



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
CONVENCIONAL E INTEGRATIVA

William Kantovisck Mozzer

**Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e potencial protetor do óleo essencial de
Nepeta cataria L. em um modelo de toxicidade aguda induzida por AlCl_3 em larvas de
*Danio rerio***

Curitibanos, SC

2025

William Kantovisck Mozzer

**Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e potencial protetor do óleo essencial de *Nepeta cataria* L.
em um modelo de toxicidade aguda induzida por AlCl₃ em larvas de *Danio rerio***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa da
Universidade Federal de Santa Catarina como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde
Animal.

Orientadora: Prof.^a Dra. Greicy Michelle M. Conterato

Coorientadora: Prof.^a Dra. Evelyn Winter da Silva

Curitibanos, SC

2025

Ficha catalográfica:

Mozzer, William Kantovisck

Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e potencial protetor do óleo essencial de *Nepeta. cataria* L. em um modelo de toxicidade aguda induzida por $AlCl_3$ em larvas de *Danio rerio* / William Kantovisck Mozzer ; orientadora, Greicy Michelle Marafiga Conterato, coorientadora, Evelyn Winter, 2025.

117 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa, Curitibanos, 2025.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. 2. Antioxidantes. 3. Estresse oxidativo. 4. *Nepeta cataria*. 5. Neuroproteção. I. Conterato, Greicy Michelle Marafiga. II. Winter, Evelyn. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. IV. Título.

William Kantovisck Mozzer

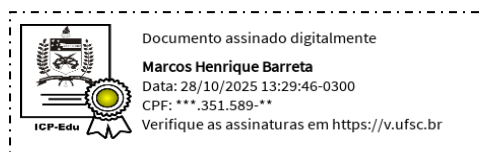
Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* e potencial protetor do óleo essencial de *N. cataria* L. em um modelo de toxicidade aguda induzida por $AlCl_3$ em larvas de *Danio rerio*

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 09 de outubro de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

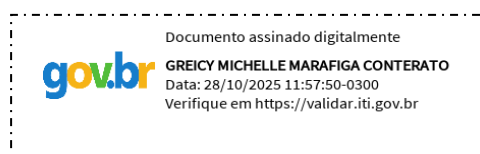
Profa. Dra. Viviane Glaser
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Paula Rossini Augusti
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Saúde Animal.



Prof. Dr. Marcos Henrique Barreta
Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Profa. Dra. Greicy Michelle Marafiga Conterato
Orientadora

Curitibanos, 2025.

Dedico esse trabalho a meus mestres e família.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço às professoras Greicy Michelle Marafiga Conterato e Evelyn Winter da Silva por seu comprometimento integral e pelas lições que delas recebi ao longo de todo o curso de mestrado. Minha gratidão também decorre de sua orientação para a execução do presente projeto e relato de pesquisa, uma vez que atuaram de modo a viabilizar não somente com capital financeiro, mas também humano, muitas das etapas do desenvolvimento do trabalho. Espero que um dia, caso ocupe posições similares às delas, possa atuar com tamanha paciência, integridade e celeridade para com aqueles que estiverem sob minha tutela. Neste sentido, meus agradecimentos são tanto de ordem profissional quanto pessoal.

Agradeço àqueles que em algum momento prestaram apoio complementar em minha passagem pelo curso. Destaco os demais professores do programa de pós-graduação, que em momento algum faltaram com suas responsabilidades, além dos demais mestres que auxiliaram na minha construção acadêmica desde os momentos iniciais ainda na graduação. Realizo um agradecimento especial aos professores Anna Maria Siebel, Malcon Pereira-Martinez e Angelo Luis Stapassoli Piato, que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho a partir de suas orientações durante o período de qualificação do projeto de pesquisa. Destaco ainda o professor Angelo e os membros de seu laboratório (LAPCOM/UFRGS) que prestaram auxílio em minha capacitação para a realização de etapas importantes do trabalho. Neste sentido, agradeço também à pesquisadora de pós-doutorado Rahisa Scussel (BIOTECH/UNESC) e à professora Bruna Tischer e à mestranda Jasmim Dalmas Lopes do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPGCTA/UFRGS), pela contribuição na realização de etapas fundamentais desta pesquisa. Presto ainda meus agradecimentos a todos os pesquisadores envolvidos na publicação das obras citadas por esse trabalho ou daquelas que serviram de base para a aquisição dos mais variados conhecimentos suplementares intrínsecos ao desenvolvimento das diversas atividades ao longo do curso de mestrado.

Envio meus agradecimentos profissionais e pessoais àqueles com quem atuei no Biotério de Peixes do CCR/UFSC, Raffaella Serrano, Paula Hamerski, e Gabriela Dias, destacando sua participação em meu desenvolvimento profissional e/ou pessoal. Com o mesmo teor agradeço aos membros do Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal (LAFRA/UFSC) pelo suporte técnico à condução de muitos dos experimentos conduzidos neste trabalho.

Por último, mas não menos importante, agradeço àqueles que foram meus mantenedores ao longo de todo o curso de mestrado: à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa (PPGMVCI), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e especialmente ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), o qual forneceu suporte financeiro para a realização de meus estudos.

“O racionalismo crítico não é apenas uma atitude intelectual. É também uma atitude moral. Consiste na disposição para ouvir os outros, para aceitar a crítica, para aprender com ela; é a disposição de crescer com o auxílio dos outros, mais do que a de tentar convencê-los a todo custo.”

(POPPER, *A sociedade aberta e seus inimigos*, 1945, p. 231)

RESUMO

O alumínio (Al), um metal ubíquo e de amplo uso em diversas atividades humanas pode induzir o estresse oxidativo e alterar a produção e degradação de neurotransmissores, contribuindo para a neurotoxicidade. Neste sentido, o estresse oxidativo e o desequilíbrio de neurotransmissores devido à exposição ao Al estão relacionados ao surgimento e à progressão de diversas doenças neurodegenerativas. Nesse contexto, a *Nepeta cataria* (Lamiaceae) surge como potencial alternativa para prevenir e/ou tratar a toxicidade induzida pelo Al, por ser fonte de compostos bioativos com propriedades antioxidantes e anticolinesterásicas. Este trabalho caracterizou o óleo essencial de *N. cataria* (OENC) por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e avaliou seu potencial antioxidante *in vitro*, bem como sua capacidade protetora em um modelo de toxicidade aguda por cloreto de alumínio (AlCl₃) em larvas de *Danio rerio* (peixe-zebra). O somatório das concentrações dos estereoisômeros de nepetalactona (89,7%) mostrou que estes foram os compostos majoritários do OENC, seguidos por (-)-trans-cariofileno (5,06%), β-pineno (1,84%), α-pineno (1,74%) e globulol (1,25%). OENC demonstrou atividade antioxidante *in vitro* pelo método da atividade sequestrante do radical DPPH (CE₅₀ 0,28 de mg/mL), potencial redutor de ferro (FRAP) (35,72 μmol eq. Fe²⁺/mL) e capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC) (1.309 μmol ET/mL). *In vivo*, o óleo atenuou a peroxidação lipídica induzida por AlCl₃, visto que os animais tratados simultaneamente com OENC e AlCl₃ apresentaram níveis significativamente menores (94,91% em relação ao controle) de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) do que os tratados apenas com AlCl₃ (146,1% relativo ao controle). Contudo, OENC não protegeu contra a redução da atividade da catalase causada por AlCl₃, nem foi capaz de modular a expressão de genes relacionados à resposta antioxidante. Embora o modelo de toxicidade aguda induzida por AlCl₃ não tenha provocado aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE), o OENC *per se* reduziu a atividade dessa enzima (74,27% relativo ao controle), o que, porém, não alterou significativamente os níveis de acetilcolina nem os parâmetros comportamentais avaliados, indicando uma atividade anticolinesterásica moderada. As avaliações de *docking* molecular revelaram que os compostos de OENC foram capazes de formar complexos estáveis com a AChE de peixe-zebra (zAChE), com destaque para o globulol que formou pontes de hidrogênio com resíduos críticos que determinam a afinidade da enzima por inibidores. Em suma, OENC apresenta atividade antioxidante *in vitro* por diferentes mecanismos, fornece proteção significativa contra a peroxidação lipídica induzida por AlCl₃ *in vivo* e possui ação anticolinesterásica *per se*. Estudos futuros são necessários para elucidar os demais mecanismos de ação que sustentam essas atividades.

Palavras-chave: *catnip*; espécies reativas; estresse oxidativo; compostos bioativos; anticolinesterásico; neuroproteção.

ABSTRACT

Aluminum (Al), a ubiquitous metal widely used in various human activities, can induce oxidative stress and alter the production and degradation of neurotransmitters, contributing to neurotoxicity. In this sense, oxidative stress and neurotransmitter imbalance due to Al exposure are related to the onset and progression of several neurodegenerative diseases. In this context, *Nepeta cataria* (Lamiaceae) emerges as a potential alternative to prevent and/or treat Al-induced toxicity, as it is a source of bioactive compounds with antioxidant and anticholinesterase properties. This study characterized the essential oil of *N. cataria* (OENC) by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) and evaluated its antioxidant potential *in vitro*, as well as its protective capacity in a model of acute aluminum chloride (AlCl₃) toxicity in *Danio rerio* (zebrafish) larvae. The sum of the concentrations of nepetalactone stereoisomers (89.7%) showed that these were the major compounds of OENC, followed by (-)-trans-caryophyllene (5.06%), β -pinene (1.84%), α -pinene (1.74%), and globulol (1.25%). OENC demonstrated antioxidant activity *in vitro* by the DPPH radical scavenging activity method (EC₅₀ 0.28 mg/mL), iron reducing potential (FRAP) (35.72 μ mol eq. Fe²⁺/mL), and oxygen radical absorbance capacity (ORAC) (1,309 μ mol ET/mL). *In vivo*, the oil attenuated AlCl₃-induced lipid peroxidation, as animals treated simultaneously with OENC and AlCl₃ had significantly lower levels (94.91% relative to control) of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) than those treated with AlCl₃ alone (146.1% relative to control). However, OENC did not protect against the reduction in catalase activity caused by AlCl₃, nor was it able to modulate the expression of genes related to the antioxidant response. Although the AlCl₃-induced acute toxicity model did not cause an increase in acetylcholinesterase (AChE) activity, OENC *per se* reduced the activity of this enzyme (74.27% relative to the control), which, however, did not significantly alter acetylcholine levels or the behavioral parameters evaluated, indicating moderate anticholinesterase activity. Molecular docking evaluations revealed that OENC compounds were able to form stable complexes with zebrafish AChE (zAChE), with emphasis on globulol, which formed hydrogen bonds with critical residues that determine the enzyme's affinity for inhibitors. In summary, OENC exhibits antioxidant activity *in vitro* through different mechanisms, provides significant protection against AlCl₃-induced lipid peroxidation *in vivo*, and has anticholinesterase activity *per se*. Future studies are needed to elucidate the other mechanisms of action that underlie these activities.

Keywords: reactive species; oxidative stress; bioactive compounds; anticholinesterase; neuroprotection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ação dos principais antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.....	22
Figura 2 – <i>Nepeta cataria</i> em estágio de floração.....	28
Figura 3 - Estrutura geral das nepetalactonas.....	30
Figura 4 – Biotério de peixes (A) e representação esquemática do sistema de recirculação de água (B)	38
Figura 5 - Fluxo de atividades para a avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de <i>N. cataria</i>	41
Figura 6 - Fluxo de atividades descritas no delineamento experimental.....	45
Figura 7 - Aparato de gravações para avaliação comportamental.....	54
Figura 8 - Estrutura química dos componentes identificados no óleo essencial de <i>Nepeta cataria</i>	59
Figura 9 - Potencial redutor de ferro (FRAP) de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>N. cataria</i>	61
Figura 10 - Curva de inibição obtida na avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH do óleo essencial de <i>N. cataria</i>	63
Figura 11 - Avaliação de parâmetros de toxicidade aguda do óleo essencial de <i>N. cataria</i> em larvas de peixe zebra após 48 h de exposição a diferentes concentrações do óleo	65
Figura 12 - Mortalidade observada da combinação de 150 µM AlCl ₃ e 12,5 mg/L OENC nas primeiras exposições para a avaliação do potencial protetor do óleo essencial de <i>N. cataria</i> em um modelo de toxicidade aguda por AlCl ₃ em larvas de <i>D. rerio</i>	66
Figura 13 - Avaliação dos níveis de TBARS e NPSH e da atividade enzimática de CAT após 48 h de exposição aos tratamentos	67
Figura 14 – Análise quantitativa da expressão dos genes <i>sod2</i> , <i>cat</i> , <i>gst</i> e <i>gpx4</i> em larvas de peixe-zebra após 48 h de exposição aos tratamentos	69
Figura 15 - Análise quantitativa da expressão dos genes <i>nrf2</i> , <i>mt-col1</i> , <i>ho-1</i> e <i>ucp2</i> em larvas de peixe-zebra após 48 h de exposição aos tratamentos.....	72
Figura 16 - Atividade de AChE e quantificação dos níveis de ACh em larvas de peixe-zebra após 48 h de exposição aos tratamentos	75
Figura 17 - Parâmetros comportamentais de distância total percorrida e velocidade média das larvas de peixe-zebra após 48 h de exposição aos tratamentos	77
Figura 18 – Arranjo tridimensional das estruturas moleculares do DPZ (A) e globulol (B) e suas respectivas interações com a zAChE.....	83

Figura 19 - Arranjo tridimensional das estruturas moleculares da 4 α ,7 α ,7 β -nepetalactona (A) e 4 α ,7 α ,7 α -nepetalactona (B) e suas respectivas interações com a zAChE	85
Figura 20 - Arranjo tridimensional das estruturas moleculares da 4 α ,7 β ,7 α -nepetalactona (A) e (-)-trans-cariofileno (B) e suas respectivas interações com a zAChE.....	86
Figura 21 - Arranjo tridimensional das estruturas moleculares do α -pineno (A) e β -pineno (B) e suas respectivas interações com a zAChE	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Genes utilizados para a análise de expressão gênica e seus respectivos oligonucleotídeos iniciadores	52
Tabela 2 - Compostos identificados por CG-EM presentes no óleo essencial de <i>N. cataria</i> ..	59
Tabela 3 – Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>N. cataria</i> : potencial redutor de ferro (FRAP), atividade sequestrante do radical DPPH e ORAC	64
Tabela 4 – Energia de ligação entre os ligantes e a zAChE obtidas através das simulações de <i>docking</i> molecular.....	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da zAChE obtidas através das simulações de <i>docking</i> molecular	81
Quadro 2 - Aminoácidos equivalentes entre zAChE e hAChE	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Å	Angstrom
AAPH	2,2-Azobis(2-metilpropionitrila)
ABTS	ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
Arg	Arginina
ASC	Área sobre a curva
Al	Alumínio
Al ³⁺	Cátion alumínio trivalente
[Al(H ₂ O) ₆] ³⁺	Íon hexaaqua alumínio
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ATP	Adenosina trifosfato
BA	Bolso acílico
BHE	Barreira hematoencefálica
BO	Buraco do oxiânion
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Cátion cálcio divalente
CAT	Catalase
<i>cat</i>	Gene codificante da catalase
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CE ₅₀	Concentração efetiva para 50% da resposta
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
ChAT	Colina acetiltransferase
CI ₅₀	Concentração inibitória para 50% da resposta
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
cm	Centímetro
CUPRAC	Potencial redutor de cobre
DA	Doença de Alzheimer
DEET	N,N-dietil-meta-toluamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
dpf	dias pós-fertilização

DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DPZ	Cloridrato de donepezila
DTNB	5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EM	Esclerose múltipla
EMM	Médias marginais estimadas
EO	Estresse oxidativo
ERs	Espécies reativas
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESI	Fonte de ionização por <i>eletrospray</i>
ET	Equivalente de Trolox
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FATCAT	Alinhamento estrutural rígido/flexível por encadeamento de pares de fragmentos alinhados
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
FeCl ₃ ·6H ₂ O	Cloreto de ferro hexahidratado
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Sulfato de ferro heptahidratado
FRAP	Potencial redutor de ferro
g	Grama
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GLM	Modelos lineares generalizados
Glu	Ácido glutâmico
GPx	Glutathione peroxidase
<i>gpx4b</i>	Gene codificante da glutathione peroxidase
GR	Glutathione reduzida
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione-S-transferase
<i>gst</i>	Gene codificante da glutathione-S-transferase
h	Horas
hAChE	Acetilcolinesterase humana

hpf	Horas pós-fertilização
<i>ho-1</i>	Gene codificante da heme oxigenase 1
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IK _{exp}	Índices de Kovats experimentais
IK _{teóricos}	Índices de Kovats teóricos
K ⁺	Cátion potássio monovalente
Kcal	Quilocaloria
L	Litro
LAMAI	Laboratório Multiusuário de Análise Instrumental
Leu	Leucina
M	Molar
MAO	Monoaminoxidase
MAO-B	Monoaminoxidase B
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
Min	Mins
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mm	milímetro
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS-222	Metanossulfonato de tricaína
<i>mt-col</i>	Gene codificante da subunidade I da Citocromo c oxidase
Na ⁺	Cátion sódio monovalente
NaCl	Cloreto de sódio
NaClO	Hipoclorito de sódio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
nm	nanômetro
•NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH oxidase

Nrf2	Fator nuclear derivado de eritrócitos 2
<i>nrf2</i>	Gene codificante do fator nuclear derivado de eritrócitos 2
O ₂	Gás oxigênio
O ₂ • ⁻	Radical ânion superóxido
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OENC	Óleo essencial de <i>N. cataria</i>
•OH	Radical hidroxila
ORAC	Capacidade de absorção de radicais oxigenados
PBS	Tampão salino fosfato
pg	Picograma
pH	Potencial hidrogeniônico
Phe	Fenilalanina
Pi	Fosfato inorgânico
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
PLIP	<i>Protein-Ligand Interaction Profiler</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RLs	Radicais livres
RNA	Ácido ribonucleico
ROO•	Radical peroxila
-SH	Grupos sulfidrila
s	segundos
SAC	Sítio aniônico catalítico
SAP	Sítio aniônico periférico (SAP)
Ser	Serina
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
<i>sod2</i>	Gene codificante da superóxido dismutase
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	Tríade catalítica
TCA	Ácido tricloroacético
TCh	Tiocolina
TFK	Tampão fosfato de potássio

TNB ⁻	Ácido 2-nitro-5-tiolbenzoico
TPP	1,1,3,3-Tetraetoxipropano
TPTZ	Tris(2-piridil)-sTriazina
Tris-HCl	Tris(hidroximetil)aminometano cloridrato
Trp	Triptofano
Tyr	Tirosina
<i>tuba</i>	Gene codificante da tubulina alfa I
UV	Ultravioleta
UCP	Proteína desacopladora
<i>ucp-2</i>	Gene codificante da proteína desacopladora
zAChE	Acetilcolinesterase de <i>Danio rerio</i>
°C	Graus Celsius
°dGH	Graus de dureza geral
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µmol	Micromol
µm	Micrometro
µS	Microsiemens

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	ESPÉCIES REATIVAS E ANTIOXIDANTES.....	19
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO.....	22
2.3	O PEIXE-ZEBRA (<i>Danio rerio</i>) COMO ORGANISMO MODELO EM PESQUISAS.....	23
2.3.1	Aspectos toxicológicos do alumínio	24
2.4	<i>Nepeta cataria</i> L.....	27
2.4.1	Atividades biológicas do óleo essencial de <i>Nepeta cataria</i> L.....	29
2.4.2	Compostos bioativos do óleo essencial de <i>Nepeta cataria</i> L.	30
2.5	MODELOS DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA ALINHADOS AOS PRINCÍPIOS DOS 3R'S	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	AQUISIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	33
4.2	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>N. cataria</i> L. 34	
4.3	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>N. cataria</i> 35	
4.3.1	Atividade sequestrante do radical DPPH.....	35
4.3.2	Potencial redutor de ferro (FRAP)	35
4.3.3	Capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC).....	36
4.4	ENSAIOS <i>in vivo</i>	37
4.4.1	Construção de um sistema de recirculação de água para a manutenção dos animais reprodutores	37
4.4.2	Manutenção dos animais reprodutores	38
4.4.3	Reprodução e coleta dos embriões	39
4.4.4	Avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de <i>N. cataria</i>	40
4.4.5	Avaliação do potencial protetor do óleo essencial de <i>N. cataria</i> em um modelo de toxicidade por AlCl ₃ em larvas de <i>D. rerio</i>	42

4.4.5.1	<i>Delineamento experimental</i>	43
4.4.5.2	<i>Preparo das amostras para as análises dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo e da atividade de AChE</i>	46
4.4.5.3	<i>Quantificação de proteína nas amostras</i>	46
4.4.5.4	<i>Avaliação da atividade da acetilcolinesterase</i>	47
4.4.5.5	<i>Quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</i>	48
4.4.5.6	<i>Quantificação do teor de tióis não-proteicos</i>	48
4.4.5.7	<i>Determinação da atividade da catalase</i>	49
4.4.5.8	<i>Preparo das amostras para análise da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo</i>	50
4.4.5.9	<i>Análise da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo</i>	50
4.4.5.10	<i>Quantificação dos níveis de acetilcolina</i>	52
4.4.5.11	<i>Avaliação comportamental dos animais</i>	53
4.5	ANÁLISE DE DOCKING MOLECULAR DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>N. cataria</i> COM ACETILCOLINESTERASE DE <i>D. rerio</i>	55
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>N. CATARIA</i>	58
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	59
5.3	TOXICIDADE AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>N. cataria</i> EM LARVAS DE <i>D. RERIO</i>	64
5.4	POTENCIAL PROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>N. cataria</i> EM UM MODELO DE TOXICIDADE AGUDA DE $AlCl_3$ EM LARVAS DE <i>D. rerio</i>	66
5.4.1	Avaliação da atividade protetora do óleo essencial de <i>N. cataria</i> em resposta ao estresse oxidativo induzido por $AlCl_3$	66
5.4.2	Avaliação da atividade anticolinesterásica <i>in vivo</i> do óleo essencial de <i>N. cataria</i>	75
5.4.3	Análise de <i>docking</i> molecular dos componentes do óleo essencial de <i>N. cataria</i> à acetilcolinesterase de <i>D. rerio</i>	80
6	CONCLUSÃO	88
7	REFERÊNCIAS	89

1 INTRODUÇÃO

O alumínio (Al) é um dos metais mais abundantes na natureza e comumente é utilizado na produção de uma série de produtos, como utensílios domésticos, latas de refrigerante e bebidas em geral, papel-alumínio, medicamentos, vacinas e farinhas (EXLEY, 2013; HACHEZ-LEROY, 2013; KAWAHARA; TANAKA; KATO-NEGISHI, 2021). O Al não é essencial à vida, pois não participa de reações biológicas conhecidas e pode atuar como uma neurotoxina, sendo relacionado ao desenvolvimento de uma série de doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica (ELA), doença de Parkinson (DP) e a doença de Alzheimer (DA) em humanos (KAWAHARA; KATO-NEGISHI, 2011; MIMURO et al., 2018; SULAIMAN; WANG; REN, 2020). Sua natureza química faz com que tenha uma baixa capacidade de troca de ligante, o que prolonga sua meia-vida no organismo, em especial nos neurônios, onde é retido e se acumula de forma semipermanente (KAWAHARA; TANAKA; KATO-NEGISHI, 2021). A principal via de contaminação por Al em mamíferos, especialmente os humanos, é a oral, através de alimentos, água e medicamentos.

Diferente do observado em mamíferos, a via branquial é a principal via de contaminação por Al em peixes (EXLEY; CHAPPELL; BIRCHALL, 1991). Após sua absorção, o Al pode induzir ao desenvolvimento de estresse oxidativo devido ao aumento da produção de espécies reativas (ERs) e impacto sobre a atividade de enzimas antioxidantes, o que leva a danos oxidativos a biomoléculas principalmente em tecidos como brânquias, fígado e encéfalo (CAPRIELLO et al., 2022; NAPOLITANO et al., 2023). No sistema nervoso central (SNC), o acúmulo de Al provoca desequilíbrios nos níveis de neurotransmissores, como catecolaminas, ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato, tanto em peixe-zebra quanto em mamíferos, com destaque para a acetilcolina (ACh), cuja concentração é reduzida devido ao aumento da atividade da acetilcolinesterase (AChE) em decorrência da sua interação com o Al. Essas alterações contribuem significativamente para o desenvolvimento de disfunções cognitivas (GULYA; RAKONCZAY; KÁSA, 1990; SANTANA; RICO; BURGOS, 2012; ANDERSEN et al., 2021; CAPRIELLO et al., 2021). Além disso, o Al já se apresentou como agente tóxico para uma série de organismos aquáticos incluindo vertebrados e não vertebrados, especialmente em condições de meio acidificado (CARDWELL et al., 2017 ; POLÉO et al., 2017).

O estresse oxidativo (EO) em organismos vivos, decorre de uma perturbação no equilíbrio entre ERs e antioxidantes em favor das ERs, fenômeno que gera uma condição em que as células sofrem com danos oxidativos significativos, os quais podem desencadear inclusive a morte celular. Os danos causados pelo EO podem estar associados ao

desenvolvimento de uma série de doenças, principalmente aquelas de caráter crônico, como as neoplasias, *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares, inflamatórias e neurodegenerativas (SIES, 1985; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). O SNC apresenta maior vulnerabilidade ao desenvolvimento do EO devido a uma série de fatores, como o alto consumo de oxigênio, alto conteúdo lipídico, níveis mais baixos de defesa antioxidante, auto-oxidação de neurotransmissores, além de maior concentração de íons metálicos em neurônios de determinadas regiões do encéfalo (REGO; OLIVEIRA, 2003; KIM et al., 2015).

Os antioxidantes são quaisquer substâncias que em baixas concentrações acabam por atrasar ou impedir a formação de ERs ou ainda interrompem as reações em cadeia de oxidação subsequentes, protegendo dessa forma as células dos danos provocados pelas ERs e o EO (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Os antioxidantes podem ser classificados inicialmente como endógenos e exógenos, e secundariamente, como enzimáticos e não-enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos atuam na remoção direta das ERs, enquanto os não-enzimáticos atuam na estabilização de ERs, através da doação de elétrons ou átomos de hidrogênio e também contribuem para retardar a peroxidação lipídica. A maioria dos antioxidantes não-enzimáticos são de origem exógena, obtidos através da ingestão dietética em animais, como as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol), além de produtos do metabolismo secundário de vegetais como os terpenoides, carotenoides e compostos fenólicos, o que torna algumas espécies vegetais importantes aliadas no combate ao desenvolvimento do EO e fenômenos secundários (VIJAYAKUMAR et al., 2009; YAHIA; GARCÍA-SOLÍS; MALDONADO CELIS, 2018; DE LA ROSA et al., 2019).

A *Nepeta cataria*, popularmente conhecida como erva-gateira ou *catnip*, é uma espécie herbácea do gênero *Nepeta*, pertencente à família Lamiaceae, nativa de algumas regiões da Ásia e Europa (YILMAZ; BOĞA; TOPÇU, 2016). Compostos bioativos, como compostos fenólicos e terpenoides em suas estruturas, fazem com que *N. cataria* apresente relevantes atividades biológicas. A apresenta atividade de atração sobre felinos domésticos, o que justifica seus nomes populares, como erva-dos-gatos e *catnip*. Os gatos e algumas outras espécies de felinos selvagens apresentam sensibilidade às nepetalactonas da composição da *N. cataria* e seus produtos derivados, desenvolvendo uma série de comportamentos lúdicos que se acredita estarem associados à redução do estresse e promoção do bem-estar nesses animais (MCELVAIN et al., ; IBRAHIM et al., 2022; NADEEM et al., 2022). Tal fato fez com que a espécie tenha ganhado relevância econômica no mercado *pet* nos últimos anos a partir da comercialização de uma série de produtos derivados (IBRAHIM et al., 2022). Estudos demonstram que seu óleo essencial apresenta, entre outras, atividades anticolinesterásica

(SATISH, 2013) e antioxidante (ASHRAFI et al., 2019; MOLLOVA et al., 2023), essa última sendo caracterizada somente através de avaliações *in vitro* até o momento. Satish (2013) observou que o óleo essencial de *N. cataria* foi capaz de reduzir a atividade de AChE em um modelo de neurotoxicidade com escopolamina em ratos, além de melhorar parâmetros de cognição nos animais. Apesar da relevância o trabalho de Satish (2013) foi o único relato na literatura que avaliou a atividade biológica da espécie vegetal em um modelo animal. Esse cenário reforça a necessidade de ampliar a investigação para outros modelos experimentais, destacando-se o *Danio rerio* por sua aplicabilidade em triagens *in vivo* de compostos bioativos com relevância translacional.

O *D. rerio* (peixe-zebra) é uma espécie de teleósteo que apresenta alta sensibilidade a contaminantes ambientais, incluindo metais (pesados), os quais levam ao surgimento de alterações comportamentais, imunológicas, genéticas, reprodutivas, cardiovasculares, hepáticas e neurotóxicas nesse animal (BAI; TANG, 2020; LI et al., 2023; ZHAO et al., 2024). As larvas de peixe-zebra possuem sistemas antioxidantes e vias de resposta ao estresse oxidativo semelhantes aos de outros mamíferos, incluindo humanos, permitindo a avaliação de biomarcadores clássicos de estresse oxidativo (SHAW et al., 2019; CHOWDHURY; SAIKIA, 2022; LIU et al., 2022).

Contudo, estudos relacionados à atividade antioxidante e protetora do óleo essencial de *N. cataria* ainda são escassos, apesar de vários componentes já relatados em seu óleo essencial apresentarem tais atividades de maneira isolada. Além disso, até o momento não foi possível encontrar estudos que avaliassem o seu efeito protetor frente à toxicidade induzida pelo Al em um modelo animal. Diante disso, o presente estudo visou caracterizar a composição do óleo essencial de *N. cataria*, além de avaliar sua atividade antioxidante *in vitro* e investigar seus efeitos antioxidantes e anticolinesterásicos em um modelo de toxicidade induzida por cloreto de alumínio (AlCl_3) em larvas de peixe-zebra.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESPÉCIES REATIVAS E ANTIOXIDANTES

As ERs são átomos ou moléculas altamente reativas, podendo ser classificadas ou não como radicais livres (RLs) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Os RLs são átomos ou moléculas que apresentam disparidades em sua camada eletrônica, devido ao desemparelhamento de um ou mais elétrons. Por sua vez, um elétron desemparelhado consiste naquele que se apresenta sozinho nos orbitais periféricos atômicos ou moleculares, o que torna tais átomos ou moléculas instáveis, levando a um maior nível de reatividade a biomoléculas do que quando comparado às suas formações estáveis, aquelas que estão com seus elétrons devidamente emparelhados (HALLIWELL et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Já as ERs não-radicalares são moléculas sem alterações eletrônicas que, apesar disso, apresentam por si só certo grau de reatividade, além de algumas estarem envolvidas no processo de produção de RLs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). As ERs podem ser classificadas em duas principais categorias, as espécies reativas de oxigênio (EROs) e as de nitrogênio (ERNs). As ERs ao tentarem se tornar estáveis, interagem com demais átomos e moléculas, através de reações de oxirredução, o que explica sua atividade deletéria às biomoléculas celulares, como proteínas e lipídeos de membrana, além do DNA, o que pode comprometer o funcionamento celular gerando prejuízos, que por vezes podem estar associados à fisiopatologia de determinadas doenças (HALLIWELL; CROSS, 1994; HALLIWELL, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; SIES, 2015).

