueff AV, Rosemberg DB. Understanding nociception-related phenotypes in adult zebrafish: Behavioral and pharmacological characterization using a new acetic acid model. **Behav Brain Res**. 2019; 359: 570-578. [<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.10.009>].
42. Dos Santos GG. **Mecanismo de ação analgésica da dipirona: envolvimento dos receptores canabinóides CB1 e CB2 no tecido periférico**. Campinas; 2018. 71 p. Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP.
43. Tatsuo MAK, Carvalho WM, Silva CV, Miranda AEG, Ferreira SH, Francischi JN. Analgesic and antiinflammatory effects of dipyrone in rat adjuvant arthritis model. **Inflammation**. 1994; 18(4): 399-405. [[Link](#)].
44. Alves DP, Duarte ID. Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyrone. **Eur J Pharmacol**. 2002; 444(1-2): 47-52. [[Link](#)].
45. Lorenzetti BB, Ferreira SH. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyrone-induced spinal and peripheral analgesia. **Inflammation Res**. 1996; 45(6): 308-311. [[Link](#)].
46. Hacke ACM, Miyoshi E, Marques JA, Pereira RP. Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). **J Ethnopharmacol**. 2021; 260: 113036. [<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113036>].
47. Hacke ACM, Miyoshi E, Marques JA, Pereira RP. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, citral and geraniol exhibit anticonvulsant and neuroprotective effects in pentylenetetrazole-induced seizures in zebrafish. **J Ethnopharmacol**. 2021; 275: 114142. [<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114142>].
48. Al-Sagheer AA, Mahmoud HK, Reda FM, Mahgoub SA, Ayyat MS. 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. **Aquacult Nut**. 2018; 24(3): 1006-1014. [<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114142>].
49. Gonzales APPF, Yoshioka ETO, Mathews PD, Mertins O, Chaves FCM, Videira MN *et al*. Anthelmintic efficacy of *Cymbopogon citratus* essential oil (Poaceae) against monogenean parasites of *Colossoma*

macropomum (Serrasalmidae), and blood and histopathological effects. **Aquaculture**. 2020; 528: 735500. [<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735500>].

50. Garcia R, Ferreira JP, Costa G, Santos T, Branco F, Caramona M, Figueiredo IV. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activities of *Cymbopogon citratus in vivo*-polyphenols contribution. **Res J Med Plant**. 2015; 9(1): 1-13. [<https://doi.org/10.3923/rjmp.2015.1.13>].

51. Morón Rodríguez F, Furones Mourelle JA, Pinedo Gutiérrez Z. Ausencia de efectos antiinflamatorio y analgésico del extracto fluido de *Cymbopogon citratus* al 30% por vía oral. **Rev Cub Plant Med**. 1996; 1(2): 3-6. [<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-186768>].

Histórico do artigo | Submissão: 02/06/2022 | **Aceite:** 19/09/2022 | **Publicação:** 30/09/2023

Como citar este artigo: Wolkers CPB, Pinheiro LR. Uso do teste da formalina para avaliação do potencial antinociceptivo do óleo essencial de capim limão (*Cymbopogon citratus*) utilizando o peixe *Danio rerio*. **Rev Fitos**. Rio de Janeiro. 2023; 17(3): 411-424. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/1479>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.