As fontes de ERs podem ser tanto endógenas quanto exógenas. As principais fontes primárias de formação de EROs são as mitocôndrias, a partir do processo de respiração celular, bem como as próprias defesas celulares aos xenobióticos e citocinas. Na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, o escape de elétrons gerados pela oxidação de NADH e FADH₂ nos complexos I e III leva à produção de um íon de oxigênio desemparelhado, chamado de ânion radical superóxido (O₂•⁻) (HALLIWELL, 2007). Além da cadeia transportadora de elétrons, diversas enzimas podem atuar convertendo o O₂ a O₂•⁻, como por exemplo, as enzimas NADPH oxidase (NOX) em células fagocíticas, a qual por meio da transferência de elétrons ao O₂ produz o O₂•⁻. As ERs também são produzidas em outros processos fisiológicos, como a

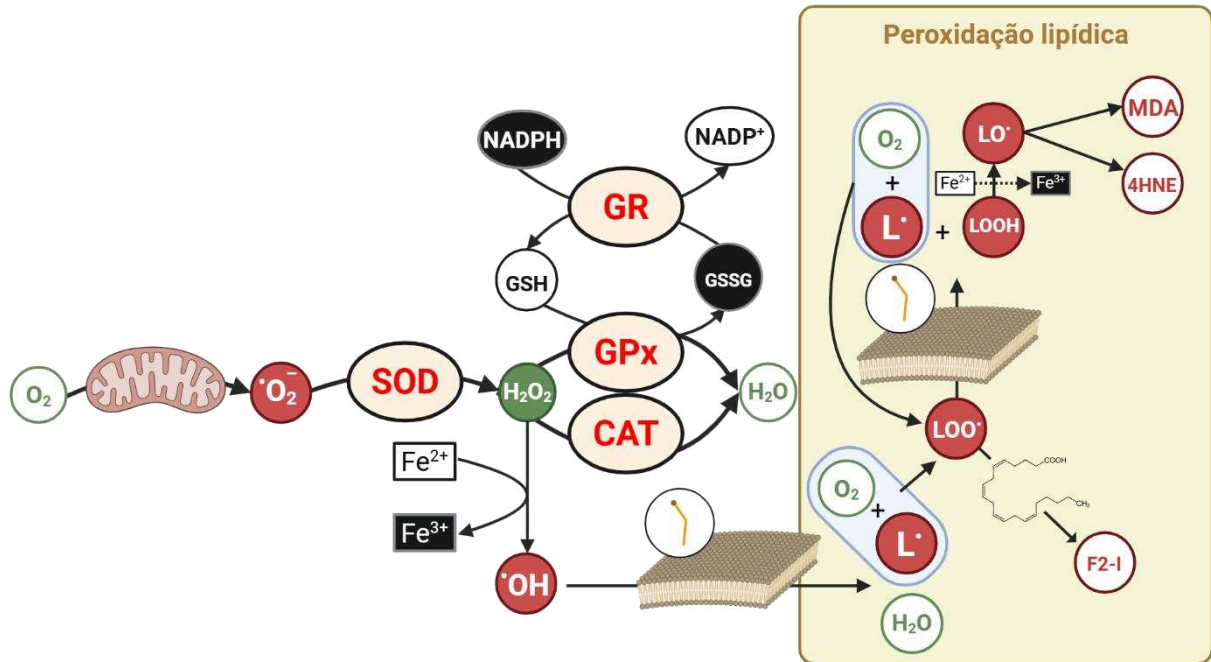
formação do óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) em neutrófilos, pela atividade das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), que tem por objetivo atuar contra à invasão por patógenos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; TAUFFENBERGER; MAGISTRETTI, 2021). Além de atuar na produção de $\bullet\text{NO}$ em fagócitos, as NOS estão presentes em diversos tecidos, onde atuam diretamente na produção de $\bullet\text{NO}$, o qual apresenta papel crucial em processos de sinalização vascular, como a regulação da contração da musculatura vascular. No tecido nervoso, as isoformas de NOS induzíveis (iNOS) e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) presentes majoritariamente nas células da glia e neurônios, são responsáveis pela produção de ERs envolvidas com o estresse oxidativo em processos de neurodegeneração, como nas DP, DA e esclerose múltipla (EM) (LÜTH; MÜNCH; ARENDT, 2002; TAUFFENBERGER; MAGISTRETTI, 2021; STYKEL; RYAN, 2022; SILVA et al., 2024). As ERs têm papel importante em uma série de processos fisiológicos, como a sinalização celular, regulação do equilíbrio redox, crescimento celular, apoptose e fagocitose, no entanto as mesmas também estão ligadas à numerosas doenças, não necessariamente como agentes causais diretos de tais condições patológicas, mas devido a sua participação em mecanismos fisiopatológicos que sustentam a progressão e/ou complicações de tais processos (HALLIWELL, 2007; BIRBEN et al., 2012).

Visando prevenir ou minimizar os danos causados pelas ERs, as células têm a capacidade de produzir diversos compostos que ajudam a diminuir e, até mesmo, impedir a formação dessas ERs, os quais são conhecidos como antioxidantes. Por definição, os antioxidantes são quaisquer substâncias que em baixas concentrações quando comparadas a um substrato oxidável, acabam por atrasar ou impedir a oxidação de tal substrato de maneira eficaz. Eles atuam neutralizando EROs ou interrompendo as reações em cadeia de oxidação, protegendo assim as moléculas biológicas de danos oxidativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Os antioxidantes podem ser inicialmente classificados como endógenos e exógenos, (quando são gerados ou não pelo próprio organismo) e, secundariamente, como enzimáticos e não-enzimáticos. O funcionamento dos antioxidantes enzimáticos baseia-se na remoção direta das ERs, enquanto os não-enzimáticos atuam na estabilização de espécies radicalares, através da doação de elétrons (redução) ou átomos de hidrogênio. Ademais, os antioxidantes não-enzimáticos também contribuem para retardar a peroxidação lipídica, ao suprimir o oxigênio singlete (uma das formas de EROs) e exercer atividade quelante sobre metais que participam das reações de Fenton e Haber-Weiss, as quais se constituem em fontes de produção do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (HALLIWELL et al., 1995; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; PIZZINO et al., 2017; YAHIA; GARCÍA-SOLÍS; MALDONADO CELIS, 2018).

Nos organismos animais, as defesas antioxidantes enzimáticas são compostas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), que de forma sequencial atuam na eliminação das EROs. A SOD catalisa a dismutação de duas moléculas de $O_2^{\bullet-}$, resultando na formação de uma molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é rapidamente reduzida pela CAT ou pela GPx - esta última realizando a oxidação duas moléculas de glutathione (GSH) - gerando água (H_2O) e O_2 . A atividade redutora da GSH depende da glutathione redutase (GR), que emprega o NADPH produzido na via das pentoses fosfato para converter a glutathione oxidada (GSSG) em GSH (HALLIWELL, 2006, 2007). A colaboração entre essas enzimas antioxidantes previne a formação do $\bullet OH$, que por sua vez não possui enzimas antioxidantes capazes de atuar na sua remoção e que induz a ativação da peroxidação lipídica. O radical $\bullet OH$ atua na captura de uma molécula de hidrogênio dos lipídios, originando, dessa forma, RLs derivados de lipídios, que, na sequência, formam hidroperóxidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Tais reações se caracterizam como reações em cadeia que resultam na produção de novos radicais, juntamente a aldeídos nocivos à saúde, como o malondialdeído (MDA), que através do ensaio de reatividade ao ácido tiobarbitúrico (TBA), serve como um biomarcador da peroxidação lipídica (Figura 1). Os isoprostanos também são resultantes da peroxidação lipídica e podem ser empregados como biomarcadores desse processo por meio de técnicas que envolvam a espectrometria de massas (MINOTTI; AUST, 1989; HALLIWELL et al., 1995; CAI, 2005). Exceto pela GSH, que atua em conjunto com o sistema antioxidante enzimático, e o ácido úrico, que possui atividade quelante de metais envolvidos na peroxidação lipídica, os demais antioxidantes não-enzimáticos são de origem exógena, obtidos em sua maioria através da ingestão dietética, como as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol), além de produtos do metabolismo secundário de vegetais como os terpenoides, carotenoides e compostos fenólicos (VIJAYAKUMAR et al., 2009; YAHIA; GARCÍA-SOLÍS; MALDONADO CELIS, 2018; DE LA ROSA et al., 2019).

Figura 1 – Ação dos principais antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos



SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione redutase; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada; $O_2^{\bullet-}$: ânion radical superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; $\bullet OH$: radical peroxila; $L\bullet$: radical lipídico; $LOO\bullet$: radical peroxila lipídico; $LOOH$: hidroperóxido lipídico; $LO\bullet$: radical alcóxi lipídico; MDA: malondialdeído; 4HNE: 4-hidroxinonenal; F2-I: F₂-isoprostanos. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo (EO) foi um termo postulado inicialmente por Helmut Sies (1985), como uma perturbação no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante em favor do primeiro. Em outras palavras, o estresse oxidativo é o aumento dos níveis de ERs, em relação à disponibilidade dos antioxidantes (SIES, 1985; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Nessa condição, as células sofrem com danos significativos, os quais podem levar à morte celular. Isso ocorre principalmente devido à oxidação de açúcares, lipídios e proteínas de membrana, além de danos aos ácidos nucleicos (HALLIWELL, 2007). Os danos às biomoléculas oriundos do estresse oxidativo podem estar envolvidos em uma série de doenças, principalmente aquelas desenvolvidas cronicamente, como as neoplasias, *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares, inflamatórias e neurodegenerativas (HALLIWELL, 2007; PIZZINO et al., 2017). Além da morte celular, há uma diversidade de complicações secundárias aos danos oxidativos às biomoléculas, como distúrbios mitocondriais, inibição da síntese de ATP, senescência celular e tecidual, oxidação de grupos sulfidril (-SH), carbonilação de proteínas, peroxidação lipídica,

consumo excessivo de NAD^+ , inibição da bomba de Na^+/K^+ , acúmulo excessivo de Ca^{2+} intracelular, além de alterações mutagênicas ou apoptóticas estimuladas por danos ao DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Os danos gerados pelo EO podem afetar quaisquer células animais, incluindo os neurônios, uma vez que tal processo tem papel central no desenvolvimento de uma série de doenças neurodegenerativas como DP, doença de Huntington, DA e ELA em seres humanos, além da síndrome de disfunção cognitiva (SDC) em cães e gatos (LANDSBERG; NICHOL; ARAUJO, 2012; KIM et al., 2015).

Os neurônios são células com maior vulnerabilidade ao EO. Isso ocorre devido a uma série de fatores, como o alto consumo de oxigênio para atender às suas demandas energéticas, alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas celulares, defesa antioxidante pobre (baixa concentração de antioxidantes junto à uma atividade reduzida de CAT e moderada de SOD e GPx), auto-oxidação de neurotransmissores, além de maior concentração de íons metálicos e ascorbato em neurônios de determinadas regiões do encéfalo, os quais atuam como catalisadores na geração de uma maior quantidade de EROs através das reações de Fenton e Haber-Weiss (REGO; OLIVEIRA, 2003; KIM et al., 2015).

2.3 O PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*) COMO ORGANISMO MODELO EM PESQUISAS

O *Danio rerio*, popularmente conhecido como peixe-zebra, paulistinha ou *zebrafish*, é uma espécie de peixe teleósteo, pertencente à família Cyprinidae, a qual foi inicialmente descrita por Francis Hamilton em 1822 e que se popularizou como um modelo animal para a pesquisa científica durante a década de 1980, através de George Streisinger, pesquisador da Universidade do Oregon (STREISINGER et al., 1981). A espécie proporciona uma série de vantagens em seu uso na pesquisa, como menor custo de manutenção quando comparado aos roedores, rápido ciclo de vida e de crescimento, atingindo a fase adulta aos 90 dias de vida. O peixe-zebra possui um genoma totalmente caracterizado, e homologia/ortologia fisiológica significativa com mamíferos, além de alta prolificidade, a qual proporciona a obtenção de um alto número de animais, seja para seu uso quando adultos ou ainda nas fases de embrião, larva ou de animais juvenis, o que permite a investigação de fenômenos relacionados à neurodegeneração ao longo do seu desenvolvimento (SANTANA; RICO; BURGOS, 2012; BAI; TANG, 2020).

O peixe-zebra apresenta grande sensibilidade a contaminantes ambientais, incluindo metais (pesados), sendo capaz de manifestar respostas tóxicas em diferentes níveis biológicos, como alterações comportamentais, imunológicas, genéticas, reprodutivas, cardiovasculares,

hepáticas e neurotóxicas (BAI; TANG, 2020; LI et al., 2023; ZHAO et al., 2024). As larvas dessa espécie ainda possuem sistemas antioxidantes e vias de resposta ao estresse oxidativo semelhantes aos de outros vertebrados, incluindo humanos, permitindo a avaliação de biomarcadores clássicos como glutatona (GSH/GSSG), enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR), MDA e expressão de genes regulados pela via do fator nuclear derivado de eritrócitos 2 (Nrf2) (SHAW et al., 2019; CHOWDHURY; SAIKIA, 2022; LIU et al., 2022).

Apesar de sua maior simplicidade, o SNC do peixe-zebra apresenta um nível de complexidade suficiente para determinar correlações relevantes com funções observadas no SNC de mamíferos, o que o torna uma opção viável para modelar as trajetórias de desenvolvimento de neurotoxicidade, as quais não são possíveis de serem avaliadas em outros modelos *in vivo* que não apresentam um SNC complexo, como o nematoide *Caenorhabditis elegans* ou o artrópode *Drosophila melanogaster* (SANTANA; RICO; BURGOS, 2012; STEWART; KALUEFF, 2012). A viabilidade decorre da presença de circuitos neuronais evolutivamente preservados, presentes tanto no peixe-zebra quanto em mamíferos, abrangendo, de algum modo, todos os domínios relevantes do SNC encontrados inclusive no de humanos. Também são descritos mecanismos para neurotransmissão comuns aos mamíferos, incluindo a presença dos neurotransmissores histamina, glutamato, dopamina, GABA, serotonina, noradrenalina e ACh (PANULA et al., 2010).

Apesar das características favoráveis ao uso do peixe-zebra como modelo para estudos de neurotoxicidade, ele não substitui o uso de mamíferos na pesquisa farmacológica. Nesse sentido, sua relevância consiste em atuar como um modelo intermediário entre os ensaios *in vitro* e os estudos *in vivo* em mamíferos, permitindo uma triagem mais eficiente de mecanismos de ação previamente evidenciados em pesquisas *in vitro* (STEWART; KALUEFF, 2012).

O uso de larvas de *Danio rerio* apresenta vantagens metodológicas e operacionais. As larvas demonstram elevada sensibilidade fisiológica e rápida resposta a compostos bioativos e tóxicos, o que permite identificar efeitos tóxicos e funcionais em períodos experimentais curtos, sendo capazes inclusive de reproduzir resultados comparáveis aos observados em ensaios com peixes adultos, configurando-se como um modelo eficiente e confiável para análises *in vivo* (XIONG et al., 2022).

2.3.1 Aspectos toxicológicos do alumínio

O Al é um dos metais mais abundantes na natureza, sendo o terceiro elemento químico em maior quantidade na crosta terrestre (compreendendo cerca de 8% desta), ficando atrás somente do oxigênio e do silício (EXLEY, 2013). É comumente encontrado em combinação

com outros elementos como hidróxido, silicato, sulfato e fosfato, sendo utilizado na produção de uma série de produtos, como utensílios domésticos, latas de refrigerante e bebidas em geral, papel-alumínio, medicamentos, vacinas e farinhas (HACHEZ-LEROY, 2013; KAWAHARA; TANAKA; KATO-NEGISHI, 2021). Embora seja abundante, o Al não é essencial à vida, pois não participa de reações biológicas conhecidas e, ao contrário, atua como uma neurotoxina, sendo relacionado ao desenvolvimento de uma série de doenças neurodegenerativas, como a ELA, DP e a própria DA (KAWAHARA; KATO-NEGISHI, 2011; MIMURO et al., 2018; SULAIMAN; WANG; REN, 2020).

Devido à sua elevada carga positiva e pequeno raio iônico, o Al^{3+} , forma ionizada do Al, tem uma baixa capacidade de troca de ligante, o que faz com que apresente uma meia-vida prolongada no organismo. Uma vez internalizado pelos neurônios, é retido e se acumula de forma quase permanente (KAWAHARA; TANAKA; KATO-NEGISHI, 2021). Dessa forma, os níveis de Al no organismo são cruciais na determinação do seu risco à saúde.

A principal fonte de contaminação por Al em mamíferos, em especial os humanos, são os alimentos, embora a maioria contenha concentrações baixas do metal, sendo contabilizado um consumo médio de 2 a 17 mg por dia, podendo aumentar drasticamente caso haja o consumo de alimentos contendo aditivos ricos em Al em sua composição, como pães e bolos, devido à alta presença de Al em fermentos em pó (SCHÄFER; SEIFERT, 2006). Utensílios domésticos contendo Al podem aumentar o consumo diário desse metal em 2 mg (KAWAHARA; TANAKA; KATO-NEGISHI, 2021). O Al é utilizado ainda como coagulante no tratamento de água e apresentará diferentes concentrações de sua forma ionizada dependendo do seu pH, mas no geral em águas neutras apresenta uma concentração de 0,001-0,05 mg/L. Medicamentos com altas concentrações de Al, como antiácidos e analgésicos tamponados, elevam o seu consumo diário em até 5 g/dia (WHO, 2010). Atualmente, a FAO recomenda um limite no consumo semanal total de Al de até 2 mg/Kg de peso corporal (FAO; WHO, 2011).

De toda forma, a biodisponibilidade do Al possui altíssimas variações, de acordo com a forma com que foi consumido, além de variações individuais, idade, pH, conteúdo estomacal entre outros (EDWARDSON et al., 1993). Por esses motivos, geralmente é difícil determinar quanto do total de Al consumido, é de fato absorvido no trato gastrointestinal e transportado através da barreira hematoencefálica (BHE). No entanto, estudos recentes revelam que menos de 1% do Al consumido de forma oral é absorvido (PRIEST et al., 1996). A absorção de Al pode ser aumentada em indivíduos idosos, com síndrome de Down ou DA (KAWAHARA; TANAKA; KATO-NEGISHI, 2021). Após sua absorção, a maior parte do Al (até 80%) se liga

à transferrina, enquanto o restante se liga à albumina e ao citrato, sendo assim transportado aos tecidos (SCHÖNHOLZER et al., 1997). Aproximadamente metade do total de Al absorvido é excretado na urina, enquanto cerca de 50% se depositam nos ossos e uma quantidade muito pequena é transportado junto à transferrina ou citrato através da BHE para e adentrando os neurônios (DAY et al., 1991; KAWAHARA; TANAKA; KATO-NEGISHI, 2021).

O Al^{3+} possui afinidade por doadores de oxigênio carregados negativamente, além de se ligar a fosfatos inorgânicos (Pi), carboxilas e hidroxilas, o que o torna um íon capaz de se ligar a ácidos nucleicos e alterar a expressão de genes codificantes de proteínas estruturais neuronais, citocromo c oxidase mitocondrial, e fator neurotrófico derivado do cérebro (LUKIW et al., 1998; KAWAHARA; TANAKA; KATO-NEGISHI, 2021). Tal íon é ainda capaz de se ligar ao ATP e inibir enzimas do metabolismo energético em neurônios (ZATTA; LAIN; CAGNOLINI, 2000). Estudos ainda sugerem seu efeito de inibição de várias enzimas envolvidas na produção de neurotransmissores, como a catecol-O-metiltransferase, dopamina β -hidroxilase, tirosina hidroxilase, colina acetiltransferase (ChAT), e glutamato descarboxilase, além de aumentar a atividade da AChE e da monoaminoxidase B (MAO-B) – a qual está envolvida na produção de EROs durante sua atividade catalítica (GULYA; RAKONCZAY; KÁSA, 1990; KAWAHARA, 2005; DALLA TORRE et al., 2019).

O Al demonstra uma capacidade notável de afetar o equilíbrio dos neurotransmissores em peixe-zebra, com ênfase na ACh (SENGER et al., 2011; GAO et al., 2022; RADUAN et al., 2023). Isso ocorre devido à interação de seus íons com o sítio aniônico da AChE, resultando em uma mudança na sua conformação. Esse processo desencadeia o aumento da atividade catalítica sobre ACh, o que, por sua vez, leva à redução das neurotransmissões colinérgicas (GULYA; RAKONCZAY; KÁSA, 1990). Estudos também indicam que a exposição do peixe-zebra ao Al reduz seus níveis de catecolaminas e GABA, assim como também provoca um aumento dos níveis de glutamato, fatores que são conhecidos por desempenhar papel crucial no desenvolvimento de disfunções cognitivas (SANTANA; RICO; BURGOS, 2012; ANDERSEN et al., 2021). Os estudos realizados por Gao et al. (2022) e Kaur, Narang e Singh (2022) demonstraram que o modelo de neurotoxicidade induzido pelo $AlCl_3$ resultou em alterações comportamentais consistentes com o desenvolvimento de déficits de memória e aprendizado em peixe-zebra. Mani, Mittal e Katare (2018), juntamente a Raduan et al. (2023) também demonstraram o desenvolvimento de ansiedade em animais induzidos com o mesmo modelo, sendo que tais alterações comportamentais parecem estar associadas ao desequilíbrio de neurotransmissores relacionados à neurodegeneração.

Diferente do observado em humanos, a via branquial é a principal via envolvida na absorção do Al no peixe-zebra (EXLEY; CHAPPELL; BIRCHALL, 1991), a qual varia drasticamente de acordo com o pH do meio. Em águas ácidas, o Al se apresenta predominantemente em sua forma ionizada, Al^{3+} (mais especificamente $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$), a qual é mais absorvível através das brânquias (LE PODER et al., 2022). Após sua absorção, o Al pode levar ao desenvolvimento de estresse oxidativo devido ao aumento da produção de ERs e impacto sobre a atividade de enzimas antioxidantes, o que leva a danos oxidativos às biomoléculas principalmente em tecidos como brânquias, fígado e encéfalo (CAPRIELLO et al., 2022; NAPOLITANO et al., 2023). Além disso, o Al é capaz de induzir apoptose e alterações morfológicas durante o desenvolvimento de embriões de peixe-zebra (CAPRIELLO et al., 2021).

2.4 *Nepeta cataria* L.

A *Nepeta cataria*, popularmente conhecida como erva-gateira ou *catnip*, é uma espécie herbácea do gênero *Nepeta*, pertencente à família Lamiaceae, nativa de algumas regiões da Ásia e Europa. O gênero *Nepeta* é composto por mais de 300 espécies, que na sua maioria, são plantas aromáticas com diversas atividades biológicas já registradas (YILMAZ; BOĞA; TOPÇU, 2016; SHARMA et al., 2021). A *N. cataria* apresenta uma série de usos tradicionais. Há registros do uso de suas folhas jovens e brotos como tempero na França, ou ainda após sua introdução na América do Norte pelos colonos europeus, quando passou a ser utilizada na medicina tradicional de várias tribos indígenas na forma de chás para o tratamento de transtornos respiratórios e gastrointestinais, dores de cabeça, enxaqueca, ou ainda, na forma de folhas secas fumigadas no tratamento de furúnculos, verminoses e reumatismo. Outros relatos demonstram ainda a utilização de suas extremidades floridas e folhas secas como agentes diaforéticos, carminativos, antissépticos e contra dores de dente (SHARMA; NAYIK; CANNOO, 2019; NAGDEV et al., 2022). Estudos recentes demonstram que a espécie apresenta uma ampla gama de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo*, com destaque às atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, citotóxica, antimicrobiana, antioxidante, anti-helmíntica, antidepressiva, hepatoprotetora, estimulante sexual, espasmolítica e larvicida (GILANI et al., 2009; BERNARDI et al., 2010, 2011; BERNARDI MM et al., 2010; ZOMORODIAN et al., 2012a; NAGUIB et al., 2012; PAVARAJ; BAKAVATHIAPPAN; BASKARAN, 2012; EMAMI et al., 2016; FAN et al., 2017; SIMON, 2018; TAN et al., 2019; YANG et al., 2020).

Figura 2 – *Nepeta cataria* em estágio de floração

Fonte: Biodiversity4all - © tmynster alguns direitos reservados (CC BY-NC)

As atividades biológicas da espécie estão relacionadas aos compostos bioativos presentes em estruturas como flores, folhas e caule, com destaque para os compostos das classes dos terpenoides e dos compostos fenólicos (FORMISANO; RIGANO; SENATORE, 2011). A origem do epíteto específico de *N. cataria* tem raízes no latim antigo *Cathus*, que significa gato (IBRAHIM et al., 2022). Essa conexão etimológica explica os nomes populares associados à planta, uma vez que apresenta a atividade de atração sobre os gatos domésticos, o que explica a planta ter ganhado relevância econômica no mercado *pet* nos últimos anos, uma vez que esses animais, ao consumirem pequenas quantidades das estruturas da planta ou inalarem seus compostos voláteis, tendem a apresentar alterações comportamentais, como a manifestação de ações lúdicas, como rolar e esfregar a cabeça e corpo sobre a estruturas da planta ou superfícies contendo o seu aroma, mascar a planta e em alguns casos, vocalizar (ACÍMOVIĆ et al., 2022; IBRAHIM et al., 2022; NADEEM et al., 2022; VUKIĆ et al., 2022). Tais alterações comportamentais têm levado ao uso da *N. cataria* e seus produtos derivados

como atenuadores de estresse e promotores do bem-estar em gatos domésticos (IBRAHIM et al., 2022). Alguns trabalhos já registraram que felinos selvagens também são susceptíveis às alterações comportamentais estimuladas pela *N. cataria*, como leões, tigres, leopardos, leopardos-das-neves, onças-pintadas, onças-pardas, entre outros (MCELVAIN et al., ; TUCKER; TUCKER, 1988). Seja em felinos domésticos ou selvagens, tais sinais são uma resposta às nepetalactonas, monoterpênicos iridóides presentes nas estruturas da *N. cataria* que parecem atuar como moléculas que mimetizam feromônios felinos, pois podem interagir com receptores presentes na mucosa olfatória, apesar de não atuarem sobre receptores do órgão vomeronasal (LICHMAN et al., 2020; BORGES, 2024). Apesar das atividades descritas, as nepetalactonas são oriundas do metabolismo secundário (derivadas do mevalonato) de plantas do gênero *Nepeta* e tem como função primária na planta, atuar como moléculas repelentes contra insetos herbívoros, e não como atratores ou estimuladores felinos, sendo a primeira, uma atividade com eficiência similar ao repelente sintético N,N-dietil-meta-toluamida (DEET), amplamente difundido como um dos principais princípios ativos em formulações comerciais de repelentes (FORMISANO; RIGANO; SENATORE, 2011; LICHMAN et al., 2020; BORGES, 2024).

2.4.1 Atividades biológicas do óleo essencial de *Nepeta cataria* L.

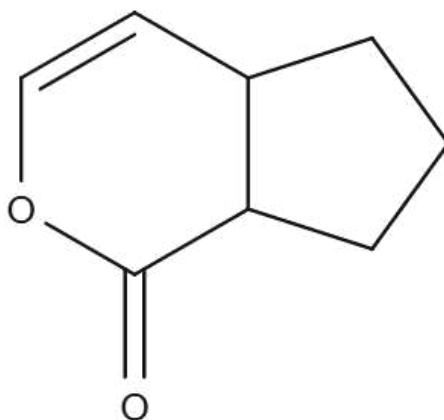
Grande parte das atividades biológicas da *N. cataria* foram relatadas em estudos que avaliaram a bioatividade de seu óleo essencial, com destaque às atividades: antimicrobiana (ADIGUZEL et al., 2009; ZOMORODIAN et al., 2012b, 2013; ASHRAFI, 2019), inseticida/repelente (REICHERT et al., ; AMINI et al., 2019; YANG et al., 2020), antihiperlipêmico (AĆIMOVIĆ et al., 2022), hepatoprotetora (TAN et al., 2019), espasmolítica, broncodilatadora (GILANI et al., 2009), antiparasitária (PRESTI, 2017; CHERAGHIPOUR et al., 2022), anticolinesterásica (SATISH, 2013) e antioxidante (ASHRAFI et al., 2019; MOLLOVA et al., 2023), sendo que a última foi caracterizada através de ensaios *in vitro*, que demonstraram o potencial do óleo essencial em remover radicais sintéticos como o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), além de potencial redutor de ferro (FRAP) e cobre (CUPRAC). Satish (2013) observou que o óleo essencial de *N. cataria* apresentou atividade anticolinesterásica em um modelo que utilizou escopolamina como agente indutor de deficiência cognitiva em ratos. Seu trabalho revelou ainda que o óleo essencial foi capaz de atenuar fenótipos comportamentais

de deficiência cognitiva, o que junto à redução da atividade de AChE revela o potencial neuroprotetor do óleo essencial de *N. cataria*.

2.4.2 Compostos bioativos do óleo essencial de *Nepeta cataria* L.

As nepetalactonas são monoterpenoides iridoides, formadas pela fusão de dois anéis, um ciclopentano e uma lactona (Figura 3), e são componentes majoritários dos óleos essenciais de espécies do gênero *Nepeta*, os quais apresentam atividade antioxidante, antimicrobiana e repelente de insetos (BARANAUSKIENĖ et al., 2019; SHARMA et al., 2021).

Figura 3 - Estrutura geral das nepetalactonas



Fonte: adaptado de Molview.org (2025)

Existem 8 estereoisômeros de nepetalactonas já relatados, sendo que 5 deles já foram isolados desta espécie (4 α ,7 α ,7 α -Nepetalactona, 4 α ,7 α ,7 β -Nepetalactona, 4 α ,7 β ,7 β -Nepetalactona, 4 β ,7 α ,7 α -Nepetalactona, 4 β ,7 α ,7 β -Nepetalactona e 4 α ,7 β ,7 α -Nepetalactona) (FORMISANO; RIGANO; SENATORE, 2011; ZOMORODIAN et al., 2012b). As nepetalactonas são monoterpenos ciclopentanoides. Além das nepetalactonas, conjuntos variados de terpenoides minoritários foram caracterizados em óleos essenciais de *N. cataria*, os quais mesmo presentes em concentrações inferiores às nepetalactonas, podem estar associados à atividades biológicas devido ao reconhecido efeito sobreposto que alguns compostos de óleos essenciais podem apresentar, uma vez que os efeitos terapêuticos dos mesmos são influenciados por interações sinérgicas entre compostos majoritários e minoritários (MA et al., 2025). Dentre tais compostos minoritários já caracterizados, alguns são reconhecidos por sua atividade anticolinesterásica, como o α -pineno, β -pineno, limoneno, pulegona, timol, carvacrol, sabineno, linalool e eucaliptol (MALIZIA; MOLLI; DANIEL, 1996; KIM; JUNG; PARK,

2006; ADIGUZEL et al., 2009; ZOMORODIAN et al., 2012a; MOHAMMADIZAD; MEHRAFARIN; NAGHDI BADI, 2017; ASHRAFI et al., 2019; AZIZIAN et al., 2021; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2021; NADEEM et al., 2022; MOLLOVA et al., 2023). Um estudo ainda revelou que o linalool apresenta atividade de proteção sobre os efeitos neurotóxicos causados pelo AlCl_3 em ratos, além de atividade antioxidante (XU et al., 2017). Outro composto encontrado nos óleos essenciais dessa espécie, o timol apresentou resultados semelhantes quando testado no mesmo modelo (XU et al., 2017; BITMEZ; ÇEVRELI; KAŞIKÇI, 2024). Outros estudos demonstraram que o linalool apresenta atividade de inibição de receptores NMDA e capacidade de reverter a microgliose, astrogliose, tauopatia e amiloidose, determinando assim seu potencial neuroprotetor em modelos de indução de fenótipos de DA (SILVA BRUM et al., 2001; SABOGAL-GUÁQUETA; OSORIO; CARDONA-GÓMEZ, 2016; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2021). Dentre os principais terpenoides minoritários encontrados na composição dos óleos essenciais de *N. cataria* tem-se o óxido de cariofileno, trans-cariofileno e o β -carofileno, sendo os dois últimos associados a atividades neuroprotetoras importantes, como atividade anti-inflamatória em modelos de neurotoxicidade (HU et al., 2017; MACHADO et al., 2018; ZHANG et al., 2022), inclusive em um modelo de toxicidade induzido pelo cádmio (BOLAT et al., 2025). Apesar de alguns estudos mostrarem o efeito isolado de seus componentes na prevenção/proteção da toxicidade causada pelo Al e outros metais, até o momento, não foram encontrados estudos que relacionem o óleo essencial de *N. cataria* a tais atividades.

2.5 MODELOS DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA ALINHADOS AOS PRINCÍPIOS DOS 3R'S

Os princípios dos 3R's (*Replacement, Reduction e Refinement*) constituem abordagens éticas fundamentais para a experimentação animal, as quais buscam pela utilização de modelos alternativos que substituam, reduzam ou aprimorem o uso de animais em pesquisa. Nesse contexto, diversos modelos vêm sendo empregados na avaliação de atividade biológica, com destaque para as abordagens *in silico*, *in vitro* e *in vivo* alternativas, que permitem triagens mais racionais, éticas e eficientes (GORZALCZANY; RODRIGUEZ BASSO, 2021; WANGE; BROWN; DAVIS-BRUNO, 2021).

Entre as ferramentas *in silico*, a técnica de *docking* molecular (conhecidos também como ancoragem ou encaixe molecular) é utilizada com o intuito de prever a orientação preferencial de uma molécula (ligante) ao se ligar a uma macromolécula alvo – geralmente

proteínas -, e estimar a estabilidade dessa ligação. Essa técnica reduz significativamente a necessidade de testes *in vivo* preliminares, contribuindo para a substituição de modelos animais. Junto de outros métodos *in silico*, como QSAR (*Quantitative Structure–Activity Relationship*, Relação Quantitativa entre Estrutura e Atividade) e modelagem ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade), o *docking* fornece dados preditivos quanto a toxicidade e/ou eficácia, permitindo priorizar moléculas promissoras e economizar tempo e recursos, em especial os animais (MENG et al., 2011; THOMAS et al., 2019; GORZALCZANY; RODRIGUEZ BASSO, 2021).

As abordagens *in vitro*, por sua vez, utilizam culturas celulares, organoides e sistemas 3D para reproduzir tecidos e funções fisiológicas específicas. Esses métodos oferecem vantagens como controle experimental, rapidez e menor custo. No entanto, apresentam limitações importantes: ausência de interação entre órgãos, metabolismo sistêmico simplificado e falta de respostas comportamentais e imunes, o que pode restringir a extrapolação dos resultados para organismos complexos (GORZALCZANY; RODRIGUEZ BASSO, 2021; WANGE; BROWN; DAVIS-BRUNO, 2021).

Nesse ponto, modelos *in vivo* alternativos como o peixe-zebra surgem como um opções que superam muitas limitações dos modelos celulares *in vitro*, sem deixar de atender aos princípios éticos dos 3R's. O peixe-zebra apresenta alta homologia/ortologia genética com mamíferos, desenvolvimento embrionário rápido e externo, transparência corporal e facilidade de manipulação genética e farmacológica. Tais características permitem investigar, de forma integrada e com menor custo, parâmetros de toxicidade, farmacocinética, neuroatividade e comportamento que não podem ser adequadamente simulados em modelos *in vitro* (SIEBEL; BONAN; SILVA, 2015)

Apesar de ser um organismo animal, o uso do peixe-zebra contribui para os 3R's, pois promove o *Reduction* ao permitir experimentos de alto rendimento com menor número de animais superiores; e apoia o *Refinement*, já que seus métodos de exposição são menos invasivos, seu manejo é simples e o sofrimento envolvido é reduzido. Assim, o zebrafish representa um modelo intermediário e ético entre as culturas celulares e os testes em mamíferos, conciliando complexidade biológica com responsabilidade científica (WANGE; BROWN; DAVIS-BRUNO, 2021; MACRAE; PETERSON, 2023).

A combinação entre métodos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* alternativos promove uma triagem mais precisa, sustentável e ética, equilibrando tecnologia, eficiência e compromisso com o bem-estar animal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* e o potencial protetor *in vivo* do óleo essencial de *N. cataria* em um modelo de toxicidade aguda induzida por AlCl_3 em larvas peixe-zebra .

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil de terpenoides do óleo essencial de *N. cataria*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *N. cataria*;
- Determinar a toxicidade aguda do óleo essencial de *N. cataria* em larvas de peixe-zebra;
- Avaliar a atividade antioxidante e anticolinesterásica *in vivo* do óleo essencial de *N. cataria* em um modelo de toxicidade aguda induzido pelo AlCl_3 em larvas de peixe-zebra;
- Investigar as interações entre os componentes do óleo essencial de *N. cataria* e a acetilcolinesterase de peixe-zebra através da metodologia *in silico* de *docking* molecular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AQUISIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *N. cataria* (OENC) foi adquirido comercialmente junto à empresa Eden's Garden Essential Oils (San Clemente, CA, EUA), sendo informado pelo fabricante de que a matéria prima do óleo é originária do Canadá. O produto foi obtido através de destilação por arraste a vapor a partir de extremidades floridas da planta, sem realizar diluições posteriores com quaisquer veículos, dessa forma obtendo-se um óleo essencial integral. O óleo foi armazenado em frasco de vidro âmbar, hermeticamente fechado, à temperatura ambiente e protegido da luz até sua utilização nos experimentos.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *N. cataria* L.

A fim de identificar e quantificar os compostos presentes no OENC, foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), em análise realizada no Laboratório Multiusuário de Análise Instrumental (LAMAI) do campus Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CBS/UFSC).

Um volume de 10 µL do OENC foi adicionado a 440 µL de hexano (grau HPLC). Posteriormente, a solução foi introduzida no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas (GCMS, Agilent 7890A), equipado com um injetor automático Combi Pal. Para a separação cromatográfica, foi empregada rampa de temperatura que variou de 40 °C (com 2 min de espera nessa temperatura) até 100 °C, com uma taxa de aumento de temperatura de 5 °C/min, seguido do aumento de temperatura de 100 a 200 °C, à taxa de 8 °C/min, e aumento de 200 a 300 °C com taxa de 12 °C/min. O gás de arraste utilizado foi o hélio, com um fluxo de 1 mL/min, e a relação de divisão (*split*) foi de 25:1. O tempo total de cada análise foi de 36,8 min. As temperaturas do injetor e da interface foram configuradas para 260 °C e 300 °C, respectivamente. O espectrômetro de massas operou a uma energia de 70 eV, realizando a varredura no intervalo de 40 a 400 m/z.

A identificação dos componentes químicos presentes no óleo essencial foi realizada através da comparação entre os espectros de massas, os índices de Kovats experimentais (IK_{exp}) e os índices de Kovats teóricos (IK_{teóricos}) previamente relatados em Adams (2017). Para determinar o IK_{exp}, uma solução contendo uma série de n-alcenos (C7-32, Sigma Aldrich) a uma concentração de 1000 µg/L foi injetada no GCMS sob as mesmas condições utilizadas para as amostras de óleo essencial. O Índice de Kovats experimental foi calculado de acordo com a equação a seguir:

$$IK_{exp} = ((t_{rX} - t_{rN}) / (t_{rN+1} - t_{rN})) + 100 * n$$

Onde: IK_{exp} = Índice de Kovats Experimental;

t_{rX} = tempo de retenção do componente X;

t_{rN} = tempo de retenção do alcano N com t_r anterior ao componente X;

t_{rN+1} = tempo de retenção do alcano N com t_r posterior ao componente X;

n = número de átomos de carbono do alcano N.

4.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *N. cataria*

4.3.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

O método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações foi utilizado para a realização do ensaio de inibição do radical DPPH. Primeiramente, foi realizada a diluição do DPPH em 100 mL de metanol, sendo realizado posteriormente novas diluições a fim de corrigir a absorbância da solução até um valor de $1,1 \pm 0,02$ a 517 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax[®] M2, Molecular Devices LLC, San Jose, CA, EUA). A solução de DPPH (1,9 mL) foi adicionada a 50 μ L de metanol e 50 μ L de diferentes concentrações do OENC. Posteriormente, foi realizada a incubação dos tubos de reação por 24 h à temperatura ambiente, sob proteção da luz e vedação a fim de evitar a perda do volume do meio de reação devido à volatilização do metanol. O controle foi baseado em uma solução de 1,9 mL de DPPH corrigido junto a 100 μ L de metanol, sendo realizado o mesmo processo de incubação das amostras. Após 24 h de incubação, foi realizada a leitura da absorbância em 517 nm contra um branco de metanol em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) de redução da absorbância do radical DPPH. A concentração de óleo essencial efetiva em remover 50% do radical DPPH (CE₅₀) foi avaliada através de análise de regressão utilizando o software GraphPad Prisma e os resultados foram expressos como microlitros do OENC por mililitros (μ L/mL de óleo). O DPPH é um radical livre estável em solução alcoólica, apresentando coloração roxa intensa devido à presença de um elétron desemparelhado. Quando um antioxidante é adicionado, ele doa elétrons ou átomos de hidrogênio ao radical DPPH, o transformando a sua forma não radical de coloração amarela, a qual leva a redução da absorbância registrada à 517 nm. A diminuição da absorbância em 517 nm é proporcional à capacidade de remoção do DPPH.

4.3.2 Potencial redutor de ferro (FRAP)

O método de Benzie e Strain (1996) com modificações foi utilizado para avaliar o FRAP do OENC. Foram preparadas diferentes diluições do óleo essencial (0,08-1,25 mg/mL),

as quais foram adicionadas a uma solução de trabalho contendo 10 mM de 2,4,6 – Tris(2-piridil)-sTriazina (TPTZ), 20 mM de cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 0,3 M tampão acetato (pH 3,6). Na sequência, as amostras foram incubadas a temperatura de 37°C durante 15 min, e a leitura foi avaliada em 593 nm em leitor de microplacas (SpectraMax® M2, Molecular Devices LLC, San Jose, CA, EUA). Os resultados foram determinados utilizando-se uma curva de calibração com sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (3,2 – 64,5 μM).

Inicialmente foram calculadas as concentrações de ferro reduzido por mL de amostra ($\mu\text{mol eq. Fe}^{2+}/\text{mL}$ de amostra) de cada uma das concentrações e avaliado a linearidade das respostas. Tal avaliação buscou determinar a atividade redutora de ferro de OENC dependente da concentração. Ao final, os resultados foram calculados a partir da média aritmética obtida dos valores de ferro reduzido por grama de OENC ($\mu\text{mol eq. Fe}^{2+}/\text{g}$ de OENC) obtidos a partir das diferentes concentrações de óleo testadas. O método de FRAP avalia a capacidade do composto teste em reduzir o íon férrico (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}), o qual se liga ao TPTZ em meio de reação ácido (complexo Fe^{2+} -TPTZ), produzindo uma coloração azul, cujo aumento da absorbância em 593nm indica o nível de atividade redutora de cada concentração avaliada do composto teste.

4.3.3 Capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC)

A capacidade de sequestro do radical peroxila ($\text{ROO}\bullet$) foi medida através da metodologia de Ou, Hampsch-Woodill e Prior (2001), a qual monitora o efeito das amostras sobre a redução da fluorescência de acordo com a oxidação da fluoresceína induzida por $\text{ROO}\bullet$. A reação foi realizada em tampão fosfato 75 mM (pH 7,4) e a mistura final da reação foi de 200 μL . Inicialmente, foi preparado uma solução estoque de 10 mg/mL do OENC em metanol, a qual foi utilizada no preparo de uma solução de trabalho 0,02 mg/mL em tampão fosfato pH 7,4. A solução de trabalho junto a soluções de fluoresceína (FL) (150 μL ; 40 nM) foram colocadas nos poços de uma microplaca e pré-incubadas por 10 min a 37 °C. A solução de 2,2-Azobis(2-metilpropionitrila) (AAPH) (25 μL ; 76 mM) foi adicionada rapidamente após a pré-incubação. A microplaca foi colocada no leitor de microplacas (SpectraMax® iD3 Multi-Mode, Molecular Devices LLC, San Jose, Califórnia, EUA) e a fluorescência foi registrada a cada 60 s a 37 °C por 90 min. Um branco, usando tampão fosfato em vez da solução de extrato e oito soluções de calibração usando Trolox (4-36 μM , concentração final) como antioxidante também foram realizados em cada ensaio. Comprimentos de onda de excitação e emissão de 485 nm e 528 nm, respectivamente, foram usados. Após a subtração do branco, a área sob a

curva (ASC) para a curva padrão e as amostras foram usadas para os cálculos. A capacidade de sequestro de ROO• foi expressa em micromolar equivalente de Trolox por mL de amostra ($\mu\text{M ET} / \text{mL do OENC}$).

4.4 ENSAIOS *in vivo*

Todos os protocolos utilizados para os ensaios *in vivo* descritos nos tópicos a seguir foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC) sob o nº de protocolo 6925201123.

4.4.1 Construção de um sistema de recirculação de água para a manutenção dos animais reprodutores

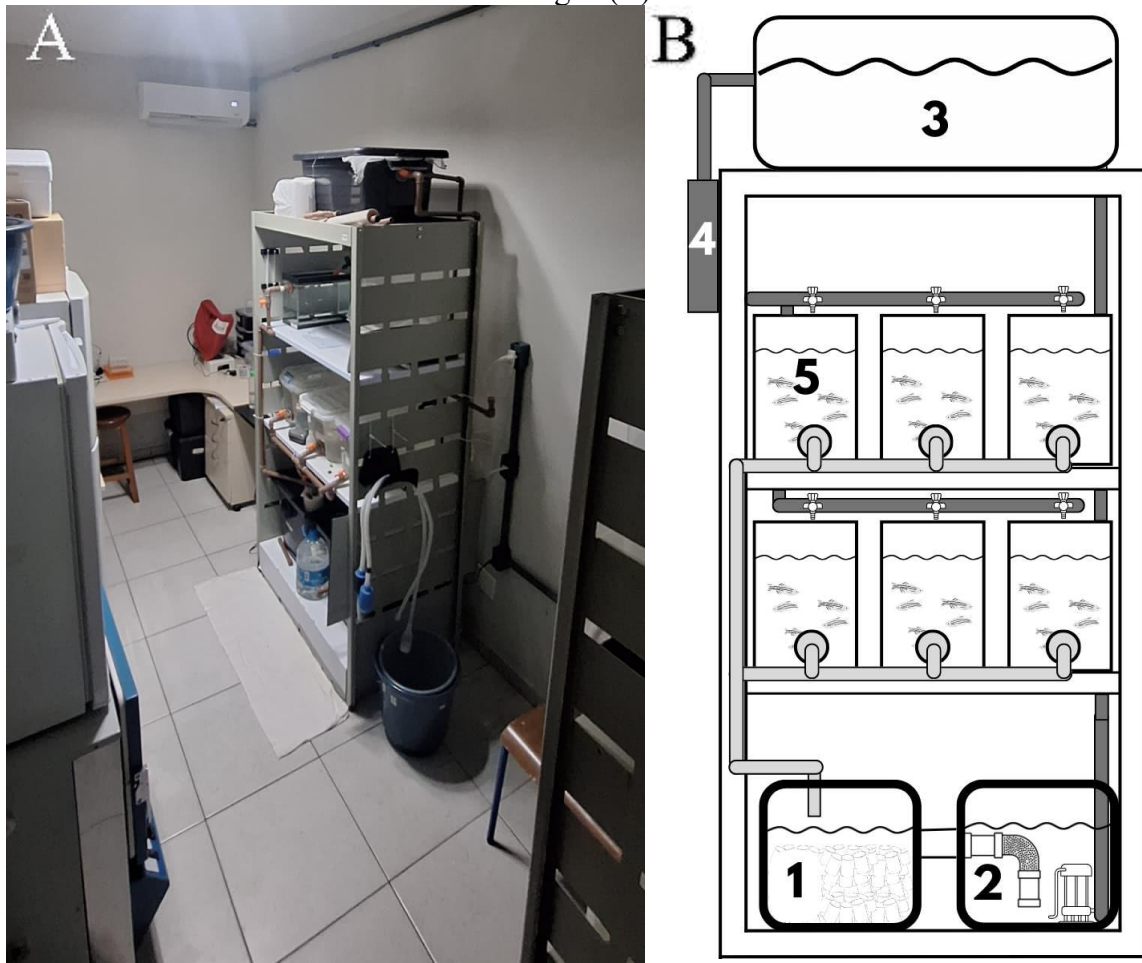
Para a manutenção dos animais reprodutores no Biotério de Peixes do campus de Curitibanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CBS/UFSC) (Figura 4A), foi necessária a construção de um sistema de renovação de água para que os parâmetros de qualidade de água fossem mantidos estáveis ao longo de todo o período experimental, preservando a saúde dos animais utilizados para a obtenção de embriões/larvas para os experimentos descritos nos tópicos a seguir.

Dessa forma foi construída uma estrutura baseada em princípios amplamente empregados em equipamentos comerciais de recirculação de água utilizados em aquicultura e biotérios de pesquisa. Para a montagem, optou-se pela integração de uma série de materiais e equipamentos de aquarismo, os quais visam atender às necessidades de filtragem física, biológica e química, tornando a água adequada aos parâmetros de qualidade preconizados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Um esquema geral do sistema está representado na figura 4B.

Apesar das adaptações, a construção foi fundamentada em parâmetros técnicos descritos na literatura, utilizando como referência o trabalho de Varga (2016), o que assegurou a aderência às boas práticas de manejo e bem-estar animal.

O equipamento não contava com dispositivos de expurgo e reposição automática de água, sendo esses processos realizados manualmente, quando necessário.

Figura 4 – Biotério de peixes (A) e representação esquemática do sistema de recirculação de água (B)



Em A está representada uma vista ampla da infraestrutura do biotério de peixes; em B está representado o sistema de recirculação de água; A água drenada dos aquários por um dispositivo de transbordo chega até o tanque de filtragem física, para a retirada de sujidades em suspensão na água, e filtragem biológica (1) por mídias colonizadas por bactérias nitrificantes. Na sequência, a água passa pelo tanque de filtragem química e tamponamento (2), o qual conta com a presença de carvão ativado, aragonita e uma bomba de recalque que transporta a água até o reservatório (3), onde é mantida, e através de gravidade segue para a etapa de esterilização por filtro ultravioleta (4) até que finalmente retorna aos aquários (5); Em cinza-claro está representada a tubulação de drenagem dos aquários e em cinza-escuro a tubulação de demanda da água filtrada.

4.4.2 Manutenção dos animais reprodutores

Para a realização de todas as avaliações *in vivo*, foram utilizadas larvas de *D. rerio* de linhagem selvagem. Os animais foram obtidos de um fornecedor comercial e transportados até o Biotério de Peixes do CBS/UFSC. Logo após a chegada, os peixes passaram por um processo de quarentena de 16 dias em aquários destinados para esse fim. Ao término da quarentena, os peixes foram mantidos em um sistema de renovação de água localizado no Biotério de Peixes

do CBS/UFSC. A sala foi completamente vedada da entrada de luz exterior, e os peixes foram mantidos em um fotoperíodo de 14/10 h (claro/escuro), temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, em aquários de vidro de 12 L em uma proporção inferior a 5 animais/L, sendo alimentados 2 vezes ao dia com ração em flocos Basic Alcon® em uma taxa de 5% do peso vivo ao dia, além de uma suplementação com náuplios de *Artemia salina* em todos os períodos de alimentação. O sistema de recirculação onde os animais foram mantidos contou com abastecimento de água oriunda de filtro de osmose reversa salinizada com a adição de sal Instant Ocean® em uma concentração de 0,3 g/L. A água de manutenção foi mantida em 1) pH de 7-8; 2) alcalinidade de 100-150 mg CaCO_3/L ; 3) dureza geral de 6-7 dGH°; 4) condutividade de 450-800 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 5) amônia 0 ppm; 6) nitrito 0 ppm; 7) nitrato <5 ppm; 8) oxigênio dissolvido $\approx 7,8$; 9) salinidade de 300-400 ppm. Os aquários permaneceram ligados o tempo todo ao sistema de renovação de água, o qual foi essencial para a manutenção dos parâmetros de qualidade da água dentro dos limites descritos.

4.4.3 Reprodução e coleta dos embriões

A obtenção dos embriões que foram utilizados nas avaliações de toxicidade aguda do OENC e de seu potencial bioativo *in vivo* foi realizada de acordo com a metodologia descrita na diretriz nº236 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) com adaptações para o tempo de exposição previsto no modelo de neurotoxicidade induzido pelo AI (OCDE, 2013; Wenhai Huang et al., 2016).

Os animais adultos destinados à reprodução foram transferidos a criadeiras (tanques para reprodução) 12h antes (às 20h) do acender das luzes do biotério no dia seguinte (às 08h). Os animais foram transferidos às criadeiras em uma proporção de 2:1 (macho:fêmea). No dia seguinte, às 08h, as luzes do biotério se acendiam e os animais ficavam livres para realizar o processo de cópula (cortejo, oviposição e fertilização) até as 9h30. Após esse período, os animais foram retirados das criadeiras e transferidos novamente aos aquários de manutenção dos animais destinados à reprodução, enquanto as criadeiras foram filtradas com o auxílio de peneiras ($< 500\text{ }\mu\text{m}$) para a retenção dos embriões/ovos, sendo realizada de forma imediata repetidas lavagens do filtro de maneira gentil com o uso de pipetas e água de manutenção (0,3g/L de Instant Ocean e pH 7,2) sobre placas de Petri. Após a coleta de todos os embriões/ovos, foi realizada uma nova lavagem dos mesmos em água de manutenção, seguida da seleção dos embriões de acordo com sua viabilidade, sendo descartados os ovos que se apresentavam coagulados (não fecundados). Os embriões viáveis foram transferidos a placas de

Petri (máximo de 30 embriões por placa), as quais foram mantidas em local reservado da sala sob fotoperíodo artificial (14h:10h) e temperatura ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) controlados, onde permaneceram até completarem 72 h pós-fertilização (72 hpf) quando então foram utilizados para a realização dos experimentos relatados a seguir.

4.4.4 Avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de *N. cataria*

A fim de encontrar a máxima concentração do OENC tolerada pelas larvas, foi realizada a avaliação da toxicidade aguda do OENC sobre as larvas de peixe-zebra. Foi utilizada a diretriz nº 236 da (OCDE) com modificações para atender ao período de exposição previsto pelo modelo de neurotoxicidade induzido pelo AlCl_3 . (OCDE, 2013; Wenhai Huang et al., 2016). A coleta e incubação dos embriões/larvas foi realizada de acordo com a metodologia descrita na seção anterior e às 72 hpf as larvas foram selecionadas quanto a sua viabilidade (somente larvas eclodidas, sem alterações morfológicas e nado normal) e adicionadas a placas de 96 poços (1 animal/poço), sendo divididas em 8 grupos experimentais:

- OENC 3,125 a 50mg/L: 5 grupos expostos às concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25; e 50 mg/L do OENC;
- Controle: Controle negativo, onde os ovos foram expostos à água de manutenção;
- Controle do Veículo: Controle do veículo de dimetilsulfóxido (DMSO) com concentração final igual a 0,5%;

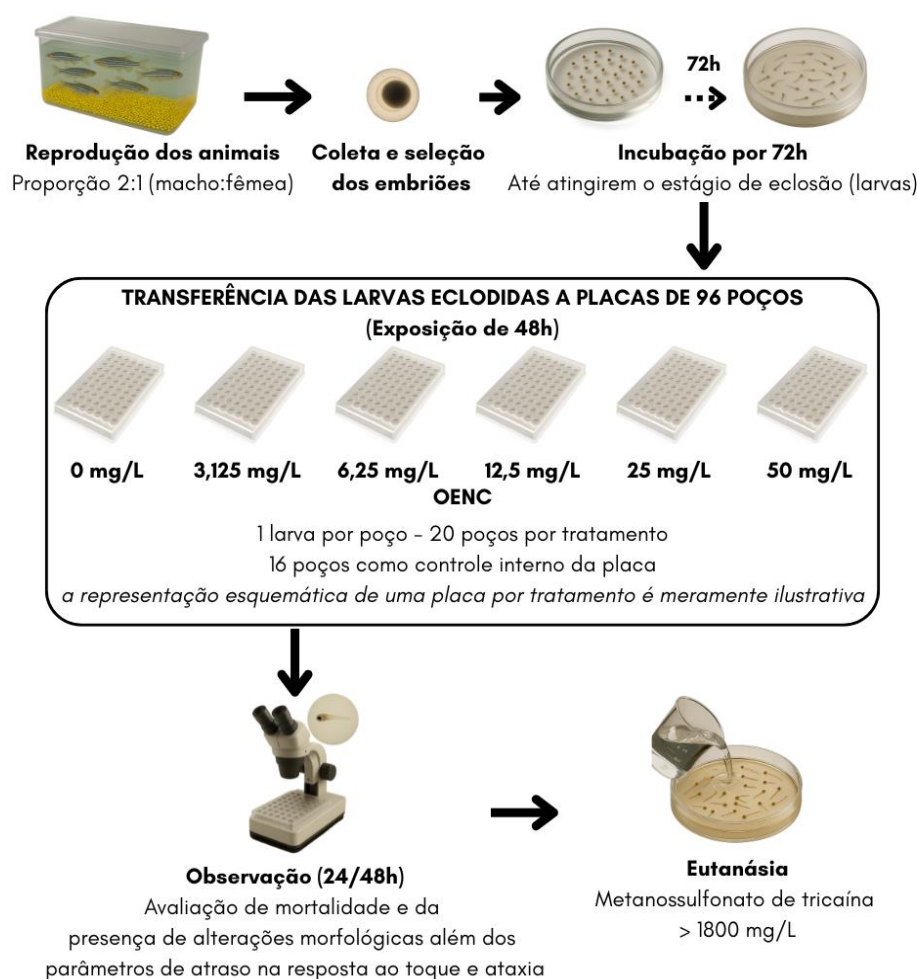
As placas foram divididas entre 4 tratamentos. Cada tratamento contou com um total de 20 poços, além de 16 poços que receberam somente água de manutenção (controle interno da placa). Os animais então foram expostos durante 48 h aos respectivos tratamentos em um local reservado da sala sob condições de qualidade de água iguais a do sistema de manutenção dos reprodutores, temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ e um fotoperíodo de 14:10h (claro:escuro). Com o auxílio de um estereomicroscópio, foram realizadas observações a cada 24 h, sendo avaliados os parâmetros de ausência de batimentos cardíacos (morte), ausência de movimentação, ataxia, atraso na resposta ao toque de uma ponteira para micropipeta de 200 μL e demais anomalias do desenvolvimento, como edema de pericárdio ou saco vitelínico e incidência de deformidades vertebrais (lordose, cifose, escoliose). Ao final da exposição, os animais foram eutanasiados e as taxas de cada um dos parâmetros avaliados calculadas.

Foram calculadas as frequências de cada parâmetro dentro de cada grupo, sendo realizada a comparação das frequências posteriormente a partir do teste de Fisher generalizado ($n=20$). A partir daí, foi possível determinar as diferenças significativas entre os tratamentos para cada um

dos parâmetros, o que permitiu a determinação da concentração máxima do OENC que não levou ao aparecimento de efeitos adversos, sendo essa a concentração utilizada nos ensaios para a determinação do potencial protetor do OENC em um modelo de toxicidade por AlCl_3 em larvas de peixe-zebra. Ao final da exposição, os animais foram eutanasiados a partir de sua imersão em uma solução contendo $>1.800 \text{ mg/L}$ de metanossulfonato de tricaína (MS-222) tamponada (pH 7) onde permaneceram por um período mínimo de 20 min após a cessação de quaisquer movimentos, seguido da transferência dos mesmos para uma placa de Petri, onde foram expostos a uma solução $>1\%$ de NaClO (CONCEA, 2018).

A figura 5 apresenta uma representação gráfica do fluxo das atividades realizadas na avaliação da toxicidade aguda do OENC.

Figura 5 - Fluxo de atividades para a avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de *N. cataria*



4.4.5 Avaliação do potencial protetor do óleo essencial de *N. cataria* em um modelo de toxicidade por AlCl_3 em larvas de *D. rerio*

Após a determinação de uma concentração segura do OENC, foi possível realizar o ensaio para avaliação do potencial protetor do OENC em um modelo de toxicidade por AlCl_3 em larvas de *D. rerio*. Para isso, após novas rodadas de reprodução, embriões coletados das criadeiras passaram por um processo de lavagem com água do sistema de manutenção e na sequência adicionados a placas de Petri onde foram mantidos durante 72 h com a utilização de água do sistema de manutenção, além de um fotoperíodo 14:10h (claro:escuro) e temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ controlados. Às 72 hpf as larvas foram selecionadas quanto a sua viabilidade (somente larvas eclodidas, sem alterações morfológicas e nado normal) e adicionadas a placas de 96 poços (1 animal/poço), sendo divididos em 4 grupos experimentais:

- **Controle:** receberam uma solução de DMSO na mesma concentração utilizada nos grupos que receberam o OENC (0,05%) preparada em água do sistema de manutenção;
- **150 μM AlCl_3 : controle do modelo,** o qual foi induzido o modelo de neurotoxicidade a partir do tratamento em solução de 150 μM de AlCl_3 preparada em água do sistema de manutenção (Wenhai Huang et al., 2016);
- **6,25 mg/L OENC: controle do óleo essencial,** que foi tratado somente com uma solução contendo o OENC de acordo com a concentração determinada pela avaliação da sua toxicidade aguda;
- **150 μM AlCl_3 + 6,25 mg/L OENC:** Larvas induzidas a desenvolver o modelo de neurotoxicidade, que receberam simultaneamente solução contendo 150 μM de cloreto de AlCl_3 e 6,25 mg/L do óleo de *N. cataria*, dissolvidos em DMSO (0,05%).

Seguindo a metodologia do trabalho de Chen et al. (2022) e Wenhai Huang et al. (2016) com breves modificações, os grupos 150 μM AlCl_3 e 150 μM AlCl_3 + 6,25 mg/L OENC foram tratados com uma solução contendo 150 μM de AlCl_3 , a qual foi considerada segura e capaz de induzir o desenvolvimento de sinais de neurotoxicidade (CHEN et al., 2022; Wenhai Huang et al., 2016).

Os animais foram então expostos por 48 h a cada um dos tratamentos descritos. A fim de verificar qualquer inconformidade no andamento do procedimento de exposição, com o auxílio de um estereomicroscópio, foram realizadas observações dos animais a cada 24 h, sendo avaliados os parâmetros de ausência de batimentos cardíacos (morte), ausência de movimentação, ataxia, atraso na resposta ao toque de uma ponteira para micropipeta de 200 μL

e demais anomalias do desenvolvimento. Ao final das 48 h de exposição os animais foram coletados para a realização de avaliações bioquímicas, moleculares e comportamentais. O tópico a seguir trata do processo de coleta e preparo de amostras para cada uma das avaliações.

4.4.5.1 Delineamento experimental

Ao todo, 1.300 larvas de peixe-zebra foram submetidas a este protocolo experimental. O protocolo experimental foi dividido em quatro momentos (Figura 6):

1º) Exposições para a coleta de material para as análises de parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo e da atividade de AChE: Os animais foram expostos aos tratamentos por 48 h, e ao final do período de exposição foi coletado o material para a realização da avaliação dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo: níveis de tióis não-proteicos (NPSH); substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); atividade de CAT; além da atividade de AChE e quantificação de ACh, sendo utilizado 40 animais por tratamento (4 tratamentos) a cada repetição. Foram realizadas três repetições (n=3) para a avaliação dos níveis de TBARS e NPSH e quatro repetições (n=4) para a avaliação da atividade de CAT e AChE. O total de 40 animais representa o número de animais que foram necessários para a formação de um *pool* suficiente para a avaliação dos parâmetros bioquímicos. O número de larvas necessárias para a formação de um *pool* foi baseado nos registros de nosso grupo de pesquisa em avaliações anteriores de trabalhos ainda não publicados. Ao final das 48 h de exposição, os animais foram eutanasiados, sendo realizada a coleta de amostras para a realização das análises e parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo, da atividade de AChE e quantificação de ACh. Os animais foram eutanasiados a partir de sua imersão em uma solução contendo 1 parte de água para 5 de gelo e temperatura de 2 a 4 °C por um período mínimo de 30 min após a cessação de quaisquer movimentos (CONCEA, 2018). Após eutanasiados os animais foram utilizados no preparo das amostras para as avaliações bioquímicas, conforme descrito no tópico 4.4.5.2.

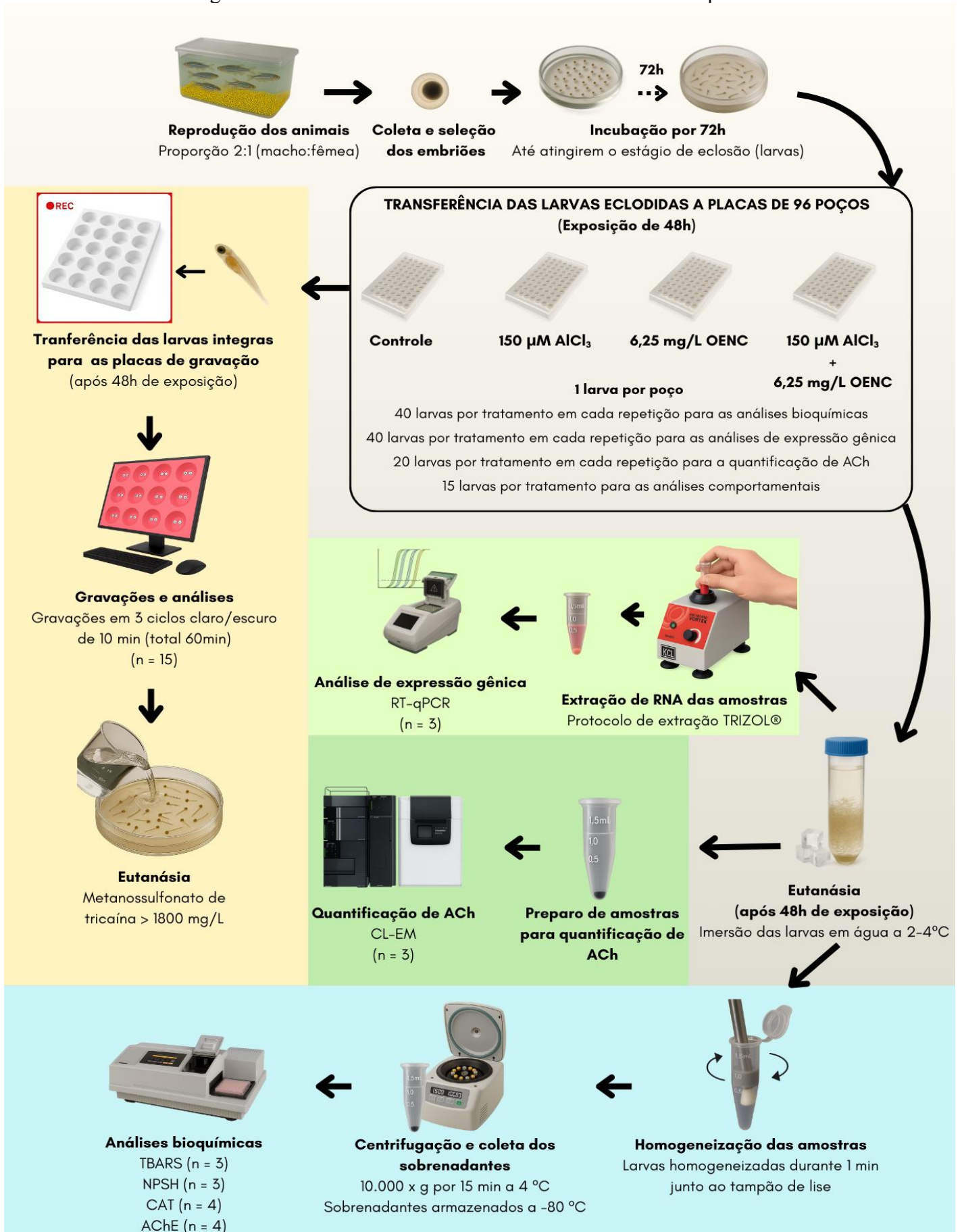
2º) Exposições para obtenção de amostras para a avaliação de expressão gênica: Os animais foram expostos aos tratamentos por 48 h, e ao final do período de exposição foi coletado o material para a realização da extração de RNA e preparo das amostras para as análises de expressão gênica. Foram utilizados 40 animais por tratamento (4 tratamentos) a cada repetição (n=3). O tamanho amostral n=3 é baseado em publicações, as quais realizaram avaliações similares às apresentadas no presente trabalho (RODRÍGUEZ-FUENTES et al.,

2015; CAPRIELLO et al., 2021). O total de 40 animais representa o número necessário para a formação de um *pool* suficiente para se atingir um total de RNA extraído suficiente para a realização das análises de expressão gênica. Logo após o final do período de exposição, os animais foram eutanasiados a partir de sua imersão em uma solução contendo 1 parte de água para 5 de gelo e temperatura de 2 a 4 °C por um período mínimo de 30 min após a cessação de quaisquer movimentos (CONCEA, 2018). Após eutanasiados, os animais foram utilizados no preparo das amostras para as análises de expressão gênica, conforme descrito no tópico 4.4.5.8.

3º) Exposições para a quantificação de ACh: Os animais foram expostos aos tratamentos por 48 h, e ao final do período de exposição foi coletado o material para a realização da quantificação dos níveis de ACh, sendo utilizado 40 animais por tratamento (4 tratamentos) a cada repetição (n=3). Ao final das 48 h de exposição, os animais foram eutanasiados a partir de sua imersão em uma solução contendo 1 parte de água para 5 de gelo e temperatura de 2 a 4 °C por um período mínimo de 30 min após a cessação de quaisquer movimentos (CONCEA, 2018). Os animais eutanasiados foram transferidos para microtubos. Com o auxílio de micropipetas o volume residual de água nos microtubos foi removido e os mesmos encaminhados para *ultrafreezer*, onde permaneceram armazenados a -80 °C até o preparo das amostras para a quantificação de ACh.

4º) Exposições para a realização de avaliações comportamentais: Os animais foram expostos aos tratamentos por 48 h, e ao final do período de exposição foram coletados e lavados em água de manutenção em placas de Petri. Os animais foram então transferidos individualmente para uma placa de avaliação comportamental de 24 poços onde então foram submetidos ao protocolo descrito no tópico 4.4.5.11. Para a realização de avaliações comportamentais, foram utilizados 15 animais (cada animal equivalendo a n=1) por grupo experimental. O tamanho amostral se baseia em trabalhos similares (MARCON et al., 2016; SUN et al., 2022). Ao final da avaliação, os animais foram eutanasiados através de imersão em solução >1.800 mg/L de MS-222.

Figura 6 - Fluxo de atividades descritas no delineamento experimental



4.4.5.2 Preparo das amostras para as análises dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo e da atividade de AChE

Para a realização dos ensaios de determinação de biomarcadores de estresse oxidativo e atividade da AChE, após eutanasiadas, as larvas foram transferidas para microtubos contendo 10 µL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5mM EDTA e 1% Triton X-100, pH 7,4 a 4 °C) para cada larva. Na sequência, foi realizada a homogeneização (1 min por amostra em homogeneizador de tecidos de Potter) e centrifugação (4 °C, 15 min, 10.000 x g) do material de cada tubo, seguida da coleta do sobrenadante que foi armazenado a -80 °C até a realização dos ensaios posteriores (OLIVEIRA et al., 2009).

4.4.5.3 Quantificação de proteína nas amostras

A quantificação da concentração de proteínas presente nas amostras de larvas coletadas para as análises bioquímicas foi realizada através do método espectrofotométrico de Bradford (1976) com as adaptações realizadas no trabalho de Sachett et al. (2020). Foi adicionado 10 µL de diferentes diluições das amostras em tampão salino fosfato (PBS) (0,01 M, pH 7,4) a 190 µL do reagente de Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,12 mM, 10% ácido ortofosfórico e 5% etanol absoluto). A leitura espectrofotométrica das reações foi avaliada em 593 nm em leitor de microplacas (SpectraMax® M2, Molecular Devices LLC, San Jose, CA, EUA). A quantidade de proteína presente nas amostras foi calculada através de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA). O corante Coomassie Brilliant Blue G-250 presente no reagente de Bradford utilizado nesse método é um composto orgânico que conta com a presença de anéis aromáticos e uma série de grupos funcionais, os quais interagem com os resíduos de aminoácidos básicos e grupos aromáticos das proteínas, levando a alterações eletrônicas em sua estrutura, que por sua vez passa a apresentar a coloração azulada, a qual tem um pico de absorbância em 595 nm e pode ser lida através de espectrofotometria. Dessa forma, a intensidade da coloração azul, e consequentemente de sua absorbância, é proporcional à concentração de proteína presente nas amostras.

4.4.5.4 Avaliação da atividade da acetilcolinesterase

Para avaliar a atividade de AChE presente nos homogenatos foi utilizado o método espectrofotométrico descrito por Ellman et al. (1961) e adaptado por Gravato et al. (2021), o qual determina a taxa de hidrólise do iodeto de ACh em uma solução com volume final de 300 µL, contendo 0,4 mM de iodeto de acetiltiocolina e 0,1 mM de 5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) em tampão fosfato de potássio (TFK) 0,1 M, pH 7,2, sendo adicionado um volume do homogenato de larvas equivalente a 5 µg de proteína, determinado anteriormente pelo método de Bradford (1976). As absorbâncias das reações foram registradas a 412 nm em leitor de microplacas ao longo de 3 min (leituras a cada 15 s). A atividade de AChE de cada amostra foi calculada em µg de tiocolina (TCh)/min/mg de proteína através da seguinte equação:

$$\text{Atividade de AChE} = \frac{(\Delta \text{Abs das amostras} - \Delta \text{Abs do branco}) * \left(\frac{V_t}{V_a}\right)}{\text{prot} * \epsilon * d}$$

Onde:

- $\Delta \text{Abs das amostras}$ = variação da absorbância das amostras por min durante o período de leitura (intervalos de 1 min);
- $\Delta \text{Abs do branco}$ = variação da absorbância do branco por min durante o período de leitura (intervalos de 1 min);
- V_t = volume total no poço (300 µL);
- V_a = volume das amostras;
- Prot = concentração de proteína das amostras em mg/mL;
- ϵ = coeficiente de extinção molar do TNB ($13.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);
- d = comprimento do caminho óptico (aprox. 0,9 cm);

O método descrito avalia a atividade da AChE, a partir da mensuração da sua atividade de hidrólise do acetato de acetiltiocolina em acetato e TCh. Ao ser liberada, a TCh reage com o DTNB presente no meio de reação formando um composto de coloração amarela conhecido como ácido 2-nitro-5-tiolbenzoico (TNB^-), o qual pode ser quantificado espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 412 nm. Dessa forma, o aumento da intensidade da cor amarela, e consequentemente da absorbância, ao longo do tempo é proporcional à quantidade de TCh liberada nesse período, o que por sua vez permite avaliar a atividade de AChE (ELLMAN et al., 1961).

4.4.5.5 *Quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico*

Para a determinação dos produtos da peroxidação lipídica, em especial o MDA, foi utilizado o método de Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) para quantificação de TBARS, juntamente com as modificações realizadas no trabalho de Sachett et al. (2020b). O volume de amostra correspondente a 30 µg de proteína foi adicionado aos microtubos de reação junto a 150 µL de uma solução contendo ácido tricloroacético (TCA) a 20% e ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,5%. (volume final de 250 µL). Os tubos de reação foram incubados a 100 °C durante 30 min e na sequência a absorbância das amostras foi lida a 532 nm em leitor de microplacas (SpectraMax® M2, Molecular Devices LLC, San Jose, CA, EUA). As concentrações de TBARS foram calculadas a partir de uma curva padrão de 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (TPP), um precursor estável do MDA, e os resultados foram expressos como nM equivalente de TPP por mg de proteína (nM eq. TPP/mg de proteína). O MDA é um dos produtos da peroxidação de lipídios, o qual reage com TBA em condições ácidas e de alta temperatura, quando então ocorre a formação de um complexo MDA-TBA, que apresenta coloração rosada e pode ser quantificado através de espectrofotometria em um pico de absorbância de 532 nm (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

4.4.5.6 *Quantificação do teor de tióis não-proteicos*

O método de Ellman (1959) modificado por Sachett et al. (2020c) e com breves alterações feitas pelo autor foi utilizado para a determinação dos níveis de NPSH nas amostras. O volume de amostras correspondente a 50 µg de proteína passou por um processo de desproteinização a partir da adição de TCA 6% em uma taxa de 1,5 µL para cada 1 µg de proteína, seguido de centrifugação (4 °C, 10 min, 10.000 x g). O sobrenadante obtido foi adicionado junto a TFK (1 M, pH 7) em um volume final de 245 µL (amostra controle recebeu somente TFK) e na sequência foi realizado o registro da absorbância das amostras a 412 nm em um leitor de microplacas (SpectraMax® M2, Molecular Devices LLC, San Jose, CA, EUA). Em seguida, foi adicionado ao meio de reação 15 µL de DTNB 10 mM e as amostras foram incubadas a temperatura ambiente e em local abrigado da luz durante 1 h, quando então foi realizada nova leitura das absorbâncias a 412 nm. A concentração de NPSH foi calculada como µmol de SH/mg de proteína a partir da seguinte equação:

$$[] \text{ de NPSH} = \frac{\left\{ \left[\frac{(\Delta \text{amostras} - \Delta \text{controle}) * 0,00021}{14,15 * 0,67} \right] * 1000000 \right\} * 1000}{\text{Prot}}$$

Onde:

- $\Delta \text{amostras}$ = (média da absorbância das amostras pós-incubação – média da absorbância das amostras pré-incubação);
- $\Delta \text{controle}$ = (média da absorbância dos controles pós-incubação – média da absorbância dos controles pré-incubação);
- Prot = total de proteína utilizado;

A quantificação de NPSH é possível graças à reação do DTNB com os -SH presentes nas amostras desproteinizadas, o que resulta na formação do TNB^- , o qual possui uma coloração amarelada que permite sua quantificação através de espectrofotometria em um comprimento de onda de 412 nm. Dessa forma, o aumento da intensidade da cor amarela, e consequentemente da absorbância é proporcional à quantidade de TNB^- formado, o que por sua vez é equivalente à quantidade de NPSH nas amostras (ELLMAN, 1959).

4.4.5.7 Determinação da atividade da catalase

A atividade de CAT foi mensurada através do método espectrofotométrico de Aebi (1984) modificado por Domingues e Gravato (2018). O volume de amostras equivalente a 30 μg de proteína foi adicionado em triplicata aos poços de uma microplaca de 96 poços de meio-volume para leitura ultravioleta (UV), junto a TFK (0,05 M, pH 7) em quantidade suficiente para um volume de 75 μL (o branco da reação recebeu somente 75 μL de TFK) e na sequência foi adicionado 75 μL de uma solução de 15 mM de H_2O_2 (em TFK 0,05 M, pH 7), preparada no dia. As absorbâncias foram lidas imediatamente após a adição do H_2O_2 aos poços, sendo realizadas leituras à 240 nm a cada 20 s durante 3 min em um leitor de microplacas (SpectraMax® M2, Molecular Devices LLC, San Jose, CA, EUA). A atividade de CAT de cada amostra foi calculada em μmol de H_2O_2 decomposto por min por mg de proteína ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) através da seguinte equação:

$$\frac{(\Delta \text{ABS amostras} - \Delta \text{ABS branco}) * \left(\frac{V_t}{V_a}\right)}{\text{Prot} *}$$

Onde:

- $\Delta \text{ABS amostras}$ = variação da absorbância das amostras por min durante o período de leitura (intervalos de 20 s);

- ΔABS branco = variação da absorbância do branco por min durante o período de leitura (intervalos de 20 s);
- V_t = volume total no poço (150 μL);
- V_a = volume das amostras;
- Prot = concentração de proteína das amostras em mg/mL;
- ϵ = coeficiente de extinção molar do TNB^- ($0,04 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$);
- d = comprimento do caminho óptico (aprox. 1 cm);

4.4.5.8 *Preparo das amostras para análise da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo*

Após eutanasiadas, as larvas foram transferidas a microtubos de 1,5mL junto a 1 mL de Trizol[®] (Invitrogen, EUA) e procedeu-se o processo de extração de acordo com a metodologia do fabricante. Após a retirada do excedente de água dos microtubos contendo as amostras, foi adicionado 1 mL de Trizol ao mesmo. As amostras foram agitadas em um agitador de tubos até se observar a homogeneização máxima aparente do material. Na sequência, adicionou-se à solução 200 μL de clorofórmio e as mesmas foram agitadas por 15 s e incubadas por 2 min a temperatura ambiente na sequência. A partir daí as amostras foram centrifugadas (4 °C, 15 min, 12.000 x g) e a fase aquosa contendo o RNA foi coletada e transferida para um novo tubo, o qual foi adicionado com 500 μL de álcool isopropílico. O material foi então agitado e incubado por 10 min em temperatura ambiente, seguido de centrifugação (4 °C, 10 min, 12.000 x g). O sobrenadante obtido do processo foi removido e o *pellet* obtido foi adicionado de 1 mL de etanol 75%, agitado e centrifugado (4 °C, 5 min, 7.500 x g). O sobrenadante foi removido, e o microtubo contendo a amostra foi seco em temperatura ambiente. O *pellet* de RNA obtido ao fim do processo foi dissolvido em 30 μL de água livre de nucleases (NanoVue plus[®], GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA). O RNA extraído foi quantificado por leitura espectrofotométrica (NanoVue plus[®], GE Healthcare, Piscataway, NJ, EUA) e a pureza das amostras foi avaliada através da razão 260/280 nm e 260/230 nm obtida.

4.4.5.9 *Análise da expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo*

As amostras coletadas foram avaliadas quanto à expressão de genes relacionados às defesas antioxidantes, através da utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase

quantitativa com transcrição reversa (RT-qPCR). Anteriormente à realização da análise em RT-qPCR propriamente dita, foi realizado o tratamento das amostras de RNA com um conjunto de DNase (DNase I, Invitrogen™, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante, seguido da síntese de DNA complementar (cDNA) através de transcrição reversa utilizando o conjunto de transcrição GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers (Promega Co., EUA), obedecendo as instruções do fabricante.

Para a síntese da primeira fita de cDNA, inicialmente foram preparados 10 µl da mistura de reação de transcrição reversa, contendo 4 µl de água livre de nucleases, 4 µl de GoScript™ Reaction Buffer contendo oligonucleotídeos iniciadores aleatórios e 2 µl de GoScript™ Enzyme Mix, totalizando 10 µl. Cada reação foi composta pela combinação de 10 µl do GoScript™ Reverse Transcription Mix com até 10 µl de amostra contendo RNA, completando-se para um volume final de 20 µl com água livre de nucleases. As reações foram incubadas em termociclador programável (Veriti® 96-well Thermal Cycler, Life Technologies, Singapura), seguindo as etapas: anelamento do primer a 25 °C por 5 min; extensão a 42 °C por 60 min; e inativação da enzima a 70 °C por 15 min. Ao término, os tubos foram mantidos a -80 °C até a realização das análises.

As amostras contendo cDNA foram diluídas junto a 50 µL de água livre de nuclease e na sequência foi utilizada nas reações de RT-qPCR, por meio do conjunto GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Co., EUA), junto aos oligonucleotídeos iniciadores específicos de cada gene de interesse, descritos na Tabela 1. As reações foram conduzidas em um instrumento para a realização de qPCR (Stratagene™ Mx3005P, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante do conjunto, utilizando os seguintes parâmetros térmicos: 1) 1 ciclo para ativação da Taq DNA polimerase a 95 °C durante 2 min; 2) 40 ciclos de extensão (95 °C por 15 s), anelamento e extensão (60 °C por 1 min); 3) curva de dissociação (60-95 °C ao longo de 30 min). As amostras foram processadas em triplicata e os resultados da expressão gênica foram expressos relativamente ao controle e calculados em relação gene de constitutivo Tubulina Alfa I (*tuba*) e foram normalizados através do método de $2^{-(\Delta\Delta CT)}$.

Tabela 1- Genes utilizados para a análise de expressão gênica e seus respectivos oligonucleotídeos iniciadores

Gene alvo	Oligonucleotídeo iniciador senso (S) e antissenso (AS)
Tubulina alfa I (<i>tuba</i>)	S: TTTGTGCACTGGTACGTGGG AS: CCACACTCTCAGCTCCAACCTC
Glutathiona-S-transferase (<i>gst</i>)	S: ACAACCTGTTTCGATCTCCTGCTGA AS: GTTGCCGTTGATGGGCAGTTTCTT
Superóxido dismutase (<i>sod2</i>)	S: CGCATGTTCCCAGACATCTA AS: GAGCGGAAGATTGAGGATTG
Catalase (<i>cat</i>)	S: AGTGCTCCTGACGTCCAGCCA AS: TGAAGAACGTGCGCACCTGGG
Glutathiona peroxidase (<i>gpx4b</i>)	S: GGACGATCCAAGCGTGGTGGA AS: CAGCCGTCACACGTCTGGGC
Proteína desacopladora 2 (<i>ucp-2</i>)	S: TGGCTCAACCCACTGATGTA AS: CAATGGTCCGATATGCGTC
Heme oxigenase 1 (<i>ho-1</i>)	S: GGAAGAGCTGGACAGAAACG AS: CGAAGAAGTGCTCCAAGTCC
Linfoma de células B 2 (<i>bcl2</i>)	S: AGGAAAATGGAGGTTGGGATG AS: TGTTAGGTATGAAAACGGGTGGA
Proteína tumoral 53 (<i>tp53</i>)	S: CCCAGGTGGTGGCTCTTGCT AS: GAGTGGATGGCTGAGGCTGTTCT
Fator nuclear eritroide 2 (<i>nrf2</i>)	S: GACAAAATCGGCGACAAAAT AS: TTAGGCCATGTCCACACGTA

4.4.5.10 Quantificação dos níveis de acetilcolina

A quantificação dos níveis de ACh nas larvas de peixe-zebra foi realizada através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM). *Pools* de 20 larvas de peixe-zebra (referente a cada tratamento) foram submetidos a um processo de extração da ACh por desproteinização (precipitação de proteínas). As amostras biológicas foram tratadas com 500 µL de acetonitrila grau HPLC previamente resfriada a -20 °C e mantidas em gelo (aprox. 4 °C) por 5 min. Em seguida, foram centrifugadas a 14.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado, adicionado de 500 µL adicionais de acetonitrila resfriada e

novamente centrifugado nas mesmas condições. Após esta etapa, as amostras foram filtradas em filtros de seringa de PVDF (0,22 μm) e transferidas para *vials* apropriados para análise por CL-EM.

As análises foram conduzidas em um sistema ACQUITY™ UPLC™ I-Class Plus (Waters™, Milford, MA, EUA), equipado com pré-coluna ACQUITY™ UPLC™ BEH Amide VanGuard (2,1 $\times$ 5 mm, 1,7 μm) acoplada à coluna analítica ACQUITY™ UPLC™ BEH Amide (2,1 $\times$ 150 mm, 1,7 μm). A fase móvel foi constituída por (A) acetonitrila grau HPLC e (B) formiato de amônio 200 mM (pH 5,5, ajustado com ácido fórmico). O gradiente de eluição iniciou-se em 95% de acetonitrila (fase A) e 5% de solução de formiato de amônio (fase B) no tempo zero. Aos 3 min, a composição foi ajustada para 88% de fase A e 12% de fase B. Em seguida, aos 4 min, retornou-se à condição inicial de 95% de fase A e 5% de fase B, a qual foi mantida até o final da corrida, em 7 min. O volume de injeção foi de 10 μL , o tempo total de corrida cromatográfica foi de 7 min, a temperatura da coluna foi mantida em 35 °C e a do amostrador em 8 °C. O fluxo da fase móvel foi fixado em 0,50 mL/min.

As análises foram realizadas em espectrômetro de massas Xevo TQ-S micro (Waters™, Milford, MA, EUA), equipado com fonte de ionização por *eletrospray* (ESI), operando em modo positivo. A aquisição de dados foi realizada em modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*).

O tempo de retenção da ACh foi de 2,5 min, monitorando-se a transição iônica do precursor m/z 146,10 para o produto m/z 87,05. Os parâmetros de fragmentação foram: voltagem do cone 25 V, voltagem de colisão 12 V, voltagem do capilar 2 kV e *span* 0,1. Os parâmetros da fonte foram definidos como: temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo de gás de dessolvatação de 900 L/h e temperatura da fonte de 150 °C.

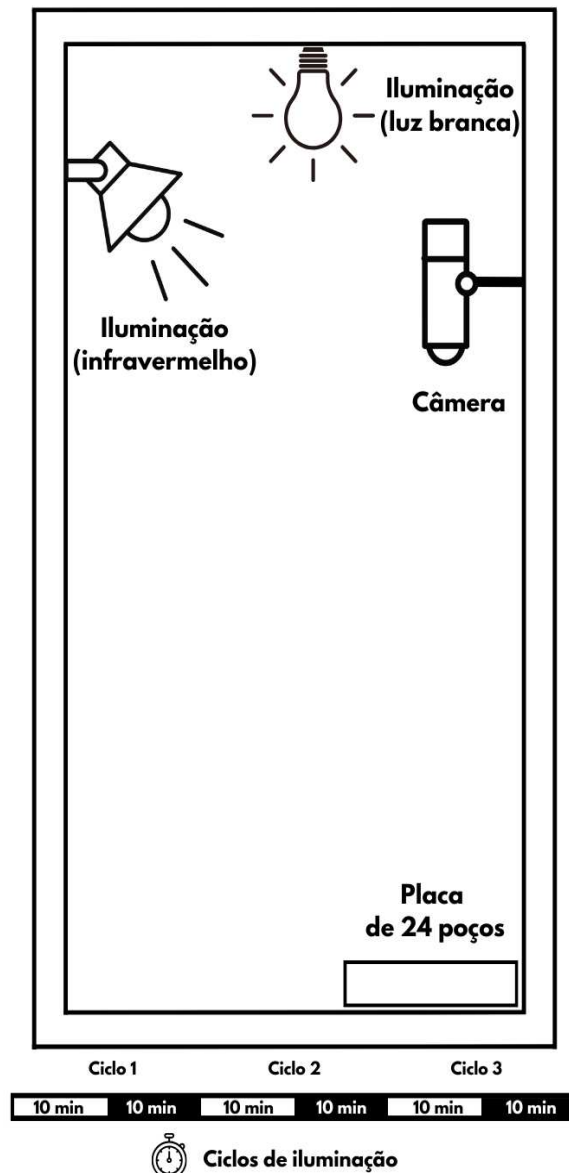
Para validação analítica, construiu-se uma curva de calibração a partir de diluições seriadas da solução padrão de ACh em acetonitrila, nas concentrações de 1, 5, 10, 15 e 20 ppb. Os resultados foram expressos como picogramas de ACh por grama de amostra (pg/mg).

4.4.5.11 Avaliação comportamental dos animais

Os animais de cada grupo passaram por avaliações para determinação da sua atividade locomotora conforme a metodologia de Sun et al. (2022). Para isso, 15 animais de cada grupo foram aleatoriamente coletados e lavados em água de manutenção, para que então fossem transferidos individualmente a uma placa de avaliação comportamental de 24 poços (volume de água de 2 mL), onde permaneceram durante 20 min para aclimação, sendo realizada na

sequência, a avaliação da atividade locomotora de cada larva com o auxílio de um aparato para gravações. O aparato consiste em uma caixa vedada à entrada de luz exterior, e equipada com uma câmera para gravações, além de iluminação de luz branca controlada por temporizador e iluminação infravermelho (Figura 7). A avaliação consistiu na exposição das larvas a 3 ciclos claro-escuro de 20 min (10 min de iluminação seguidos de 10 min de escuridão de maneira alternada) durante 60 min, sendo as imagens posteriormente analisadas por um software de rastreamento (ANYmaze[®]. Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA), o qual quantificou os parâmetros de distância total percorrida em metros (m), velocidade média em centímetros por segundo (cm/s) em cada um dos ciclos claro/escuro. Os parâmetros avaliados serviram para determinar a atividade locomotora dos animais.

Figura 7 - Aparato de gravações para avaliação comportamental



O equipamento contou com iluminação de luz branca controlada por um temporizador, o qual foi programado de acordo com os períodos de iluminação de cada ciclo, conforme o esquema exemplificado na parte inferior da figura

4.5 ANÁLISE DE *DOCKING* MOLECULAR DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *N. cataria* COM ACETILCOLINESTERASE DE *D. rerio*

O processo de realização de *docking* molecular envolve duas etapas principais: 1) a geração de diferentes conformações possíveis do ligante dentro do sítio ativo do alvo (geração de poses); e 2) a avaliação dessas conformações utilizando funções de pontuação para estimar a afinidade de ligação, permitindo a identificação da pose mais provável e energeticamente favorável (MENG et al., 2011).

A estrutura cristalizada da AChE de peixe-zebra (zAChE) foi obtida do banco de dados UniProt (código: Q9DDE3), enquanto as estruturas moleculares dos componentes do OENC foram obtidas a partir do banco de dados PubChem. O *software* AutoDock Tools (MORRIS et al., 2009) foi utilizado para preparar a estrutura da enzima, com a remoção de moléculas de água, adição de hidrogênios polares e atribuição de cargas parciais de Kollman. Os ligantes tiveram suas estruturas otimizadas por métodos de mecânica molecular no *software* Avogadro (HANWELL et al., 2012). Em seguida, foram processados no AutoDock Tools para a correta atribuição das cargas parciais de Gasteiger.

Com fins de validação da localização dos resíduos constituintes do seu sítio ativo, a estrutura tridimensional da Q9DDE3 foi comparada à da AChE humana (código PDB: 4EY7) - amplamente validada. Essa etapa foi necessária porque apenas um estudo anterior havia realizado o pareamento estrutural, empregando metodologias menos precisas à época e fornecendo resultados distintos (BERTRAND et al., 2001). O uso do método de alinhamento estrutural rígido/flexível por encadeamento de pares de fragmentos alinhados (FATCAT) permitiu atualizar essa análise, fornecendo um mapeamento dos resíduos equivalentes aos domínios do sítio ativo previamente descritos para a AChE humana (hAChE) (KUZU et al., 2019; RAMACHANDRAN et al., 2023; RAWAT et al., 2024). A partir da correspondência dos resíduos, foi calculada a coordenada central do sítio ativo com o auxílio do *software* PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 3.0 Schrödinger, LLC), utilizada posteriormente como centro de busca nas simulações de *docking* molecular.

Após o preparo das estruturas moleculares da enzima e dos ligantes, as simulações de *docking* molecular foram realizadas a partir do uso do *software* AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010). Para isso, foi criada uma caixa de busca (*grid box*) com $40 \times 40 \times 40$

angstroms (Å) , centrada nas coordenadas $x = -12,81$, $y = 5,00$ e $z = -1,44$ (calculadas anteriormente), a fim de incluir apenas o sítio ativo da proteína para reduzir o custo computacional. Foi atribuído um parâmetro de exaustividade de 8 para as avaliações. Como a enzima ainda não possui ligantes co-cristalizados conhecidos, a validação das simulações de *docking* molecular foi baseada na observação de pelo menos três poses apresentando RMSD inferior a 2 Å entre si, indicando consistência na orientação do ligante dentro do sítio ativo. Os resultados do *docking* molecular foram expressos como energia de ligação estimada (kcal/M), e, para cada ligante, a pose com a menor energia de ligação (mais favorável) foi selecionada para as análises de interações. A título de comparação dos resultados obtidos, o cloridrato de donepezila (DPZ), um inibidor reversível de AChE foi utilizada como referência.

As análises de interação foram realizadas com auxílio da ferramenta *Protein-Ligand Interaction Profiler* (PLIP) (SCHAKE et al., 2025), utilizando os parâmetros de distância máxima de detecção: 1) 4,1 Å para pontes de hidrogênio; 2) 4,5 Å para pontes salinas; 3) 5,5 Å para interações π - π ; e 5) 4,0 Å para interações hidrofóbicas.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise para determinação de uma curva concentração-resposta no ensaio de avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). As concentrações foram transformadas ($\log_{10}$) e os dados foram ajustados pelo modelo de quatro parâmetros, permitindo estimar a CE_{50} .

Para as variáveis qualitativas *in vivo* (teste de toxicidade aguda), os dados de presença e ausência dos parâmetros foram organizados em tabelas de contingência (tratamento $\times$ ocorrência). A associação entre os tratamentos foi avaliada pelo teste exato de Fisher aplicado à tabela completa. Em seguida, foram realizadas comparações par-a-par entre todos os tratamentos utilizando o mesmo teste, permitindo identificar diferenças específicas entre pares de grupos. Para fins de descrição e visualização dos resultados, foram calculadas as proporções de presença em cada tratamento, assim como seus erros-padrão, considerando o número total de observações por tratamento. Estes valores foram utilizados para a construção de gráficos em termos relativos, facilitando a interpretação das diferenças entre os grupos.

Os dados experimentais quantitativos das avaliações *in vivo* de parâmetros bioquímicos e expressão gênica foram analisados por meio de modelos lineares generalizados (GLM) utilizando a família Gamma com função de ligação log, uma vez que a variável resposta

apresentou distribuição assimétrica e positiva. A análise foi conduzida no software RStudio (RStudio 2024.04.2 Build 764R Core Team; Posit PBC, Boston, MA, EUA), o qual utiliza a linguagem R, com o pacote glmmTMB (BROOKS, MOLLIE et al., 2017). Para a realização das análises, o grupo controle foi utilizado como referência, sendo padronizado em 100% e dados de resposta obtidos para cada um dos outros tratamentos foram transformados para escala percentual, relativa ao grupo controle de sua respectiva repetição. Tal transformação decorre da alta variação basal dos valores obtidos em cada repetição dos experimentos, o que tornava a análise dos dados em sua escala original inviável, uma vez que os pressupostos de normalidade e homoscedasticidade na distribuição dos resíduos não foram alcançados. Como todos os resultados passaram a ser expressos em escala percentual relativa ao controle, não foi possível avaliar a variabilidade desse grupo, já que seus valores correspondiam sempre a 100% em todas as repetições. Para contemplar as características dos dados, optou-se pela utilização de um GLM com família Gamma e função de ligação log, o qual apresentou bom ajuste ao padrão de distribuição dos resíduos.

As estimativas dos modelos foram obtidas na escala do preditor linear e, posteriormente, transformadas para a escala de resposta. As diferenças entre os tratamentos foram avaliadas por meio de médias marginais estimadas (EMM) com o pacote emmeans (LENTH, 2017), utilizando uma abordagem em dois passos: primeiro, cada tratamento foi comparado em relação ao controle, permitindo avaliar a diferença em relação ao controle; em seguida, foram realizadas comparações entre os próprios tratamentos para avaliar diferenças relativas entre os grupos experimentais. As comparações múltiplas foram ajustadas pelo método de Tukey (nível de significância de 0,05).

A adequação dos modelos foi verificada com diagnóstico de resíduos usando o pacote DHARMA (HARTIG, 2016), incluindo testes de uniformidade, dispersão e independência, bem como inspeção gráfica (resíduos simulados vs. valores ajustados). O modelo foi mantido sem transformações adicionais, uma vez que todos os dados se adequaram devidamente ao modelo descrito.

Os dados relativos à quantificação dos níveis de ACh e dos parâmetros comportamentais foram expressos em sua escala original e avaliados através de análise de variância (ANOVA) (nível de significância de 0,05)

A construção dos gráficos presentes nas figuras do texto foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 10.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *N. cataria*

Na tabela 2 encontram-se os componentes identificados através de CG-EM presentes no OENC, enquanto a Figura 8 apresenta as estruturas químicas dos compostos em questão. O componente majoritário identificado no OENC foi 4 α ,7 α ,7 α -nepetalactona (77,84%), o qual somado aos demais estereoisômeros de nepetalactonas: 4 α ,7 α ,7 α -nepetalactona (10,5%) e 4 α ,7 β ,7 α -nepetalactona (1,35%), totalizam 89,70% da composição do óleo, sendo esse um resultado superior ao que tem sido observado em estudos recentes que caracterizaram a presença das nepetalactonas em óleos essenciais de *N. cataria* posteriormente avaliados quanto a sua atividade antioxidante (ADIGUZEL et al., 2009; ASHRAFI, 2019; MOLLOVA et al., 2023). Apesar de um total de nepetalactonas similar ao observado em vários trabalhos como os de Kim et al. (2006), Mohammadizad et al. (2017), Azizian et al. (2021) e Tiwari et al. (2023), o OENC do presente trabalho apresentou uma menor variedade de compostos caracterizados. Dentre os demais compostos identificados no OENC, somente o globulol não foi relatado como um dos constituintes de óleos essenciais de *N. cataria* até o momento, apesar de sua presença já ter sido identificada em outras espécies do gênero, como *N. nuda* ssp., *N. fissa*, *N. congesta* var. *congesta* e *N. viscida*, apesar disso tais estudos não avaliaram as atividades biológicas dos óleos essenciais em questão (KÖKDIL; KURUCU; YILDIZ, 1998; SEFIDKON; DABIRI; ALAMSHAHI, 2002; KAYA; DEMIRCI; BASER, 2007; CARIKCI, 2021). As diferenças observadas na composição química do OENC, quando comparadas a relatos prévios para a mesma espécie, podem estar relacionadas a fatores como variação genética, condições edafoclimáticas, estágio de desenvolvimento da planta, sazonalidade e métodos de extração, os quais influenciam diretamente o perfil e a proporção dos metabólitos voláteis (LI; ZIDORN, 2022).

As nepetalactonas se apresentam como componentes majoritários ou em altas concentrações em óleos essenciais de outras espécies do gênero *Nepeta*, como a *N. nuda*, *N. cadmea*, *N. racemosa* e *N. sintenisii*, os quais apresentam o estereoisômero 4 α ,7 α ,7 α -nepetalactona como o principal componente na maioria das vezes. Os trabalhos indicam que no geral, os óleos essenciais ricos nesses compostos apresentam atividade antimicrobiana, antioxidante, e principalmente repelente de insetos (GKINIS et al., 2010; SHAKERI et al., 2016; YILMAZ et al., 2020; AZIZIAN et al., 2021b)

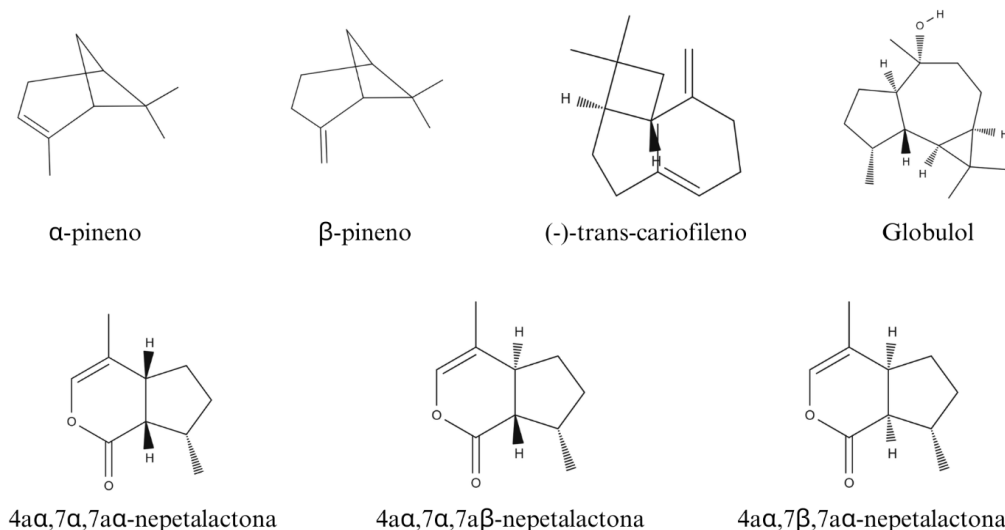
A atividade repelente de insetos é a principal atividade investigada em trabalhos que avaliaram a atividade biológica das nepetalactonas de maneira isolada (ZHU et al., 2012; REICHERT et al., 2019). O mecanismo de ação sugerido para essa atividade envolve principalmente a ativação de receptores de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), não sendo encontrado dados sobre a possível atuação das nepetalactonas sobre a AChE de insetos (MELO et al., 2021).

Tabela 2 - Compostos identificados por CG-EM presentes no óleo essencial de *N. cataria*

	Substância	TR (min)	IK _{exp}	Ik teórico	%
1	α -pineno	8,49	935	939	1,74
2	β -pineno	9,78	977	979	1,84
3	4 α ,7 α ,7 α -nepetalactona	19,81	1369	1360	10,50
4	4 α ,7 α ,7 β -nepetalactona	20,42	1400	1387	77,84
5	4 α ,7 β ,7 α -nepetalactona	20,45	1402	1392	1,35
6	(-)-trans-cariofileno	20,85	1426	1419	5,06
7	Não identificado	21,42	1461	NI	0,41
8	Globulol	23,52	1593	1585	1,25

Legenda: TR: tempo de retenção em min; IK_{exp}: Índice de Kovats experimental; IK_{teórico}: Índice de Kovats teórico; NI: Índice de Kovats teórico não identificado; %: porção de cada componente em relação à soma da área absoluta de todos os componentes. Fonte: O autor (2025).

Figura 8 - Estrutura química dos componentes identificados no óleo essencial de *Nepeta cataria*



Fonte: adaptado de Molview.org (2025)

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

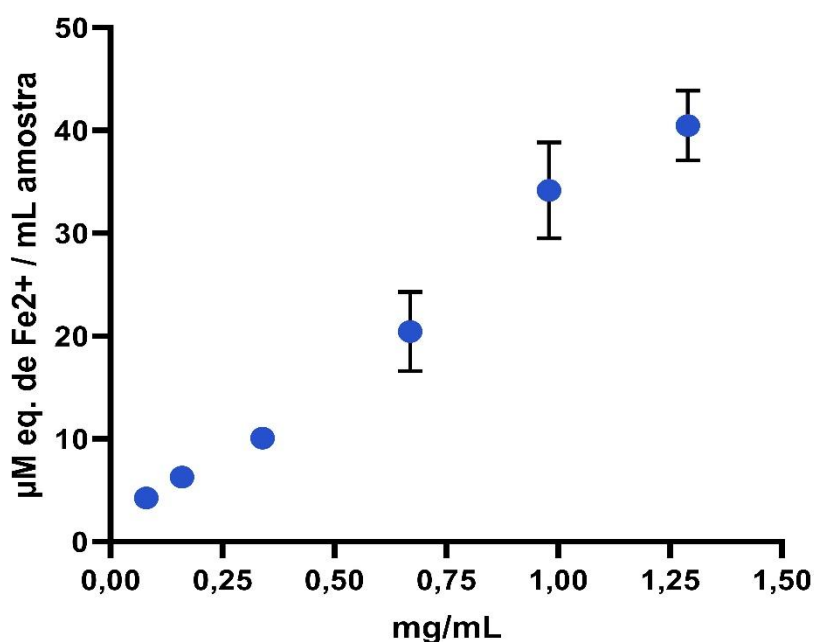
A atividade antioxidante *in vitro* do OENC foi avaliada por três métodos espectrofotométricos complementares entre si. O ensaio de potencial redutor de ferro (FRAP) determinou a capacidade redutora do extrato, baseada em reações de transferência de elétrons, na qual foi avaliada a habilidade do óleo em promover a redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} , revelando assim sua capacidade em doar elétrons para ERs, as estabilizando. A avaliação da ORAC avaliou o mecanismo antioxidante de transferência de átomos de hidrogênio frente a $\text{ROO}\bullet$, enquanto o ensaio de atividade sequestrante do radical DPPH quantificou predominantemente a capacidade doadora de elétrons do OENC, podendo também envolver, em menor escala, reações de transferência de átomos de hidrogênio, embora não seja possível distinguir os dois mecanismos através deste método.

A figura 9 apresenta os resultados obtidos através do método de FRAP e revela que o óleo essencial apresentou atividade redutora de ferro dependente da concentração, podendo observar o incremento da atividade de acordo com o aumento da concentração de óleo. Foram realizadas avaliações com diferentes concentrações do OENC: 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 0,96; e 1,25 mg/mL.

A atividade de FRAP para o óleo essencial variou de $4,39 \pm 1,18$ a $41,86 \pm 6,08$ $\mu\text{mol equiv. Fe}^{2+}$ /mL de óleo, para a menor e a maior concentração testada, respectivamente. Ao final, a atividade de FRAP calculada foi de 32,28 $\mu\text{mol equivalente de Fe}^{2+}$ /g do OENC (ou ainda 33,49 $\mu\text{mol equivalente de Fe}^{2+}$ /mL do OENC). Dentre os compostos caracterizados, nenhum apresenta em sua estrutura química grupos funcionais oxidáveis, com exceção do globulol que apresenta um grupo álcool terciário, que pode ser oxidado a cetona (Figura 8). Até o momento os estereoisômeros de nepetalactonas identificados no presente trabalho (89,7% dos compostos identificados) não tiveram sua atividade redutora de ferro *in vitro* avaliada, apesar do trabalho de Shakeri et al., 2016 ter demonstrado que o óleo essencial de *N. sintensis*, rico na presença desses compostos (63,46%), apresentou uma alta atividade no ensaio de FRAP, ou seja, 0,82 mmol eq. Fe^{+2} /mg de óleo. Apesar disso, o óleo essencial em questão apresentou uma ampla variedade de compostos caracterizados, os quais muitos apresentam grupos funcionais que podem apresentar maior correlação com a atividade antioxidante obtida. O (-)-trans-cariofileno (nomeado também como β -cariofileno), um dos principais terpenoides identificados no OENC (5,06%), por sua vez já demonstrou atividade pelo ensaio de FRAP similar a do ácido ascórbico, o que faz com que possa se levantar a hipótese de que parte da atividade antioxidante do OENC pode ser atribuída a tal composto, apesar de sua baixa concentração quando comparado às nepetalactonas, além da ausência de grupos funcionais passíveis de oxidação (DAHAM et al., 2015). O óleo essencial de *Pinus roxburghii* descrito por Naz

Qaisrani et al. (2025), apresentou elevada concentração de β -pineno (30,1%), um dos terpenoides minoritários identificados no OENC (1,84%). Tal composição pode ter contribuído de forma significativa para a elevada atividade antioxidante observada (312 μg eq. $\text{Fe}^{2+}/120 \mu\text{g}$), embora outros compostos presentes também possam exercer efeito.

Figura 9 - Potencial redutor de ferro (FRAP) de diferentes concentrações do óleo essencial de *N. cataria*



Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de quatro experimentos independentes. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

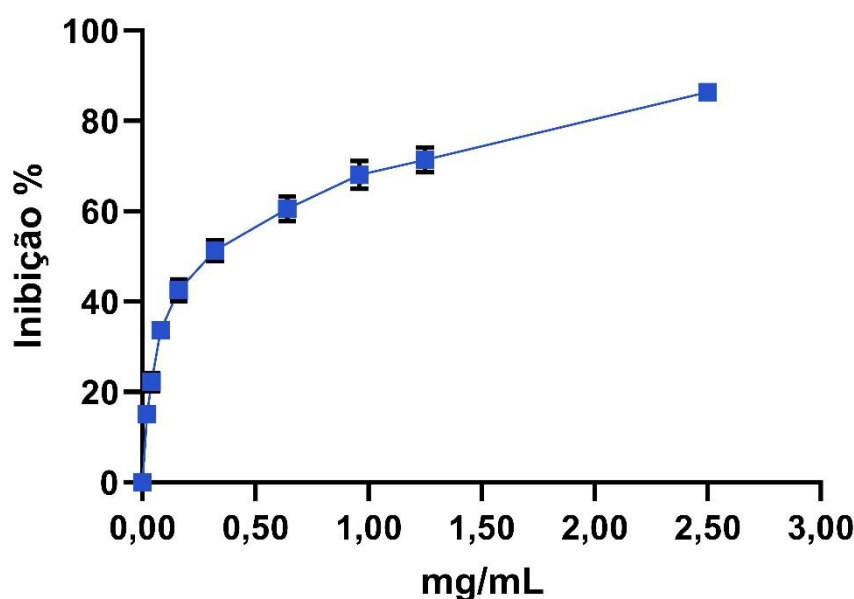
Os valores de FRAP obtidos no presente estudo foram inferiores (1,6 a 16 vezes inferior) aos resultados costumeiramente observados em óleos essenciais reconhecidos por sua elevada atividade antioxidante, como os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e gengibre (*Zingiber officinale*), além de outros representantes da família Lamiaceae, como hortelã-pimenta (*Mentha piperita*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), sálvia (*Salvia officinalis*) (SUMALAN; ALEXA; POIANA, 2013; VAZIRIAN et al., 2015; SATHISH KUMAR et al., 2024). Isso se deve justamente a natureza química dos compostos presentes nesses óleos. O OENC ainda apresentou valor de FRAP

inferior ao que foi descrito em óleos essenciais do gênero *Nepeta*, como *N. nuda*, *N. sintenisii*, e *N. crispa* (GKINIS et al., 2010; SHAKERI et al., 2016; MOTAGHED; NILI-AHMADABADI; MORADKHANI, 2022). Apesar disso, o óleo ainda teve resultados similares aos relatados no óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e superiores ao que foi observado em óleos de outros representantes da família Lamiaceae, como o tomilho (*Thymus vulgaris*) e tomilho espigado (*Thymbra spicata*), além de *N. fissa* e o próprio extrato de *N. cataria* (ZAOUALI; BOUZAINÉ; BOUSSAID, 2010; GEDIKOĞLU; SÖKMEN; ÇIVIT, 2019; AZIZIAN et al., 2021; MOSHARI NASIRKANDI; ALIREZALU; BAHADORI, 2021). É importante considerar que a metodologia de avaliação de FRAP pode variar entre estudos, com diferenças na sequência dos passos, na forma de preparo das soluções, nas concentrações e grau de pureza dos reagentes, bem como no tempo e na temperatura de incubação, fatores que podem contribuir para o elevado grau de variabilidade observado nas respostas das amostras avaliadas nesses trabalhos.

Na figura 10, estão representados os resultados da atividade de remoção do radical DPPH, mensurado através de espectrofotometria. Uma curva de dose resposta foi construída com diferentes concentrações do OENC: 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 0,96; 1,25; e 2,50 mg/mL, e assim foi possível, através de análise de regressão, determinar a CE_{50} para a remoção do radical DPPH, chegando ao valor de 0,27 mg/mL (0,28 μ L/mL). Como mencionado anteriormente, esse método de avaliação de atividade antioxidante *in vitro* tem um caráter misto quanto a quantificação dos mecanismos antioxidantes, podendo avaliar atividade de doação de átomos de hidrogênio por parte dos antioxidantes, mas predominantemente avalia, assim como FRAP, a capacidade redutora dos mesmos. De qualquer forma, os compostos identificados não apresentam em sua estrutura química grupos funcionais oxidáveis, nem com capacidade de doação de átomos de hidrogênio de maneira relevante, com exceção ao globulol que tem em seu grupo álcool tais potenciais, e que apesar de se apresentar em baixa concentração no OENC, pode ser o responsável por uma grande parcela de sua atividade antioxidante (MA et al., 2025). Rodriguez et al. (2019) observaram que tanto o óleo essencial de aroeira-salsa (*Schinus areira L.*), que apresentou o globulol como seu constituinte predominante (16,6%), quanto o globulol de maneira isolada, apresentaram uma alta atividade de remoção do radical DPPH com valores de CI_{50} (métrica equivalente a CE_{50} calculada no presente trabalho) de 38,75 μ g/mL e 5,6 μ g/mL, respectivamente, sendo que o globulol apresentou atividade superior ao Trolox (análogo solúvel da vitamina E) (7,67 μ g/mL), o que revela o alto potencial desse composto atuar como um antioxidante mesmo em pequenas concentrações. Até o momento, esse é o primeiro trabalho em que o globulol foi identificado no OENC. O resultado

quantificado nessa avaliação foi superior a alguns dos poucos trabalhos que avaliaram a atividade sequestrante do radical DPPH de *N. cataria*, sendo que Mollova et al. (2023), calcularam um valor de CI_{50} de 8,17 mg/mL e Adiguzel et al. (2009) concluiu que o óleo se apresentou inativo. Ashrafi et. al (2018) demonstraram CI_{50} de seu óleo essência inferiores à do presente trabalho, no entanto o mesmo contava com uma ampla variedade de compostos minoritários, incluindo aqueles com presença de grupos funcionais importantes para a atividade antioxidante como álcoois, cetonas, ésteres e anéis aromáticos, os quais podem ser observados nas estruturas químicas do linalol, mirtenol, trans-carveol, 1-Octe-3-ol, 4-terpinol e timol.

Figura 10 - Curva de inibição obtida na avaliação da atividade sequestrante do radical DPPH do óleo essencial de *N. cataria*



Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de quatro repetições independentes. Fonte: elaborado pelo autor (2025).

Esse é o primeiro trabalho a utilizar o método de ORAC para avaliar a capacidade antioxidante de óleos essenciais de espécies do gênero *Nepeta*. A avaliação revelou um valor de $1.309 \pm 5,7$ $\mu\text{mol ET/mL}$ do OENC ($1.265 \pm 5,5$ $\mu\text{mol ET/g}$ do OENC), sendo essa uma atividade com valores equivalentes a categoria de óleos essenciais conhecidos por sua alta atividade antioxidante, como citronela (*Cymbopogon winterianus*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (BENTAYEB et al., 2014; MA et al., 2017), além de atividade superior ao que foi observado em óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus spp*), alho (*Allium sativum*) e erva-

cidreira (*Melissa officinalis*) (MIGUEL et al., 2018; KHODAEI et al., 2021). A atividade relatada ainda é inferior ao que se observa em estudos com os óleos essenciais obtidos a partir de cravo (*Syzygium aromaticum*) e canela (*Cinnamomum spp.*) (BENTAYEB et al., 2014; KHODAEI et al., 2021). A atividade de ORAC do OENC pode estar relacionada a presença de globulol em sua composição, visto que o grupo álcool em sua estrutura química favorece a atividade de doação de átomos de hidrogênio, embora ainda não tenham sido encontrados estudos que o relacionem a essa atividade de forma isolada.

Tabela 3 – Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *N. cataria*: potencial redutor de ferro (FRAP), atividade sequestrante do radical DPPH e ORAC

Óleo essencial	FRAP*		DPPH		ORAC	
	μmol eq. Fe2+/mL	μmol eq. Fe2+/g	CE ₅₀ (μL/mL)	CE ₅₀ (mg/mL)	μmol ET/mL	μmol ET/g
OENC	32,38 ± 2,71	33,49 ± 2,81	0,27	0,28	1.265 ± 5,57	1.309 ± 5,7

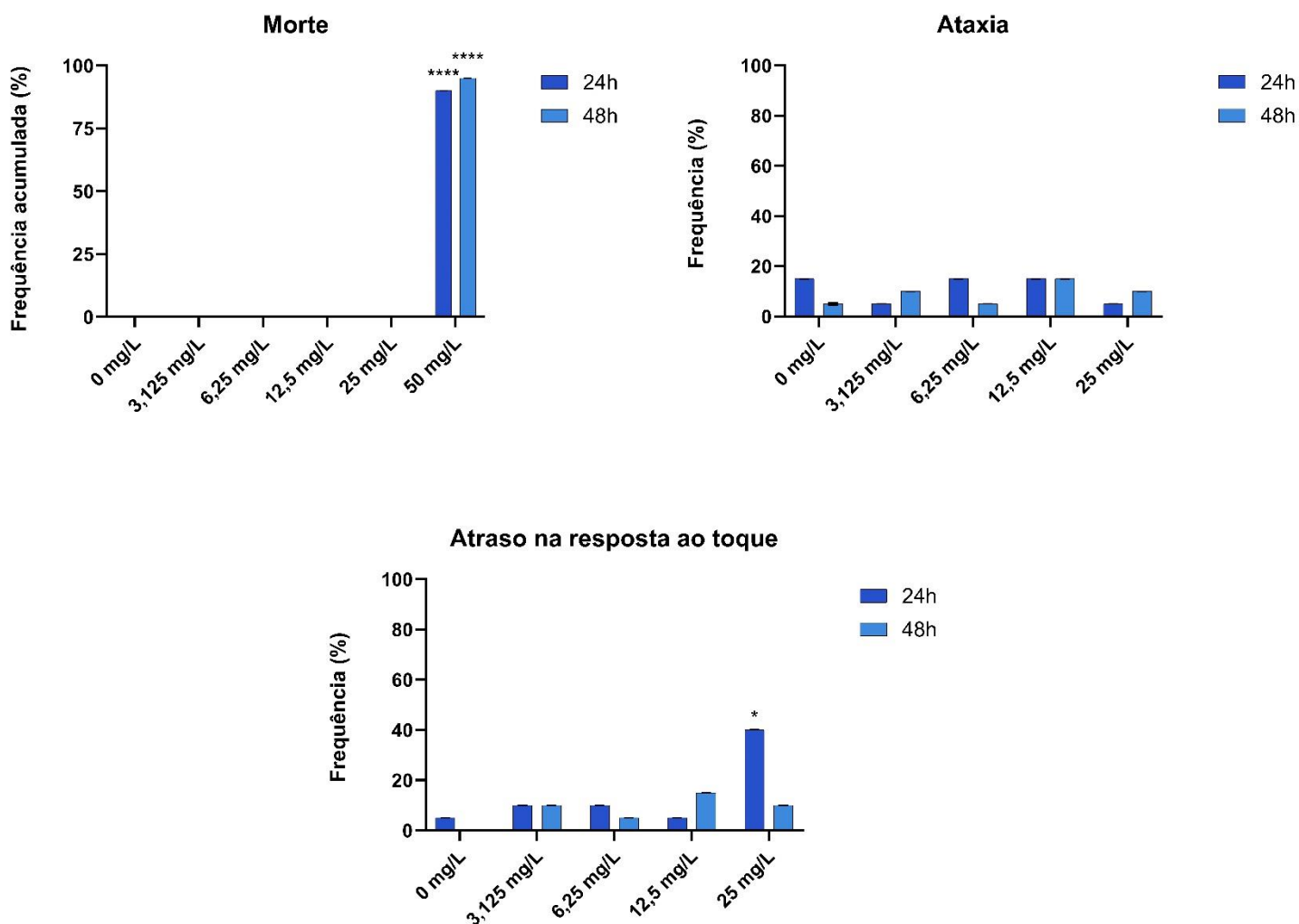
Os dados são expressos como média ± EPM de quatro experimentos independentes. ET: Trolox. Fonte: elaborado pelo autor (2025). * Os valores médios de FRAP descritos para a maior concentração do óleo avaliada (1,25 mg/mL).

5.3 TOXICIDADE AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *N. cataria* EM LARVAS DE *D. rerio*

Conforme anteriormente mencionado, esse teste foi realizado a fim de determinar a concentração máxima segura de óleo a ser utilizada nas avaliações posteriores. Os resultados dos parâmetros avaliados nessa etapa estão disponíveis na Figura 11. As concentrações do OENC ≤ 25 mg/L não levaram a mortalidade dos animais expostos aos respectivos tratamentos ao longo das 48 h de exposição. A concentração mais alta testada, 50 mg/L, levou à morte de 90% dos animais ainda nas primeiras 24 h ($p < 0,0001$) e 50% dos animais restantes às 48 h. Concentrações ≤ 12,5 mg/L não levaram ao surgimento de sinais de ataxia ou atraso na resposta ao toque significativamente superior ($p > 0,05$) ao que foi observado nos animais tratados como controle. A frequência de animais expostos a 25 mg/L do OENC que apresentaram atraso na resposta ao toque foi significativamente superior ao controle (40%, $p < 0,05$). Através dos resultados obtidos nessa avaliação, foi possível determinar uma concentração segura do óleo

para a realização dos ensaios posteriores, sendo selecionado inicialmente as concentrações de 6,25 e 12,5 mg/L.

Figura 11 - Avaliação de parâmetros de toxicidade aguda do óleo essencial de *N. cataria* em larvas de peixe zebra após 48 h de exposição a diferentes concentrações do óleo

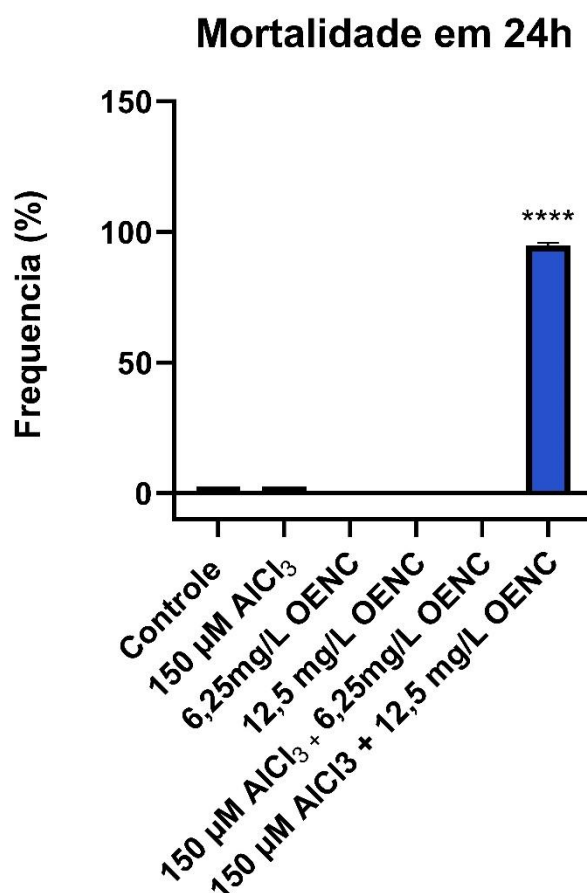


Frequência acumulada de mortalidade ao longo das 48h de exposição dos animais a diferentes concentrações de OENC (A); Frequência de animais apresentando ataxia ao longo das 48h de exposição a diferentes concentrações de OENC (B); frequência de animais apresentando ataxia ao longo das 48h de exposição a diferentes concentrações de OENC; e frequência de animais apresentando atraso na resposta ao toque ao longo das 48h de exposição a diferentes concentrações de OENC (C). Os dados são expressos como frequência (%). Cada grupo incluiu 20 animais ($n = 20$). As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste exato de Fisher generalizado, e os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. Diferenças significativas entre grupos são indicadas por asteriscos: $p < 0,05$; e ****: $p < 0,0001$.

Apesar de se apresentar segura na avaliação de toxicidade aguda, a utilização da concentração de 12,5 mg/L combinada a 150 μM de AlCl_3 demonstrou alta frequência na

contagem de animais mortos ainda nas primeiras 24 h de exposição (95%, $p < 0,0001$). Dessa forma, optou-se pela utilização da concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ do OENC, a qual não levou a mortalidade dos animais quando combinada ao AlCl_3 (Figura 12).

Figura 12 - Mortalidade observada da combinação de 150 μM AlCl_3 e 12,5 mg/L OENC nas primeiras exposições para a avaliação do potencial protetor do óleo essencial de *N. cataria* em um modelo de toxicidade aguda por AlCl_3 em larvas de *D. rerio*



Os dados são expressos como frequência (%). Cada grupo incluiu 40 animais ($n = 40$). As comparações estatísticas foram realizadas pelo teste exato de Fisher generalizado, e os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão. Diferenças significativas entre grupos são indicadas por asteriscos: ****: $p < 0,0001$.

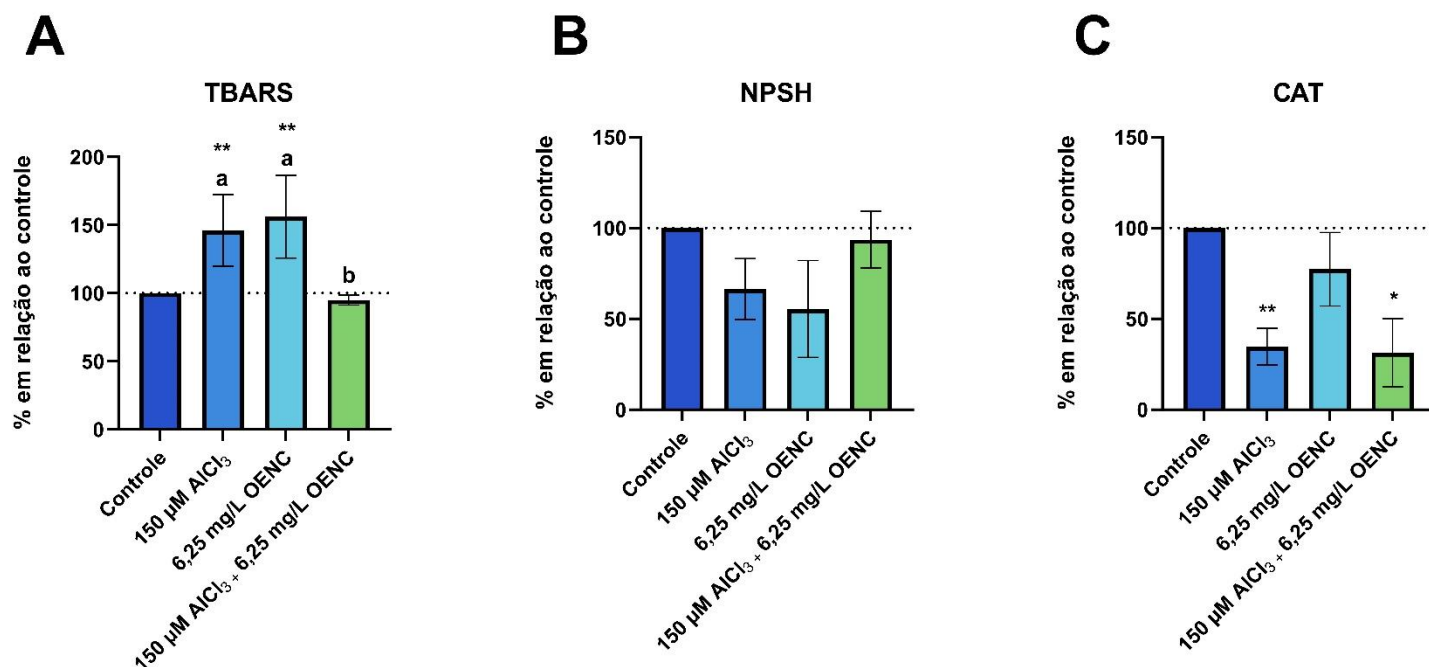
5.4 POTENCIAL PROTETOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *N. cataria* EM UM MODELO DE TOXICIDADE AGUDA DE AlCl_3 EM LARVAS DE *D. rerio*

5.4.1 Avaliação da atividade protetora do óleo essencial de *N. cataria* em resposta ao estresse oxidativo induzido por AlCl_3

Dando continuidade a avaliação da atividade biológica do OENC, investigou-se seu potencial protetor contra o estresse oxidativo induzido pelo AlCl_3 , através da análise de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo e da expressão de genes relacionados às defesas antioxidantes. Os resultados da avaliação dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo estão representados na Figura 13, enquanto os da quantificação da expressão de genes codificantes de proteínas relacionadas ao sistema de defesa antioxidante é apresentado nas Figuras 14 e 15.

O modelo de toxicidade aguda com AlCl_3 mostrou-se eficiente em induzir estresse oxidativo nas larvas de *D. rerio*, uma vez que os animais expostos ao agente indutor apresentaram, em comparação ao grupo controle, aumento significativo dos níveis de TBARS ($146,1 \pm 26,32$, $p < 0,01$), acompanhado de redução da atividade da enzima antioxidante CAT ($34,77 \pm 10,08$, $p < 0,01$). Por outro lado, não foram observadas alterações significativas nos níveis de NPSH em nenhum dos grupos experimentais.

Figura 13 - Avaliação dos níveis de TBARS e NPSH e da atividade enzimática de CAT após 48 h de exposição aos tratamentos



TBARS (A); NPSH (B); e atividade da CAT (C). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de três (A e B) ou quatro (C) experimentos independentes. Asteriscos sobre as barras indicam diferenças significativas dos respectivos tratamentos em relação ao grupo controle, com base em comparações de contrastes simples das médias marginais estimadas (EMMs): *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; Letras diferentes acima das barras indicam diferenças

significativas entre os tratamentos, de acordo com comparações múltiplas de Tukey das médias marginais estimadas (EMMs).

Os animais submetidos ao modelo de toxicidade aguda pelo AlCl_3 e tratados concomitantemente com 6,25 mg/mL do OENC apresentaram valores de TBARS ($94,91 \pm 3,73$) estatisticamente semelhantes ao grupo controle e significativamente inferiores aos observados nos animais que receberam apenas o AlCl_3 ($p < 0,05$). Esse achado indica a capacidade do OENC em prevenir a peroxidação lipídica desencadeada pelo AlCl_3 . Por outro lado, quando administrado isoladamente, 6,25 mg/L do OENC elevou significativamente os níveis de TBARS ($156,20 \pm 30,38$, $p < 0,01$) em relação ao controle, atingindo valores semelhantes aos observados nos animais expostos exclusivamente ao AlCl_3 , fato que até o momento não pode ser explicado sem que haja a condução de avaliações complementares, como a avaliação da atividade de demais enzimas antioxidantes. Os resultados também apontam que o OENC não foi capaz de proteger os animais da redução da atividade de CAT induzida por AlCl_3 ($31,44 \pm 18,80$). O OENC isoladamente não apresentou capacidade de modular a atividade de CAT ($77,26 \pm 20,25$). Aponta-se, portanto, que a CAT não está diretamente envolvida no mecanismo pelo qual OENC reduz a peroxidação lipídica, conforme indicado pelos níveis de TBARS.

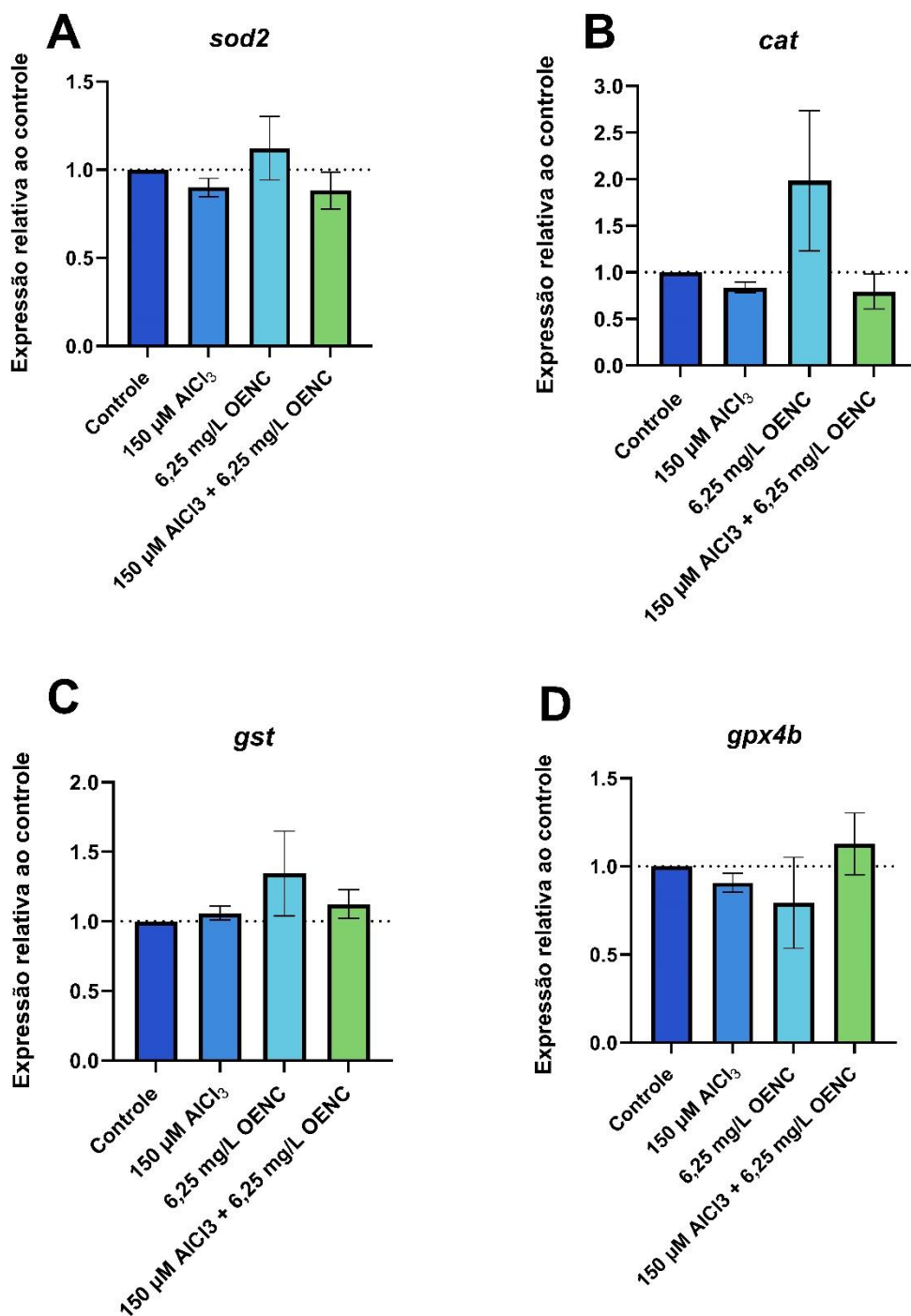
Ademais, propõe-se que a redução da peroxidação lipídica pelo OENC quando induzida por AlCl_3 possa estar atrelada a sua atividade de remoção direta de ERs, uma vez que o óleo demonstrou potencial antioxidante em ensaios *in vitro*. Nessas avaliações revelou-se a atividade do OENC como agente redutor (FRAP e DPPH), bem como sua capacidade de doar átomos de hidrogênio, evidenciada no ensaio de ORAC através da neutralização do $\text{ROO}^\bullet$, um dos principais RLs envolvidos nos processos de peroxidação lipídica. Embora esses resultados tenham sido obtidos em ensaios *in vitro*, eles reforçam a possibilidade de tais mecanismos se repetirem *in vivo*. Além disso, estudos como os de Xie e Yokel (1996) e Kaneko, Sugioka e Sakurai (2007) já demonstraram em diferentes sistemas de avaliação de peroxidação lipídica *in vitro* que o Al apresenta capacidade intrínseca de favorecer a peroxidação lipídica, em especial em pH ácido, quando se encontra em maiores concentrações de sua forma livre (Al^{3+}). O Al^{3+} acaba interagindo eletrostaticamente com determinados fosfolipídios de membrana, sobretudo a fosfatidilserina, a qual apresenta um grupo carboxil em seu resíduo terminal de serina carregado negativamente, o que permite se ligar ao Al^{3+} e ter sua conformação modificada. Tais alterações reduzem a permeabilidade de membranas celulares e aumenta a susceptibilidade dos fosfolipídios que as compõem à peroxidação lipídica dependente de Fe^{2+} e a consequente

degradação em hidroperóxidos lipídicos (ROOH), radicais alcóxi (RO•) e ROO•, o que respalda a hipótese de remoção direta desses radicais por parte do OENC. Estudos *in vitro* ainda indicam tal mecanismo sobre outros lipídios, como a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e esfingomiéline (EXLEY; CHAPPELL; BIRCHALL, 1991).

Alguns autores levantam a hipótese de que o Al pode formar um complexo pró-oxidante com o radical superóxido ($\text{AlO}_2\bullet^{2+}$). A formação do complexo $\text{AlO}_2\bullet^{2+}$, bem como de seus derivados hidratados ou hidrolisados, resulta na estabilização do $\text{O}_2\bullet^-$, prolongando sua meia-vida. Esse complexo atua como doador de elétrons em uma reação redox que reduz o Fe^{3+} a Fe^{2+} ($\text{Fe}^{3+} + \text{AlO}_2\bullet^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{AlO}_2^{3+}$), classificada como exotérmica e exergônica, ocorrendo de forma espontânea. Tal mecanismo é crítico em sistemas biológicos, pois a simples presença de Al no ambiente celular aumenta a disponibilidade de Fe^{2+} , favorecendo a reação de Fenton, com consequente aumento da geração de •OH a partir de H_2O_2 e por fim a propagação das reações em cadeia da peroxidação lipídica (RUIPÉREZ et al., 2012). Portanto, outra hipótese para a atuação do OENC na proteção contra a peroxidação lipídica seria a capacidade de atuação de seus componentes como agentes quelantes de Fe^{3+} , ou ainda do próprio Al^{3+} (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Figura 14 – Análise quantitativa da expressão dos genes *sod2*, *cat*, *gst* e *gpx4* em larvas de peixe-zebra após 48 h de exposição aos

tratamentos

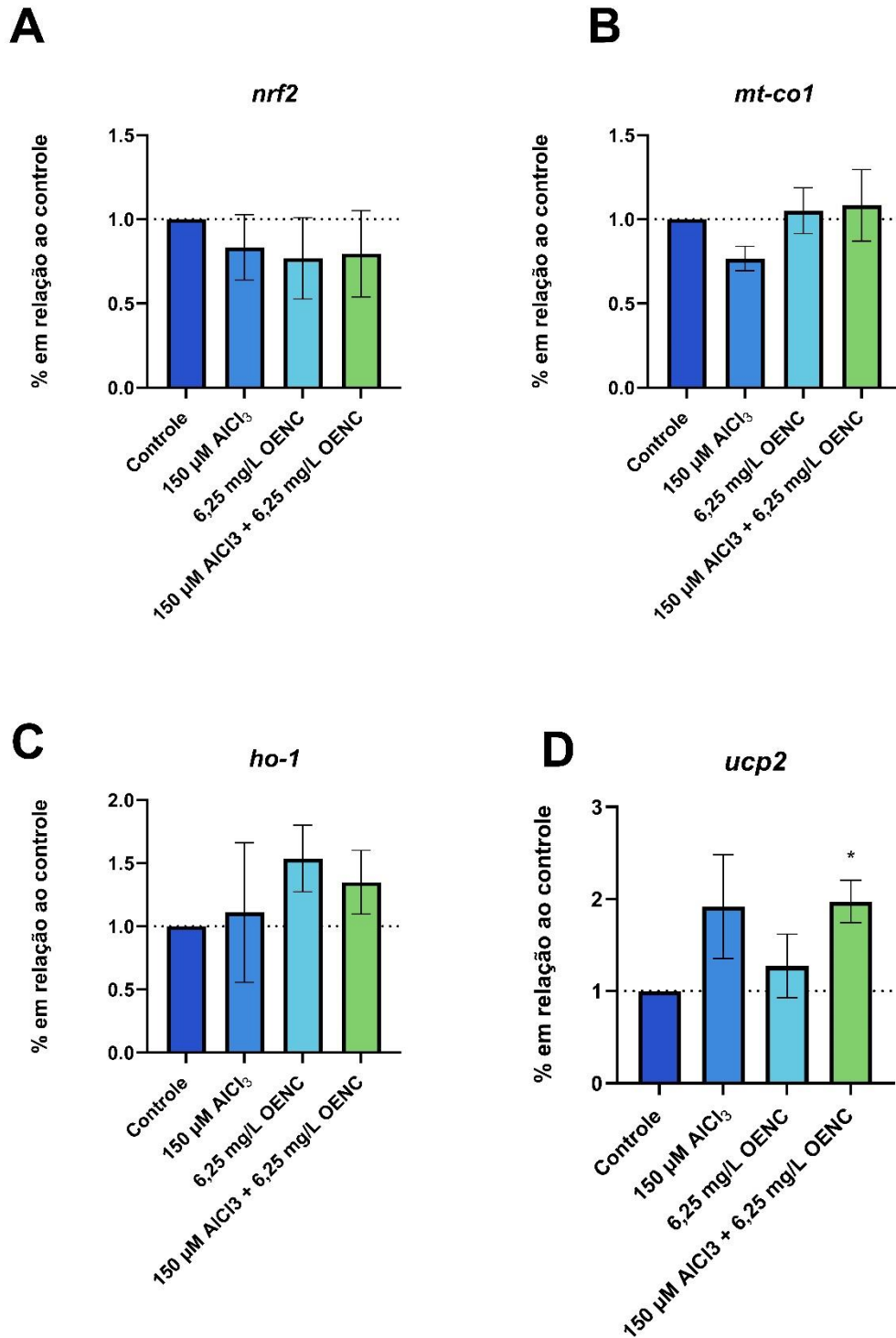


sod2 (A); *cat* (B); *gst* (C); e *gpx4b* (D). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes.

Vale ressaltar que a redução da atividade de CAT em ambos os grupos não foi acompanhada da diminuição da expressão do gene codificante da enzima (*cat*) (Figura 14),

podendo definir dessa forma, que se trata de uma redução absoluta de sua atividade enzimática, sugerindo um efeito direto do AlCl_3 sobre a atividade da CAT, semelhante ao observado no trabalho de Lukyanenko et al. (2012), que observou a redução da atividade da CAT em eritrócitos humanos expostos a diferentes concentrações de AlCl_3 . Esse achado aponta para a possível participação de outras defesas antioxidantes, como a GPx na redução de TBARS por parte do OENC. No entanto, a ausência da avaliação da atividade de GPx neste estudo, aliada à sua expressão gênica inalterada (*gpx4b*) em relação ao controle (Figura 14) e à manutenção dos níveis de NPSH, limita essa interpretação e impede uma conclusão definitiva.

Figura 15 - Análise quantitativa da expressão dos genes *nrf2*, *mt-co1*, *ho-1* e *ucp2* em larvas de peixe-zebra após 48 h de exposição aos tratamentos



nrf2 (A); *mt-co1* (B); *ho-1* (C); e *ucp2* (D). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de três experimentos independentes. Asteriscos sobre as barras indicam diferenças significativas dos respectivos tratamentos em relação ao grupo controle, com base em comparações de contrastes simples das médias marginais estimadas (EMMs): *: $p < 0,05$.

A exposição concomitante dos animais ao OENC e AlCl_3 levou ao aumento significativo da expressão do gene da *ucp-2* ($1,97 \pm 0,23$, $p < 0,05$). Porém, os grupos que receberam 6,25 mg/L do OENC ($1,27 \pm 0,35$) ou AlCl_3 ($1,92 \pm 0,56$) isoladamente, não apresentaram alterações em tal expressão (Figura 15). A proteína desacopladora (UCP) está envolvida na resposta à produção exacerbada de ERs mitocondriais, especialmente o $\text{O}_2^{\bullet-}$. A atividade exercida por UCP é o desacoplamento da fosforilação oxidativa, permitindo o retorno de prótons (H^+) do espaço intermembrana para a matriz mitocondrial. Esse desacoplamento reduz o potencial de membrana mitocondrial, diminuindo a geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e consequentemente as ERs derivadas, como o próprio H_2O_2 . A expressão de seu gene geralmente aumenta em situações de produção elevada dessas ERs, atuando, portanto, como mecanismo de proteção contra as ERs.

Portanto, a hipótese mais provável é que o aumento da expressão de *ucp2* no grupo AlCl_3 + OENC seja oriundo das maiores concentrações mitocondriais de H_2O_2 devido à menor atividade de CAT. O trabalho de Capriello et al. (2021) é o único até o momento que avaliou os efeitos do Al sobre parâmetros de estresse oxidativo em peixes-zebra em fase embrio-larval. O trabalho demonstra que concentrações entre 50 e 200 μM de AlCl_3 foram capazes de reduzir a atividade de GPx e aumentar a atividade de SOD, além dos níveis de TBARS. Diferentemente do presente trabalho, a CAT não apresentou alteração de atividade no grupo exposto ao AlCl_3 . Por outro lado, o trabalho de Capriello et al. (2021) ainda mostrou que houve redução da atividade de GPx e aumento da atividade de GST, combinados à diminuição dos níveis de GSH, o que pode evidenciar o desenvolvimento do processo de peroxidação lipídica e do consequente aumento dos níveis de TBARS induzidos por esse agente. Embora a atividade da GPx e GST, bem como os níveis específicos de GSH não tenham sido avaliados no presente estudo, não podemos descartar que alterações semelhantes às observadas no estudo de Capriello et al. (2021) possam também ter influenciado o aumento dos níveis de TBARS observado em nossos resultados. Vale ressaltar que o trabalho de Capriello et al. (2021) avaliou esses parâmetros de estresse oxidativo em animais expostos ao AlCl_3 ainda em fases iniciais de desenvolvimento, diferentemente do presente estudo que avaliou animais já na fase larval, de 3 a 5 dias pós-fertilização (dpf). O modelo de toxicidade desenvolvido no presente estudo apresenta diferenças quanto à fase de desenvolvimento dos animais ao início da exposição e também quanto a sua duração, o que pode justificar as diferenças nas respostas obtidas. O modelo experimental em questão ainda não havia sido testado quanto ao seu potencial indutor do estresse oxidativo. Entretanto, a escolha de um modelo de exposição aguda de 3 a 5 dpf é justificada pelo maior tropismo do Al por componentes celulares do SNC (KAWAHARA;

TANAKA; KATO-NEGISHI, 2021), que apresenta desenvolvimento suficiente para avaliações de neurotoxicidade a partir de 3 dpf, especialmente em avaliações posteriores quanto a atividade colinérgica e aos fenótipos comportamentais relacionados (WENHAI HUANG et al., 2016; CHEN et al., 2022).

O AlCl_3 não levou a alteração na expressão do gene *mt-col* - responsável pela síntese da subunidade 1 da citocromo c oxidase mitocondrial – indicando que a produção de ERs mitocondriais pelo AlCl_3 não foi capaz de causar disfunções mitocondriais que reduzissem a expressão deste gene, nem mesmo levou a uma resposta adaptativa baseada no aumento de sua expressão. O mesmo padrão é observado quanto aos resultados da expressão do gene *nrf2*, o qual é responsável pela síntese do Nrf2, um dos principais reguladores da resposta antioxidante celular, e que comumente apresenta um aumento de sua expressão quando a célula está sob estresse oxidativo. A inabilidade do AlCl_3 aumentar a expressão de *nrf2* reforça a hipótese de que o principal mecanismo que levou ao aumento de TBARS é a ação direta do Al sobre o desenvolvimento da peroxidação lipídica. Tal resultado ainda esclarece por que o AlCl_3 não promoveu alterações na expressão do gene *ho-1* – codificador da heme oxigenase 1 -, visto que o Nrf2 é o principal regulador da transcrição de uma ampla rede de genes de defesa, dentre os quais inclui *ho-1* (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

Manna e Chakraborty (2025) relataram o aumento da atividade catalítica de monoaminoxidases (MAO) em encéfalos de peixes-zebra adultos expostos por 28 dias a 9,97 mg/L de AlCl_3 (aproximadamente 75 μM). Esse efeito pode estar associado a maior produção de H_2O_2 , favorecendo o acúmulo dessa ER e, conseqüentemente, o desenvolvimento de peroxidação lipídica. Embora Manna e Chakraborty (2025) não tenham avaliado parâmetros de estresse oxidativo, estudos em ratos indicam que a exposição ao AlCl_3 está associada tanto ao aumento da atividade de MAO quanto à elevação de parâmetros de estresse oxidativo, incluindo maior produção de MDA (FENG et al., 2025).

Contudo, investigações futuras acerca da atividade de outras enzimas antioxidantes são fundamentais para a compreensão mais ampla dos mecanismos de ação antioxidante do OENC *in vivo*. Entre elas, destacam-se a própria GPx, a glutathione-S-transferase (GST), a GR e a SOD, podendo ainda avaliar a atividade de MAO, a qual pode servir como parâmetro de neurotoxicidade tanto pela sua atividade pró-oxidante, quanto pela ação catalítica sobre catecolaminas. Cabe ressaltar que, neste trabalho, buscou-se avaliar a atividade da SOD; entretanto, devido a incompatibilidades metodológicas, não foi possível obter sua quantificação de forma satisfatória. Metodologias de avaliação antioxidante *in vitro*, como a de neutralização de $\bullet\text{OH}$ e atividade quelante de Fe^{3+} , também podem trazer uma visão mais ampla sobre a

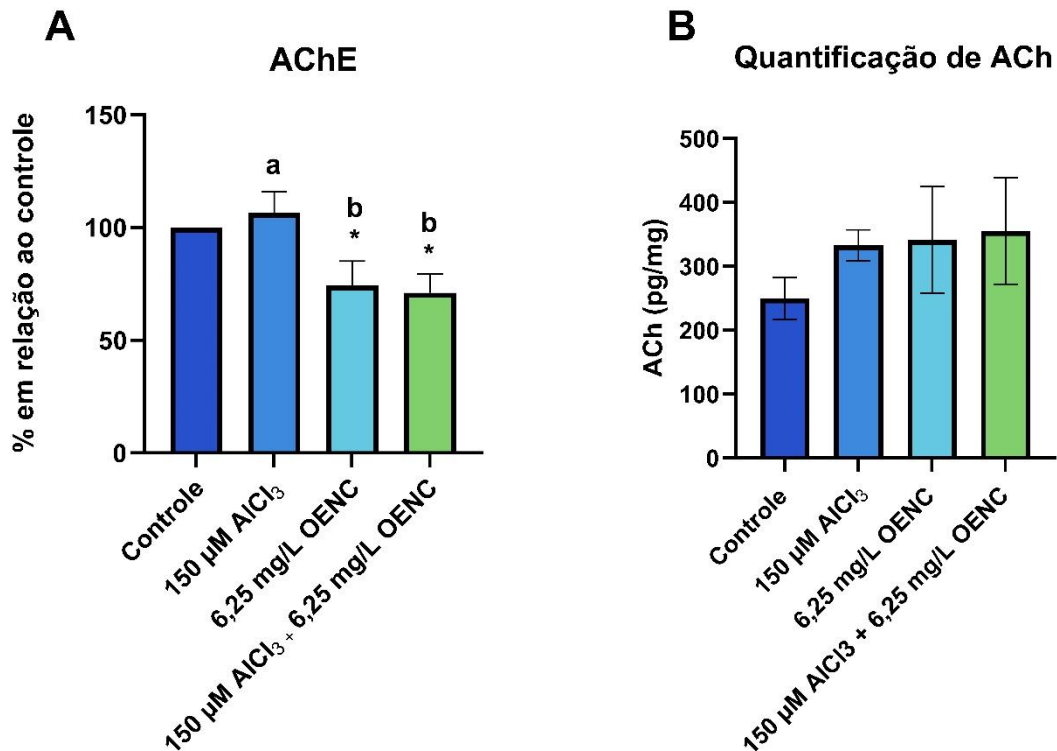
atividade do OENC na redução da produção de TBARS quando induzido tal processo por AlCl_3 .

5.4.2 Avaliação da atividade anticolinesterásica *in vivo* do óleo essencial de *N. cataria*

Dando continuidade a avaliação do potencial protetor do OENC, avaliou-se sua atividade anticolinesterásica no modelo de exposição aguda ao AlCl_3 . Conforme o que pode ser observado na Figura 16, os animais tratados com AlCl_3 ($106,60 \pm 9,21$) não apresentaram qualquer alteração da atividade da AChE quando comparados aos animais do grupo controle. Tanto os animais tratados isoladamente com OENC ($74,27 \pm 10,79$, $p < 0,05$), quanto aqueles que receberam o OENC combinado ao AlCl_3 ($71,04 \pm 8,35$, $p < 0,05$), apresentaram redução da atividade da enzima quando comparados ao controle e ao grupo que recebeu somente AlCl_3 . Não foi observada diferença significativa entre os dois grupos experimentais que receberam OENC. Esse resultado mostra que apesar do AlCl_3 não apresentar sua conhecida capacidade de aumentar a atividade da AChE, o OENC, por sua vez, demonstrou capacidade *per se* de modular a atividade da enzima, reduzindo sua atividade catalítica sobre a ACh.

Figura 16 - Atividade de AChE e quantificação dos níveis de ACh em larvas de peixe-zebra após 48 h de exposição aos

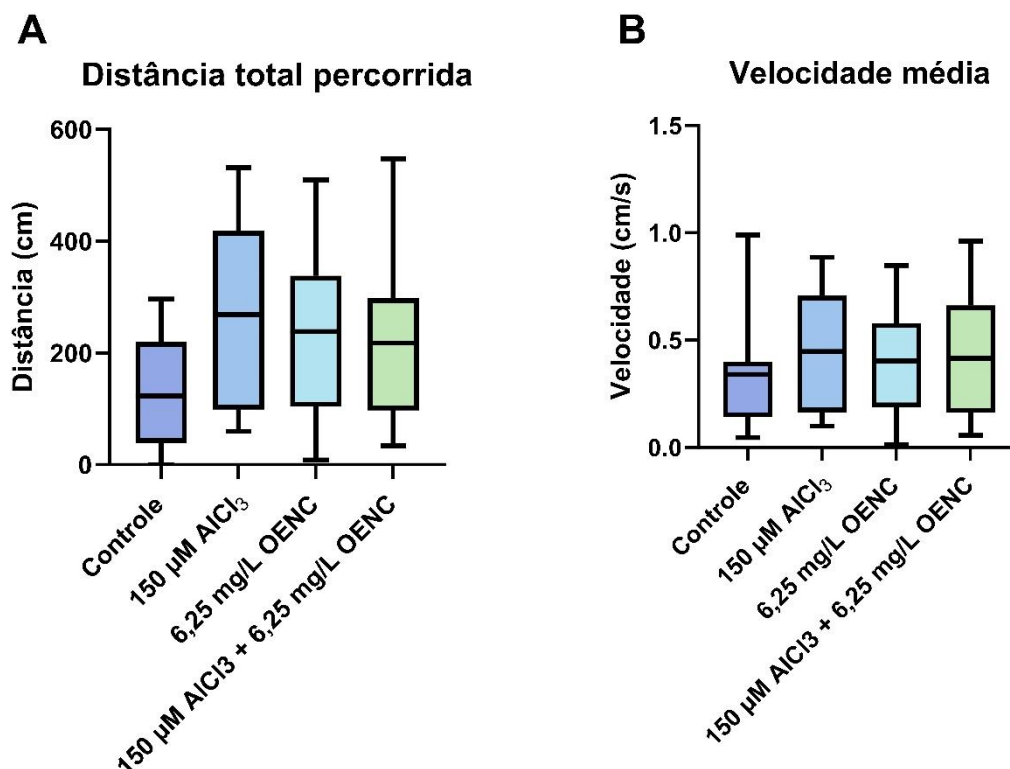
tratamentos



Atividade de AChE (A); e quantificação de ACh (B). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de três (B) ou quatro (A) experimentos independentes. Asteriscos sobre as barras indicam diferenças significativas dos respectivos tratamentos em relação ao grupo controle, com base em comparações de contrastes simples das médias marginais estimadas (EMMs): *: $p < 0,05$; Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas entre os tratamentos, de acordo com comparações múltiplas de Tukey das médias marginais estimadas (EMMs)

A quantificação dos níveis de ACh através de CL-EM (Figura 16), revelou que nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar significativamente os níveis do neurotransmissor. Além disso, o mesmo padrão foi observado em relação ao ensaio de avaliação comportamental, o qual revelou que não houve diferença significativa entre os grupos quanto aos parâmetros de distância total percorrida e velocidade média (Figura 17).

Figura 17 - Parâmetros comportamentais de distância total percorrida e velocidade média das larvas de peixe-zebra após 48 h de exposição aos tratamentos



Distância total percorrida (A); e velocidade média (B). Os dados são expressos como média $\pm$ EPM de 15 experimentos independentes (n=15).

Embora estudos prévios utilizando larvas de peixe-zebra tenham reportado aumento da atividade de AChE após exposição ao AlCl₃ sob as mesmas condições de concentração, pH, tempo e estágio de desenvolvimento, tais efeitos não foram observados neste trabalho (CHEN et al., 2022; UVARAJAN et al., 2025). Uma possível explicação está relacionada às diferenças metodológicas adotadas no preparo dos homogenatos para avaliação enzimática. Inicialmente, tentou-se utilizar PBS pH 7,4 como tampão de extração, conforme descrito na literatura (CHEN et al., 2022; UVARAJAN et al., 2025). No entanto, as concentrações proteicas obtidas foram muito baixas, inviabilizando as análises bioquímicas. Para contornar esse problema, optou-se por um tampão alternativo contendo Tris-HCl, NaCl, ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e Triton X-100, que possibilitou maior recuperação de proteínas totais. Embora necessária, essa modificação pode ter influenciado a estabilidade e a atividade mensurada da AChE. O EDTA atua como agente quelante e é capaz de formar um complexo altamente estável com Al³⁺ (Al-EDTA, log K $\approx$ 16,4), reduzindo a concentração do íon livre no homogenato (HARRIS, 2007). Consequentemente, sugere-se que o sequestro do Al diminuiu a estimulação da atividade

enzimática via interação direta do Al^{3+} livre no homogenato com o sítio aniônico periférico da AChE, enquanto os trabalhos que utilizaram PBS pH 7,4 como tampão de lise podem ter preservado maiores concentrações do íon livre, permitindo a observação do efeito esperado (GULYA; RAKONCZAY; KÁSA, 1990). Isso fez com que, devido à ausência do efeito estimulatório sobre a AChE esperado por parte de AlCl_3 , não fosse possível determinar a capacidade protetora do OENC contra esse efeito.

Por outro lado, o OENC reduziu a atividade de AChE tanto isoladamente quanto em combinação com AlCl_3 , indicando que apresenta atividade anticolinesterásica *per se*. Tal redução não foi acompanhada por mudanças significativas nos níveis de ACh, sugerindo que a diminuição da atividade enzimática da AChE não se traduziu diretamente no aumento da concentração deste neurotransmissor. Esse fato pode ser explicado pelo curto período de exposição (48 h), que provavelmente não foi suficiente para gerar acúmulo mensurável de ACh. Além disso, a liberação de ACh nas sinapses é controlada por múltiplos estímulos e mecanismos regulatórios, entre eles a geração do potencial de ação que é necessário para a abertura dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem e que permitem a entrada de Ca^{2+} necessário para a fusão das vesículas colinérgicas com a membrana plasmática do terminal sináptico (DITTRICH; HOMAN; MERINEY, 2018). Portanto, uma diminuição na atividade da AChE nem sempre se traduz em aumento imediato dos níveis do neurotransmissor ACh.

Outro fator que pode ter contribuído para a falta de alteração nos níveis da ACh foi o fato de optarmos pela utilização das larvas inteiras para a obtenção dos homogenatos e não somente da cabeça dos animais como descrito em outros trabalhos (UVARAJAN et al., 2025). Essa decisão decorreu de testes preliminares, nos quais não foi possível detectar atividade mensurável de AChE por espectrofotometria (ver item 4.4.8) utilizando apenas homogenatos de cabeça. Mesmo quando volumes de amostra equivalentes a até 10 μg de proteína foram aplicados, os sinais obtidos foram insuficientes para quantificação confiável. A tentativa de empregar concentrações proteicas superiores a esse limite resultou em elevada turbidez do meio de reação, prejudicando a leitura espectrofotométrica. Assim, a utilização do corpo inteiro das larvas mostrou-se necessária para garantir recuperação de uma concentração adequada de enzima, embora se reconheça que o uso dessa estratégia faz com que se inclua frações não-neurais nas amostras, o que pode introduzir variabilidade e diluir potenciais alterações específicas do SNC, o que pode ser levantado como uma das possíveis causas da não observação de alteração nos níveis de ACh.

A avaliação comportamental também não revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais. Embora os animais tratados com OENC tenham apresentado redução na

atividade de AChE, tal alteração não se refletiu em mudanças na atividade locomotora, o que está de acordo com a ausência de alterações dos níveis de ACh. Sugere-se, assim, que a diminuição da atividade enzimática não se traduziu diretamente em alterações comportamentais. Giacomini et al. (2020) verificaram resultados semelhantes, observando que peixes-zebra tratados com baixas concentrações de DPZ, apresentaram redução da atividade enzimática sem alteração significativa da locomoção, efeito que só se tornou evidente na maior concentração testada, quando os animais apresentaram atividade locomotora reduzida. Estudos com inibidores potentes da atividade de AChE, como aqueles da classe dos carbamatos e organofosforados, mostram que a intensa redução da hidrólise da ACh leva à dessensibilização e bloqueio funcional dos receptores colinérgicos pós-sinápticos devido ao acúmulo do neurotransmissor na fenda sináptica (YEN et al., 2011; KOENIG et al., 2016). Apesar das limitações que impediram avaliar o potencial protetor do OENC frente à hiperestimulação de AChE por $AlCl_3$, foi possível observar que o OENC apresenta atividade anticolinesterásica basal, a qual inclusive se apresenta segura, visto que a inibição da atividade de AChE não foi suficiente para alterar os níveis de ACh e consequentemente não causou impactos à atividade locomotora dos animais. Apesar disso, exposições prolongadas são necessárias para determinar se essas características se mantêm por períodos superiores a 48 h.

Satish (2013) verificou que o OENC foi capaz de proteger ratos dos efeitos deletérios causados por um modelo de neurotoxicidade induzido por escopolamina, sendo capaz de atenuar o aumento da atividade de AChE proporcionado pela escopolamina, além de preservar parâmetros cognitivos em avaliações comportamentais. Apesar disso, o óleo essencial do trabalho citado não foi caracterizado quanto a sua composição, o que impede maiores comparações ao que foi observado no presente trabalho.

Dentre os componentes caracterizados no OENC, a literatura traz até o momento que somente o β -pineno apresenta atividade anticolinesterásica *in vivo* de maneira isolada. Dahiya et al. (2025) verificaram que o β -pineno foi capaz de atenuar os efeitos colinotóxicos causados por um modelo de toxicidade com estreptozotocina em ratos. No trabalho, β -pineno apresentou redução da atividade de AChE de forma similar ao controle positivo com galantamina, e somado a isso, ainda protegeu os animais contra efeitos comportamentais relacionados ao decréscimo da cognição. Apesar de não apresentar atividade anticolinesterásica *in vivo*, o α -pineno e (-)-trans-cariofileno apresentam atividade anticolinesterásica *in vitro* quando avaliados de forma isolada (HUNG et al., 2022). Tais resultados demonstram que alguns dos compostos do OENC podem estar por trás da atividade anticolinesterásica relatada neste trabalho.

Contudo, nenhum dos estereoisômeros de nepetalactonas, nem o globulol foram caracterizados quanto a sua atividade anticolinesterásica até o momento.

A avaliação da atividade anticolinesterásica de produtos naturais tem grande relevância farmacológica, uma vez que a inibição das enzimas acetilcolinesterase AChE está diretamente relacionada à melhora dos sintomas cognitivos em doenças neurodegenerativas, como a DA e DP (GAJENDRA et al., 2024). Diversos metabólitos secundários de origem vegetal, incluindo alcaloides, terpenoides, flavonoides e cumarinas, têm demonstrado potencial inibitório significativo sobre AChE, com vantagem adicional de apresentarem menor chance de desenvolver efeitos adversos e maior diversidade estrutural em relação aos fármacos sintéticos atualmente utilizados (como donepezila e rivastigmina) (ALNASSER et al., 2025). Assim, o presente trabalho aponta que devido a sua atividade anticolinesterásica *per se*, o OENC se mostra como um prospecto para futuros trabalhos quanto a sua atividade como agente neuroprotetor.

Em conjunto, os resultados indicam que o OENC apresenta importante capacidade antioxidante *in vitro*, provavelmente relacionada ao globulol, e possivelmente a outros compostos não caracterizados neste estudo. Esse potencial antioxidante *in vivo* não pôde ser totalmente evidenciado no modelo de exposição aguda ao AlCl_3 em larvas de peixes-zebra, considerando que o AlCl_3 não produziu alterações detectáveis na maioria dos parâmetros de estresse oxidativo avaliados (à exceção do TBARS). Por outro lado, este estudo evidencia o potencial anticolinesterásico *per se* do OENC, o qual requer estudos posteriores para a completa compreensão deste efeito em um modelo experimental mais efetivo na indução de alterações na atividade da AChE. Considerando modelos de indução utilizando o AlCl_3 , estudos futuros poderiam investigar tampões alternativos que preservem tanto a recuperação proteica quanto a fração de Al^{3+} livre, além de avaliar períodos de exposição mais prolongados ao AlCl_3 e/ou OENC para identificar possíveis alterações comportamentais cumulativas.

5.4.3 Análise de *docking* molecular dos componentes do óleo essencial de *N. cataria* à acetilcolinesterase de *D. rerio*

Visando clarificar os mecanismos em que OENC atua na promoção da atividade anticolinesterásica, buscou-se determinar as possíveis interações de seus compostos com o sítio ativo da zAChE.

O DPZ foi utilizado como molécula inibidora de referência e apresentou uma energia de ligação de $-8,5$ kcal/M, menor do que a observada para os ligantes testados em *dockings*

moleculares com hAChE. Esse resultado sugere que o DPZ apresenta maior estabilidade e especificidade na sua ligação com hAChE, provavelmente devido às diferenças constitucionais das duas enzimas (NEGRU et al., 2025). A comparação evidencia como variações na arquitetura do sítio ativo podem influenciar a energia de ligação e a estabilidade prevista do complexo enzima-ligante, o que possivelmente se reflete nos resultados obtidos nas simulações com os componentes do OENC (Tabela 4). Todavia, o DPZ apresentou ampla variedade de interações com resíduos-chave de zAChE (Quadro 1 e Figura 18A). Todas as interações relatadas a seguir estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da zAChE obtidas através das simulações de *docking* molecular

Ligante	Pontes de hidrogênio	Interações hidrofóbicas	Interações π - π
Donepezila	Ser311 (2,2; e 3,0 Å)	Trp304 (3,3; 3,4; e 3,9 Å) Leu307 (3,88 Å) Phe315 (3,6 Å) Tyr355 (3,7 Å) Tyr359 (3,3 Å)	Phe356 (4,7 Å)
Globulol	Phe313 (2,7 Å) Arg314 (2,2; e 2,6 Å)	Trp304 (3,5; e 3,7 Å) Phe315 (3,6 Å) Phe356 (3,5 Å) Tyr359 (3,9 Å)	-
(-)-trans-cariofileno	-	Trp304 (3,7; e 3,7 Å) Phe315 (3,7 Å) Tyr355 (3,7 Å) Phe356 (3,4; e 3,8 Å) Tyr359 (3,8 Å)	-
4 α ,7 α ,7 α -nepetalactona	Tyr155 (2,4 Å) Glu224 (2,7; e 3,2 Å)	Trp108 (3,6; e 3,7 Å) Tyr355 (3,7 Å)	-
4 α ,7 α ,7 β -nepetalactona	Trp108 (3,5; 3,7; 3,7; 3,8; e 4,0 Å)	Tyr155 (2,3 Å)	-
4 α ,7 β ,7 α -nepetalactona	Gly143 (3,2 Å)	Trp108 (3,6; e 3,8 Å) Tyr155 (3,5; e 3,7 Å) Phe356 (3,6 Å)	-
α -pineno	-	Trp108 (3,7; 3,7; e 3,8 Å) Tyr355 (3,9 Å)	-
β -pineno	-	Trp108 (3,7; 3,8; e 3,8 Å) Tyr355 (3,8 Å)	-

As medidas de distância das pontes de hidrogênio correspondem à distância entre os átomos de hidrogênio e os aceptores.

Tabela 4 – Energia de ligação entre os ligantes e a zAChE obtidas através das simulações de *docking* molecular

Ligantes	Energia de ligação estimada (kcal/M)
Donepezila	-8,5
Globulol	-8,7
(-)-trans-cariofileno	-7,7
4 α ,7 α ,7 α -nepetalactona	-7,5
4 α ,7 α ,7 β -nepetalactona	-7,3
4 α ,7 β ,7 α -nepetalactona	-7,0
α -pineno	-6,5
β -pineno	-6,5

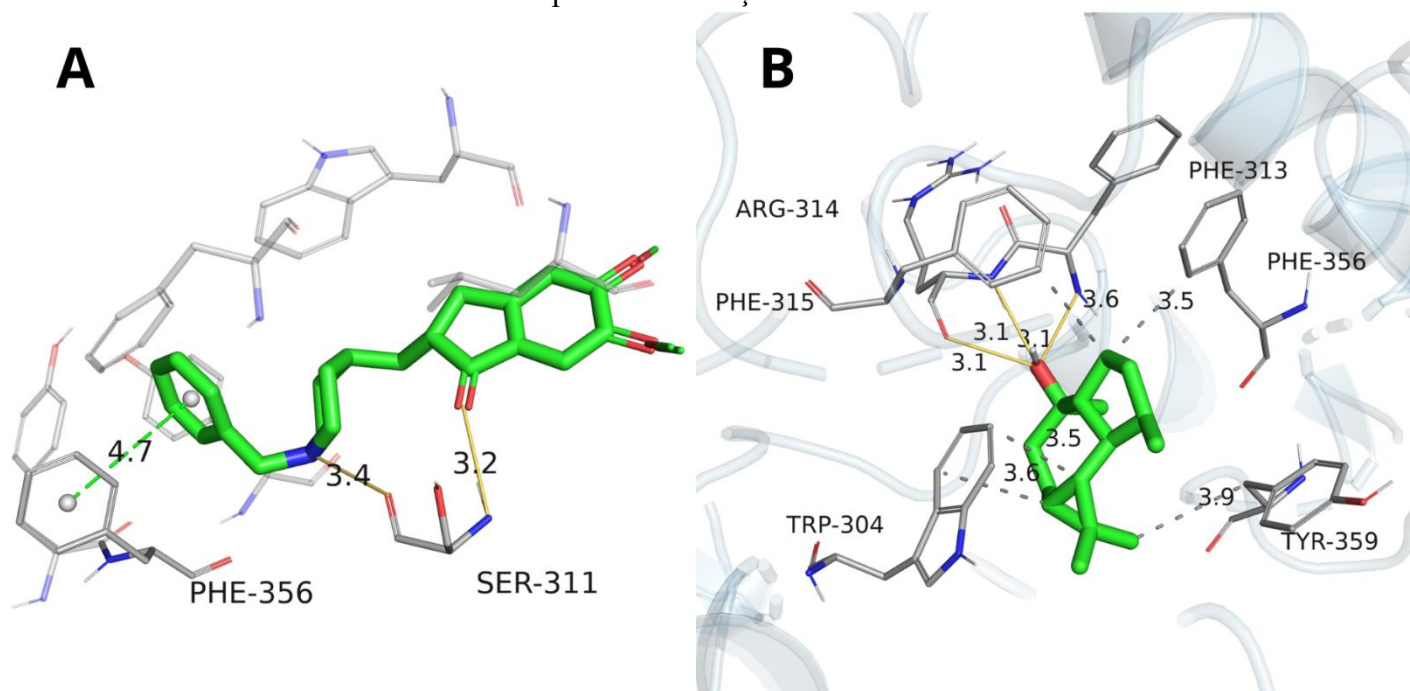
Os valores são referentes à energia de ligação da melhor pose obtida da simulação de *docking* para cada estrutura molecular.

Quadro 2 - Aminoácidos equivalentes entre zAChE e hAChE

Resíduo zAChE (UniProt: Q9DDE3)	Resíduo hAChE (PDB: 4EY7)	Domínio do sítio ativo
Ser225	Ser203*	Tríade catalítica (TC)
Phe313 Phe315	Phe295* Phe297*	Bolso acílico (BA)
Trp304 Tyr359	Trp286* Tyr341*	Sítio aniônico periférico (SAP)
Trp108 Glu224 Tyr355 Tyr155	Trp86* Glu202* Tyr337* Tyr133**	Sítio aniônico catalítico (SAC)
Gly143	Gly121***	Buraco do oxianion (BO)

*: Rawat et al. (2024); **: Peitzika et al. (2023); e Kuzu et al. (2019). Foram descritos somente os resíduos citados no texto, quadros e figuras.

Figura 18 – Arranjo tridimensional das estruturas moleculares do DPZ (A) e globulol (B) e suas respectivas interações com a zAChE



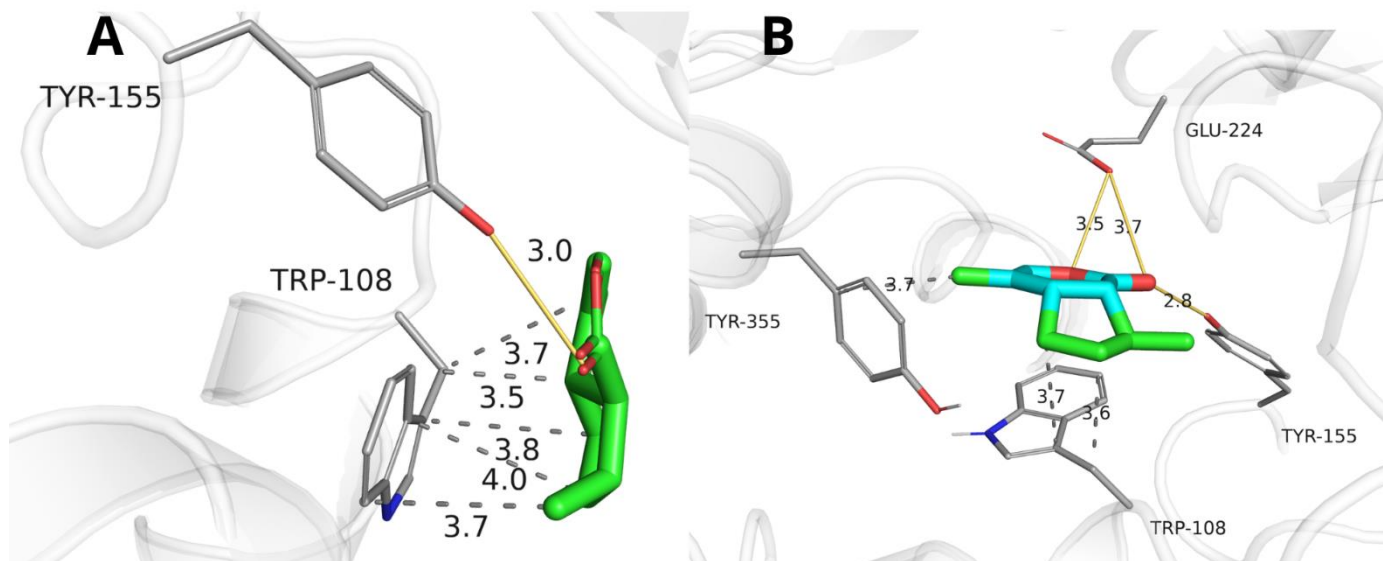
Os valores apresentados nas imagens são relativos à distância em Å das interações. As distâncias apresentadas para as pontes de hidrogênio (linhas contínuas amarelas entre as moléculas/resíduos) representam os valores entre os átomos doadores de hidrogênio e seus aceptores (valores diferentes aos do Quadro 2); as linhas descontínuas em cinza representam os contatos hidrofóbicos; e as linhas descontínuas em verde marcam as interações π - π .

O globulol destacou-se como o componente do OENC com a menor energia de ligação estimada (-8,7 kcal/M), formando uma ligação com o sítio ativo da zAChE de forma mais estável que o próprio DPZ. As interações do globulol com a zAChE explicam esse resultado, uma vez que seu grupo hidroxila forma pontes de hidrogênio muito próximas aos resíduos de Phe313 e Arg314 (Quadro 1 e Figura 18B). Baseado no alinhamento feito entre as estruturas de zAChE e hAChE (disponível no Quadro 2), o resíduo Phe313 da zAChE é o equivalente estrutural direto de Phe295, localizado no bolso acílico (BA) do sítio catalítico da hAChE, onde atua junto a Phe315 (equivalente a Phe297 da hAChE) na relação de especificidade da enzima com o substrato e inibidores (RAMACHANDRAN et al., 2023; RAWAT et al., 2024). O globulol por sua vez estabeleceu interações hidrofóbicas com o resíduo de Phe315, sugerindo que apresenta especificidade de ligação à zAChE, assim como inibidores clássicos, como o próprio DPZ, o qual também interagiu hidrofobicamente com este resíduo. Além disso, o globulol formou contatos hidrofóbicos com resíduos importantes, como Trp304 e Tyr359, os quais compõem o sítio aniônico periférico (SAP) que dá acesso ao sítio catalítico da enzima

(PEITZIKA; PONTIKI, 2023). O conjunto de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio entre o globulol e a zAChE revelam a estabilidade desse complexo enzima-ligante, mesmo que até o momento não tenham sido encontrados trabalhos que relatam a atividade anticolinesterásica *in vitro* ou *in vivo* por parte do globulol, nem mesmo em ensaios *in silico* – incluindo a AChE de outras espécies.

As nepetalactonas foram caracterizadas como os principais constituintes do OENC (somadas representam 89,70% do total de compostos caracterizados). Seu esteroisômero majoritário (77,84%), a 4 α ,7 α ,7 β -nepetalactona apresentou energia de ligação estimada em -7,3 kcal/mol (Tabela 4). O composto estabeleceu interações hidrofóbicas com o resíduo de Trp108 (ligante apresentou cinco pontos de interação com o resíduo), além de uma ponte de hidrogênio com Tyr155, ambos pertencentes ao sítio aniônico catalítico (SAC) da zAChE (Figura 19A). A 4 α ,7 α ,7 α -nepetalactona por sua vez apresentou energia de ligação de -7,5 kcal/M (Tabela 4) e estabeleceu pontes de hidrogênio com Tyr155 e Glu224, ambos componentes SAC. Tanto a 4 α ,7 α ,7 α -nepetalactona quanto a 4 α ,7 β ,7 α -nepetalactona formaram contatos hidrofóbicos com Trp108 (dois pontos de contato diferentes em ambos os ligantes) e Tyr355 (Quadro 1, Figuras 19B e 20A). A 4 α ,7 β ,7 α -nepetalactona por sua vez (-7,0 kcal/M), apresentou a formação de ponte de hidrogênio com o resíduo de Gly143, que compõe o buraco do oxianion (BO), região que através de pontes de hidrogênio estabiliza o oxianion formado pelo ataque de Ser225, componente da tríade catalítica (TC), sobre a carbonila da ACh durante sua catálise (PEITZIKA; PONTIKI, 2023; RAWAT et al., 2024). Dessa forma, embora até o momento não tenham sido encontrados dados que confirmem a atividade anticolinesterásica das nepetalactonas, os resultados da presente avaliação sugerem que estas moléculas são capazes de formar complexos estáveis com a zAChE, hipótese que pode contribuir para explicar a atividade anticolinesterásica de OENC observada *in vivo* no presente estudo.

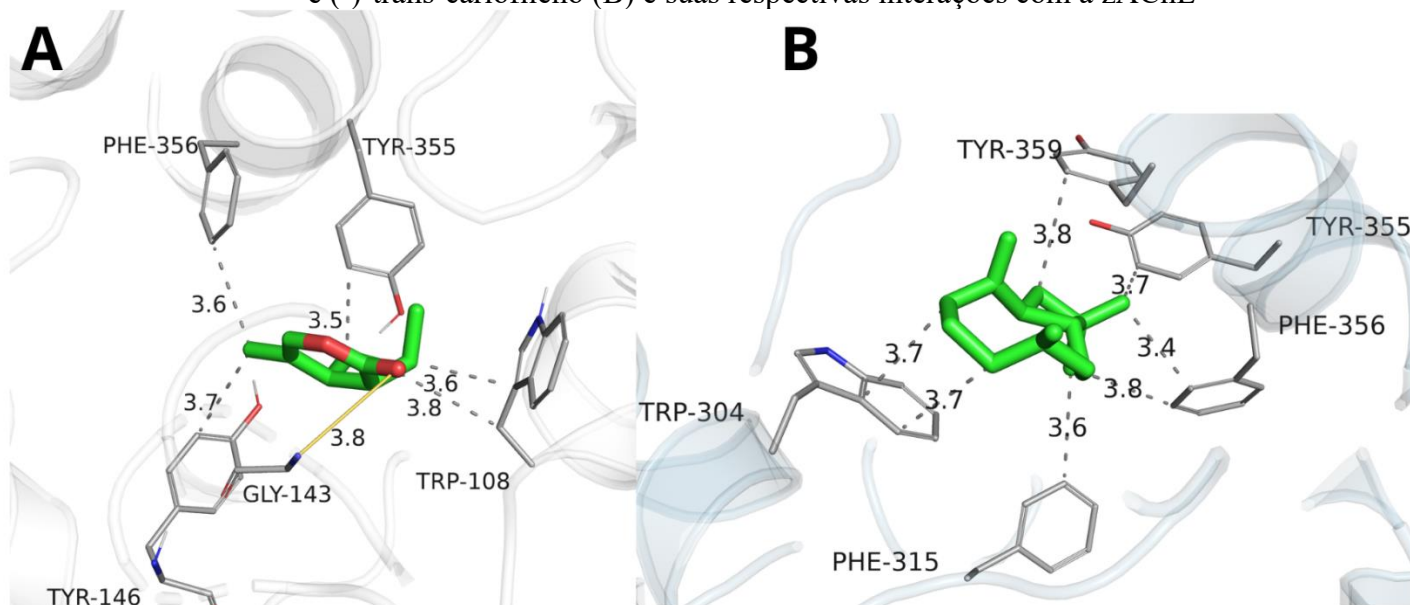
Figura 19 - Arranjo tridimensional das estruturas moleculares da 4 α ,7 α ,7 β -nepetalactona (A) e 4 α ,7 α ,7 α -nepetalactona (B) e suas respectivas interações com a zAChE



Os valores apresentados nas imagens são relativos à distância em Å das interações. As distâncias apresentadas para as pontes de hidrogênio (linhas contínuas amarelas entre as moléculas/resíduos) representam os valores entre os átomos doadores de hidrogênio e seus aceptores (valores diferentes aos do Quadro 2); as linhas descontínuas em cinza representam os contatos hidrofóbicos.

O (-)-trans-cariofileno apresentou uma energia de ligação estimada em -7,7 kcal/M, inferior a das nepetalactonas. O composto não formou quaisquer pontes de hidrogênio com a zAChE, no entanto apresentou uma série de interações hidrofóbicas com resíduos do sítio ativo da enzima, incluindo Trp304 e Tyr359, componentes do SAP, e Tyr355, componente do SAC, além de Phe315 do BA (Figura 20B). Hung et al. (2022) demonstraram em simulações de *docking* molecular que o (-)-trans-cariofileno também apresentou interações apolares com os resíduos equivalentes de Trp304 e Phe315 em hAChE (Quadro 2). Este composto por sua vez apresentou atividade anticolinesterásica *in vitro* em diferentes oportunidades (SAVELEV; OKELLO; PERRY, 2004; BONESI et al., 2010; KARAKAYA et al., 2020; HUNG et al., 2022).

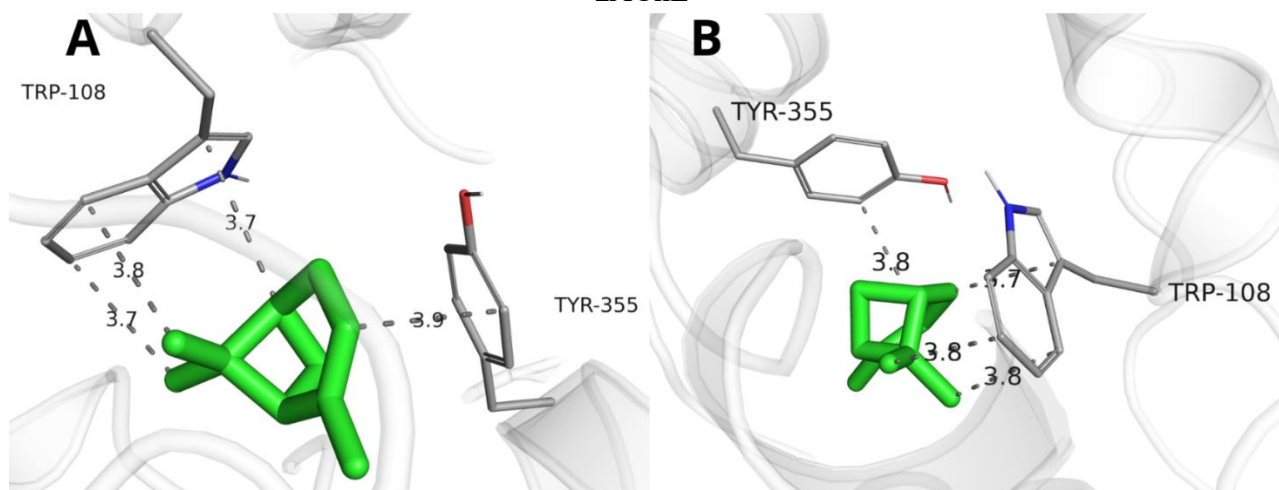
Figura 20 - Arranjo tridimensional das estruturas moleculares da 4 α ,7 β ,7 α -nepetalactona (A) e (-)-trans-cariofileno (B) e suas respectivas interações com a zAChE



Os valores apresentados nas imagens são relativos à distância em Å das interações. As distâncias apresentadas para as pontes de hidrogênio (linhas contínuas amarelas entre as moléculas/resíduos) representam os valores entre os átomos doadores de hidrogênio e seus aceptores (valores diferentes aos do Quadro 2); as linhas descontínuas em cinza representam os contatos hidrofóbicos.

Tanto α - quanto β -pineno apresentaram inabilidade de formar pontes de hidrogênio com zAChE, no entanto ainda foram capazes de interagir de forma hidrofóbica com os resíduos Trp108 (ambos formaram três possíveis pontos de interação com o resíduo) e Tyr355, componentes estruturais do SAC (Figura 21). As poucas interações explicam o fato dos compostos em questão apresentarem as maiores energias de ligação, ambos com -6,5 kcal/M.

Figura 21 - Arranjo tridimensional das estruturas moleculares do α -pineno (A) e β -pineno (B) e suas respectivas interações com a zAChE



Os valores apresentados nas imagens são relativos à distância em Å das interações. As linhas descontínuas em cinza representam os contatos hidrofóbicos.

Os achados *in silico* apresentados fornecem um modelo hipotético plausível para a atividade anticolinesterásica de OENC observada *in vivo*. A análise indica que seus constituintes foram capazes de estabelecer interações favoráveis com resíduos-chave do sítio ativo da zAChE, potencialmente bloqueando a entrada e catálise da ACh.

Um aspecto crítico a ser considerado é que a estrutura enzimática utilizada neste estudo não foi co-cristalizada com um ligante/inibidor conhecido até o momento. Isso impediu a realização do *redocking* molecular, técnica na qual o ligante nativo (o mesmo que foi co-cristalizado) é reancorado em seu próprio sítio de cristalização e que é essencial para validar a precisão do protocolo computacional. Para suprir tais carências, simulações de dinâmica molecular são demandadas para que se possa validar o protocolo. Outra possibilidade de contorno a esse problema é a utilização de uma estrutura molecular de AChE já co-cristalizada, oriunda de outro organismo, apesar da perda da especificidade devido às diferenças constitucionais da molécula entre diferentes espécies.

Em suma, os resultados da presente avaliação têm caráter preditivo e exploratório, servindo como um guia inicial para hipóteses de trabalhos futuros, mas a confirmação do mecanismo de ação proposto está condicionada às validações futuras

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que o OENC possui um perfil promissor de atividade antioxidante principalmente *in vitro* e anticolinesterásica *in vivo*. As avaliações *in vitro* revelaram seu potencial em atuar por diferentes mecanismos antioxidantes, enquanto em larvas de peixe-zebra, o óleo demonstrou capacidade em mitigar o aumento da peroxidação lipídica sob exposição concomitante ao AlCl_3 , sugerindo efeitos protetores contra o estresse oxidativo neste modelo. De forma independente, o OENC também apresentou atividade anticolinesterásica intrínseca *in vivo*, evidenciando um possível papel modulador na neurotransmissão colinérgica. Esses achados não apenas sugerem o potencial terapêutico do OENC e de seus compostos, mas também fornecem bases para investigações futuras voltadas à elucidação de seus mecanismos moleculares de ação, otimização de doses/concentrações eficazes e avaliação de sua eficácia em modelos *in vivo* de indução de fenótipos relacionados ao estresse oxidativo e à disfunção colinérgica. Entretanto, tomando como base os resultados dos ensaios de toxicidade aguda do óleo realizados neste estudo, ressaltamos que o uso do OENC requer avaliações de sua toxicidade previamente à avaliação do seu potencial farmacológico nos modelos *in vivo* selecionados.

7 REFERÊNCIAS

ACÍMOVIĆ, M. et al. CHEMICAL PROFILE OF *Nepeta cataria* L. var. *Citriodora* (Becker) ESSENTIAL OIL AND in vitro EVALUATION OF BIOLOGICAL ACTIVITIES. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v. 21, n. 4, p. 67–74, 2022.

ADAMS, R. P. IDENTIFICATION OF ESSENTIAL OIL COMPONENTS BY GAS CHROMATOGRAPHY/ MASS SPECTROMETRY, ed. 4.1. [s.d.]

ADIGUZEL, A. et al. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extract of *Nepeta cataria*. v. 58, n. 1, 2009.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1 jan. 1984. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6727660/>>. Acesso em: 4 set. 2022.

ALNASSER, M. N. et al. Cholinesterase Inhibitors from Plants and Their Potential in Alzheimer's Treatment: Systematic Review. **Brain Sciences**, v. 15, n. 2, p. 215, 1 fev. 2025. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11852592/>>. Acesso em: 14 out. 2025.

AMINI, S. et al. Biological activity of some essential oil constituents in four *Nepeta* L. species against *Sitophilus oryzae* L. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 20, n. 2, p. 338–343, 21 jan. 2019. Disponível em: <<https://smujo.id/biodiv/article/view/3445>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

ANDERSEN, J. V. et al. Deficient astrocyte metabolism impairs glutamine synthesis and neurotransmitter homeostasis in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 148, p. 105198, 1 jan. 2021.

ASHRAFI, B. Biological activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta cataria* L. v. 23, n. 2, p. 336–343, 2019.

ASHRAFI, B. et al. Biological activity and chemical composition of the essential oil of *Nepeta cataria* L. **Marmara Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 2, p. 336–343, 2019.

AZIZIAN, T. et al. Phytochemical analysis of selected *Nepeta* species by HPLC - ESI - MS / MS and GC – MS methods and exploring their antioxidant and antifungal potentials. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, n. 3, p. 2417–2429, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11694-021-00819-8>>.

BAI, C.; TANG, M. Toxicological study of metal and metal oxide nanoparticles in zebrafish. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 37–63, 1 jan. 2020. Disponível em: <[doi/pdf/10.1002/jat.3910](https://doi.org/10.1002/jat.3910)>. Acesso em: 8 ago. 2025.

BARANAUSKIENĖ, R. et al. Essential oil composition of five *Nepeta* species cultivated in Lithuania and evaluation of their bioactivities, toxicity and antioxidant potential of hydrodistillation residues. **Food and Chemical Toxicology**, v. 129, p. 269–280, jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691519302388>>.

BENTAYEB, K. et al. The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: The case of essential oils. **Food Chemistry**, v. 148, p. 204–208, 1 abr. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613014714?ref=pdf_download&fr=RR-2&rr=96f5ca908f64d833>. Acesso em: 15 ago. 2025.

BERNARDI, M. M. et al. Antidepressant-like effects of an apolar extract and chow enriched with *Nepeta cataria* (catnip) in mice. **Psychology & Neuroscience**, v. 3, n. 2, p. 251–258, 2010.

BERNARDI, M. M. et al. *Nepeta cataria* L. var. *citriodora* (Becker) increases penile erection in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1318–1322, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.061>>.

BERNARDI MM et al. Anti-nociceptive and anti-inflammatory actions of *Nepeta cataria* L. var. *citriodora* (Becker) Balb. essential oil in mice. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 28, n. February 2015, p. 289–293, 2010.

BERTRAND, C. et al. Zebrafish Acetylcholinesterase Is Encoded by a Single Gene Localized on Linkage Group 7. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 464–474, 5 jan. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11016933/>>. Acesso em: 19 set. 2025.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1939455119303709>>.

BITMEZ, B.; ÇEVRELI, B.; KAŞIKÇI, E. Effect of thymol on oxidative stress and reelin signaling pathway in Alzheimer's disease model. **Turkish Journal of Biology**, v. 48, n. 1, p. 70–79, 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38665779/>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

BOLAT, I. et al. β -Caryophyllene attenuates cadmium induced neurotoxicity in rats by modulating different cellular signaling pathways. **NeuroToxicology**, v. 108, p. 206–217, 1 maio 2025. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40233897/>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

BONESI, M. et al. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity of Pinus species essential oils and their constituents. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 622–628, out. 2010. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/14756360903389856>>. Acesso em: 19 set. 2025.

BORGES, R. M. Convergent evolution: What do cats, catnip, aphids, and mosquitoes have in common? **Journal of Biosciences**, v. 49, n. 4, p. 98, 3 dez. 2024. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s12038-024-00483-2>>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>>.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity** LWT - Food Science and Technology Academic Press, , 1 jan. 1995. .

CAI, Z. Lipid peroxidation. **Encyclopedia of Toxicology**, v. 2, n. 1979, p. 730–734, 2005.

CAPRIELLO, T. et al. Apoptosis, oxidative stress and genotoxicity in developing zebrafish after aluminium exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 236, p. 105872, jul. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X21001314>>.

CAPRIELLO, T. et al. Aluminium exposure leads to neurodegeneration and alters the expression of marker genes involved to parkinsonism in zebrafish brain. **Chemosphere**, v. 307, n. P1, p. 135752, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135752>>.

CARDWELL, A. S. et al. Chronic toxicity of aluminum, at a pH of 6, to freshwater organisms: Empirical data for the development of international regulatory standards/criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 37, n. 1, p. 36–48, 1 jul. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/etc/article/37/1/36/7739209>>. Acesso em: 24 ago. 2025.

CARIKCI, S. Characterization of *Nepeta viscida*, *N. nuda* subsp. *nuda* and the Putative Hybrid *N. × tmolea* Essential Oils. **Nat. Prod**, v. 15, p. 388–395, 2021. Disponível em: <<http://doi.org/10.25135/rnp.250.21.04.2033>>. Acesso em: 15 ago. 2025.

CHEN, S. X. et al. Essential Oils from Spices Inhibit Cholinesterase Activity and Improve Behavioral Disorder in AlCl₃ Induced Dementia. **Chemistry and Biodiversity**, v. 19, n. 1, 2022.

CHERAGHIPOUR, K. et al. Encapsulation of *Nepeta cataria* essential oils in a chitosan nanocomposite with lethality potential against *Toxoplasma gondii*. **Emergent Materials**, v. 5, n. 3, p. 653–663, 1 jun. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s42247-022-00381-z>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

CHOWDHURY, S.; SAIKIA, S. K. Use of Zebrafish as a Model Organism to Study Oxidative Stress: A Review. **Zebrafish**, v. 19, n. 5, p. 165–176, 1 out. 2022. Disponível em: <[doi/pdf/10.1089/zeb.2021.0083?download=true](https://doi.org/10.1089/zeb.2021.0083?download=true)>. Acesso em: 8 ago. 2025.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018. . Brasília. **Conselho nacional de controle de experimentação animal**). **Diretriz da prática de eutanásia**, p. 49, 2018. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf>.

DAHAM, S. S. et al. The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules** **2015**, Vol. 20, Pages 11808-11829, v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 26 jun. 2015. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/20/7/11808/htm>>. Acesso em: 14 ago. 2025.

DAHIYA, M. et al. β -pinene ameliorates ICV-STZ induced Alzheimer's pathology via antioxidant, anticholinesterase, and mitochondrial protective effects: In-silico and in-vivo studies. **European Journal of Pharmacology**, v. 991, p. 177307, 15 mar. 2025. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299925000603?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 ago. 2025.

DALLA TORRE, G. et al. The interaction of aluminum with catecholamine-based neurotransmitters: can the formation of these species be considered a potential risk factor for neurodegenerative diseases? **Dalton Transactions**, v. 48, n. 18, p. 6003–6018, 7 maio 2019. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/dt/c8dt04216k>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

DAY, J. P. et al. Aluminum absorption studied by ^{26}Al tracer. **Lancet (London, England)**, v. 337, n. 8753, p. 1345, 1 jun. 1991. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1674316/>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

DE LA ROSA, L. A. et al. Phenolic Compounds. **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**, p. 253–271, 1 jan. 2019.

DITTRICH, M.; HOMAN, A. E.; MERINEY, S. D. Presynaptic mechanisms controlling calcium-triggered transmitter release at the neuromuscular junction. **Current opinion in physiology**, v. 4, p. 15, 1 ago. 2018. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6155978/>>. Acesso em: 22 ago. 2025.

DOMINGUES, I.; GRAVATO, C. Oxidative Stress Assessment in Zebrafish Larvae. In: [s.l: s.n.]p. 477–486.

EDWARDSON, J. A. et al. Effect of silicon on gastrointestinal absorption of aluminium. **Lancet (London, England)**, v. 342, n. 8865, p. 211–212, 24 jul. 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8100932/>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

ELLMAN, G. L. Tissue sulphhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1 jul. 1961.

EMAMI, S. A. et al. Growth Inhibition and Apoptosis Induction of Essential Oils and Extracts of *Nepeta cataria* L. on Human Prostatic and Breast Cancer Cell Lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. sup3, p. 125–130, 1 jun. 2016. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=POCPA9&py=2016&vnc=v17nsup3&sp=125>>.

EXLEY, C. Human exposure to aluminium. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, n. 10, p. 1807–1816, 25 set. 2013. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2013/em/c3em00374d>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

EXLEY, C.; CHAPPELL, J. S.; BIRCHALL, J. D. A mechanism for acute aluminium toxicity in fish. **Journal of Theoretical Biology**, v. 151, n. 3, p. 417–428, 7 ago. 1991. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519305803893?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

FAN, J. et al. Mechanism of modulation through PI3K-AKT pathway about *Nepeta cataria* L.'s extract in non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 19, p. 31395–31405, 2017.

FAO; WHO. **Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**. Disponível em: <<https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/298>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

FENG, R. et al. Abnormal lipid metabolism and inflammatory response induced by aluminum led to the cognitive decline in mice. **NeuroToxicology**, v. 108, p. 281–294, 1 maio 2025. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X25000476?via%3Dihub>>. Acesso em: 17 ago. 2025.

FORMISANO, C.; RIGANO, D.; SENATORE, F. Chemical constituents and biological activities of *Nepeta* species. **Chemistry and Biodiversity**, v. 8, n. 10, p. 1783–1818, out. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22006710/>>. Acesso em: 6 ago. 2025.

GAJENDRA, K. et al. Natural acetylcholinesterase inhibitors: A multi-targeted therapeutic potential in Alzheimer's disease. **European Journal of Medicinal Chemistry Reports**, v. 11, p. 100154, 1 ago. 2024. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2772417424000268>>. Acesso em: 14 out. 2025.

GAO, X. et al. Necrostatin-1 Relieves Learning and Memory Deficits in a Zebrafish Model of Alzheimer's Disease Induced by Aluminum. **Neurotoxicity Research**, v. 40, n. 1, p. 198–214, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12640-021-00463-6>>.

GEDIKOĞLU, A.; SÖKMEN, M.; ÇIVIT, A. Evaluation of Thymus vulgaris and Thymbra spicata essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 1704–1714, 1 maio 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31139383/>>. Acesso em: 14 ago. 2025.

GIACOMINI, A. C. V. V. et al. An acetylcholinesterase inhibitor, donepezil, increases anxiety and cortisol levels in adult zebrafish. **Journal of Psychopharmacology**, v. 34, n. 12, p. 1449–1456, 2020.

GILANI, A. H. et al. Chemical composition and mechanisms underlying the spasmolytic and bronchodilatory properties of the essential oil of Nepeta cataria L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 3, p. 405–411, 2009.

GKINIS, G. et al. Antioxidant activity of nepeta nuda L. ssp. nuda essential Oil rich in Nepetalactones from Greece. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1176–1181, 1 out. 2010. Disponível em: <doi/pdf/10.1089/jmf.2009.0218?download=true>. Acesso em: 14 ago. 2025.

GORZALCZANY, S. B.; RODRIGUEZ BASSO, A. G. Strategies to apply 3Rs in preclinical testing. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 9, n. 5, p. e00863, 1 out. 2021. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8491455/>>. Acesso em: 14 out. 2025.

GRAVATO, C. et al. Acetylcholinesterase (AChE) Activity in Embryos of Zebrafish. In: [s.l: s.n.]p. 119–124.

GULYA, K.; RAKONCZAY, Z.; KÁSA, P. Cholinotoxic Effects of Aluminum in Rat Brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 54, n. 3, p. 1020–1026, 1990.

HACHEZ-LEROY, F. Aluminium in health and food: a gradual global approach. **European Review of History: Revue europeenne d'histoire**, v. 20, n. 2, p. 217–236, 1 abr. 2013. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13507486.2013.766521>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

HALLIWELL, B. et al. Free Radicals and Antioxidants in Food and In Vivo: What They Do and How They Work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, n. 1–2, p. 7–20, 1995.

HALLIWELL, B. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. June, p. 312–322, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147–1150, 1 nov. 2007. Disponível em: <<https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/35/5/1147/86015/Biochemistry-of-oxidative-stress>>.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. SUPPL. 10, p. 5–12, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. [s.l.] Oxford University Press, 2015.

HARRIS, D. C. EDTA Titrations. In: **Quantitative Chemical Analysis**. 7. ed. [s.l.] Freeman, W.H, 2007. p. 1008.

HU, Y. et al. Trans-caryophyllene inhibits amyloid β (A β) oligomer-induced neuroinflammation in BV-2 microglial cells. **International Immunopharmacology**, v. 51, n. 324, p. 91–98, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.009>>.

HUNG, N. H. et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Essential Oils from Vietnamese Traditional Medicinal Plants. **Molecules** **2022**, Vol. 27, Page 7092, v. 27, n. 20, p.

7092, 20 out. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/20/7092/htm>>. Acesso em: 22 ago. 2025.

IBRAHIM, Z. S. et al. Catnip (*Nepeta cataria* L.): Recent Advances in Pharmacognosy, Cultivation, Chemical Composition and Biological Activity. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 12, n. 4- S, p. 254–263, 2022.

KANEKO, N.; SUGIOKA, T.; SAKURAI, H. Aluminum compounds enhance lipid peroxidation in liposomes: Insight into cellular damage caused by oxidative stress. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 6, p. 967–975, 1 jun. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013407000517?via%3Dihub>>. Acesso em: 17 ago. 2025.

KARAKAYA, S. et al. A caryophyllene oxide and other potential anticholinesterase and anticancer agent in *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. (Lamiaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 32, n. 6, p. 512–525, 1 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10412905.2020.1813212>>.

KAUR, K.; NARANG, R. K.; SINGH, S. AlCl₃ induced learning and memory deficit in zebrafish. **NeuroToxicology**, v. 92, n. May, p. 67–76, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2022.07.004>>.

KAWAHARA, M. Effects of aluminum on the nervous system and its possible link with neurodegenerative diseases. <https://doi.org/10.3233/JAD-2005-8210>, v. 8, n. 2, p. 171–182, 17 nov. 2005. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.3233/jad-2005-8210?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed>. Acesso em: 4 mar. 2025.

KAWAHARA, M.; KATO-NEGISHI, M. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2011, p. 276393, 2011. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3056430/>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

KAWAHARA, M.; TANAKA, K.; KATO-NEGISHI, M. Neurotoxicity of aluminum and its link to neurodegenerative diseases. **Metallomics Research**, v. 1, n. 1, p. rev-47, 15 dez. 2021.

KAYA, A.; DEMIRCI, B.; BASER, K. H. C. Micromorphology of glandular trichomes of *Nepeta congesta* Fisch. & Mey. var. *congesta* (Lamiaceae) and chemical analysis of the essential oils. **South African Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. 29–34, 1 jan. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629906001578?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 ago. 2025.

KHODAEI, N. et al. Compositional diversity and antioxidant properties of essential oils: Predictive models. **LWT**, v. 138, p. 110684, 1 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820316728?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 ago. 2025.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Experimental Neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325–340, 30 dez. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>>. Acesso em: 16 fev. 2025.

KIM, J.-H.; JUNG, D.-H.; PARK, H.-K. The Composition of Essential Oil from *Nepeta cataria* and Its Effect on Microorganism. **Journal of Ecology and Environment**, v. 29, n. 4, p. 381–387, 30 ago. 2006. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=STHHCL&py=2006&vnc=v29n4&sp=381>>.

KOENIG, J. A. et al. Zebrafish as a model for acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus agent exposure and oxime reactivation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1374, n. 1, p. 68, 2016. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4940279/>>. Acesso em: 22 ago. 2025.

KÖKDİL, G.; KURUCU, S.; YILDIZ, A. Essential oil composition of *Nepeta nuda* L. ssp. *nuda*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 233–234, jul. 1998.

KUZU, B. et al. Mono- or di-substituted imidazole derivatives for inhibition of acetylcholine and butyrylcholine esterases. **Bioorganic Chemistry**, v. 86, p. 187–196, 1 maio 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045206818313099?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 set. 2025.

LANDSBERG, G. M.; NICHOL, J.; ARAUJO, J. A. Cognitive Dysfunction Syndrome. A Disease of Canine and Feline Brain Aging. **Veterinary Clinics of North America - Small**

Animal Practice, v. 42, n. 4, p. 749–768, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.04.003>>.

LE PODER, L. et al. Uncoupling Aluminum Toxicity From Aluminum Signals in the STOP1 Pathway. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 785791, 3 maio 2022. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 8 ago. 2025.

LI, H. et al. Research Progress of Zebrafish Model in Aquatic Ecotoxicology. **Water** **2023**, Vol. 15, Page 1735, v. 15, n. 9, p. 1735, 30 abr. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4441/15/9/1735/htm>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

LI, Y.; ZIDORN, C. Seasonal variations of natural products in European herbs. **Phytochemistry Reviews**, v. 21, n. 5, p. 1549–1575, 1 out. 2022. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11101-021-09797-7>>. Acesso em: 15 ago. 2025.

LICHMAN, B. R. et al. The evolutionary origins of the cat attractant nepetalactone in catnip. **Science Advances**, v. 6, n. 20, 1 maio 2020. Disponível em: <[doi/pdf/10.1126/sciadv.aba0721?download=true](https://doi.org/10.1126/sciadv.aba0721?download=true)>. Acesso em: 6 ago. 2025.

LIU, Z. et al. Developmental toxicity of glyphosate on embryo-larval zebrafish (Danio rerio). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 236, p. 113493, 1 maio 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651322003335?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

LUKIW, W. J. et al. Run-on gene transcription in human neocortical nuclei. Inhibition by nanomolar aluminum and implications for neurodegenerative disease. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 11, n. 1, p. 67–78, 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9826787/>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

LUKYANENKO, L. M. et al. In vitro effect of AlCl₃ on human erythrocytes: Changes in membrane morphology and functionality. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 27, n. 2, p. 160–167, 1 abr. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X1200171X?via%3Dihub>>. Acesso em: 7 set. 2025.

LÜTH, H. J.; MÜNCH, G.; ARENDT, T. Aberrant expression of NOS isoforms in Alzheimer's disease is structurally related to nitrotyrosine formation. **Brain Research**, v. 953, n. 1–2, p.

135–143, 20 nov. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12384247/>>. Acesso em: 29 jan. 2025.

MA, A. et al. Pharmacology & Clinical Research Rosmarinus officinalis L. Essential Oil Protects Astrocytes against Oxidative Damage. 2017.

MA, J. et al. Superimposed effect of plant essential oil constituents and their biomedical application. **Industrial Crops and Products**, v. 224, p. 120362, 1 fev. 2025. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669024023392>>. Acesso em: 7 ago. 2025.

MACHADO, K. da C. et al. A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 12, p. 2376–2388, 2018.

MACRAE, C. A.; PETERSON, R. T. Zebrafish as a Mainstream Model for In Vivo Systems Pharmacology and Toxicology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 63, n. Volume 63, 2023, p. 43–64, 20 jan. 2023. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-pharmtox-051421-105617>>. Acesso em: 14 out. 2025.

MALIZIA, R. A.; MOLLI, J. S.; DANIEL, A. Journal of Essential Oil Volatile Constituents of the Essential Oil of Nepeta cataria L . Grown in Cordoba Province (Argentina). n. April 2015, p. 37–41, 1996.

MANI, R. J.; MITTAL, K.; KATARE, D. P. Protective effects of quercetin in Zebrafish model of Alzheimer's disease. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 12, n. September, p. S660–S666, 2018.

MANNA, P.; CHAKRABORTY, S. B. Evaluation of neuroprotective efficacy of Terminalia bellerica and Terminalia catappa fruit extracts in zebrafish model. **Environmental and Experimental Biology**, v. 23, n. 2, p. 77–88, 2025. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/394215370_Evaluation_of_neuroprotective_efficacy_of_Terminalia_bellerica_and_Terminalia_catappa_fruit_extract_in_zebrafish_model>. Acesso em: 17 ago. 2025.

MARCON, M. et al. Prevention of unpredictable chronic stress-related phenomena in zebrafish exposed to bromazepam, fluoxetine and nortriptyline. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 21–22, p. 3815–3824, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00213-016-4408-5>>.

MCELVAIN, M. et al. The Constituents of the Volatile Oil of Catnip. 11. The Neutral Components. Nepetalic Anhydride. [s.d.]

MENG, X.-Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 11 nov. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21534921/>>. Acesso em: 19 set. 2025.

MIGUEL, M. G. et al. Antibacterial, Antioxidant, and Antiproliferative Activities of *Corymbia citriodora* and the Essential Oils of Eight Eucalyptus Species. **Medicines** **2018**, Vol. 5, Page 61, v. 5, n. 3, p. 61, 21 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2305-6320/5/3/61/htm>>. Acesso em: 15 ago. 2025.

MIMURO, M. et al. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of the Hohara focus of the Kii Peninsula: A multiple proteinopathy? **Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology**, v. 38, n. 1, p. 98–107, 1 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29063640/>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

MINOTTI, G.; AUST, S. D. The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 71, n. 1, p. 1–19, 1989.

MOHAMMADIZAD, H. A.; MEHRA FARIN, A.; NAGHDI BADI, H. Qualitative and quantitative evaluation of essential oil of Catnip (*Nepeta cataria* L.) under different drying conditions. **Journal of Medicinal Plants**, v. 16, n. 61, p. 8–20, 2017.

MOLLOVA, S. et al. Chemical Composition of Essential Oils from *Nepeta transcaucasica* Grossh. and *Nepeta cataria* L. Cultivated in Bulgaria and Their Antimicrobial and Antioxidant Activity. **ACS Omega**, v. 8, n. 17, p. 15441–15449, 2023.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785, dez. 2009. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2760638/>>. Acesso em: 19 set. 2025.

MOSHARI NASIRKANDI, A.; ALIREZALU, A.; BAHADORI, S. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Nepeta fissa* - first report from Iran. **Natural Product Research**, v. 35, n. 22, p. 4596–4599, 18 nov. 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/14786419.2019.1693566>>. Acesso em: 14 ago. 2025.

MOTAGHED, M.; NILI-AHMADABADI, A.; MORADKHANI, S. Assessment of the anti-oxidative potential of *Nepeta crispa* Willd. (Lamiaceae) and its effects on oxidative stability of virgin sunflower oil under accelerated storage conditions. 2022. Disponível em: <www.jmp.ir>. Acesso em: 14 ago. 2025.

NADEEM, A. et al. Phytochemical profiling of antimicrobial and potential antioxidant plant: *Nepeta cataria*. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.

NAGDEV, S. et al. *Nepeta cataria* L. A comprehensive review of its phytochemical and pharmacological attributes. **International Journal of Green Pharmacy (IJGP)**, v. 16, n. 4, p. 300, 2022. Disponível em: <<http://www.greenpharmacy.info/index.php/ijgp/article/view/3341>>. Acesso em: 4 ago. 2025.

NAGUIB, A. M. M. et al. Phytochemical screening of *Nepeta cataria* extracts and their invitro inhibitory effects on free radicals and carbohydrate-metabolising enzymes. **Natural Product Research**, v. 26, n. 23, p. 2196–2198, 2012.

NAPOLITANO, G. et al. Aluminum induces a stress response in zebrafish gills by influencing metabolic parameters, morphology, and redox homeostasis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 271, p. 109633, 1 set. 2023. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045623000881?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

NAZ QAISRANI, R. et al. Integrative in silico and in vitro analysis of *Pinus roxburghii* essential oil: unveiling its antioxidant, antidiabetic, and antiglycation potential. **Frontiers in Pharmacology**, v. 16, p. 1554562, 29 abr. 2025.

NEGRU, D. C. et al. Evaluation of the Alkaloids as Inhibitors of Human Acetylcholinesterase by Molecular Docking and ADME Prediction. **In Vivo**, v. 39, n. 1, p. 236, 1 jan. 2025. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11705141/>>. Acesso em: 19 set. 2025.

OCDE. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. 26 jul. 2013. Disponível em: <https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-236-fish-embryo-acute-toxicity-fet-test_9789264203709-en>. Acesso em: 5 set. 2022.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1 jun. 1979.

OLIVEIRA, R. et al. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 6, p. 679–688, 2009.

PANULA, P. et al. The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. **Neurobiology of disease**, v. 40, n. 1, p. 46–57, out. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20472064/>>. Acesso em: 3 mar. 2025.

PAVARAJ, M.; BAKAVATHIAPPAN, G.; BASKARAN, S. Evaluation of some plant extracts for their nematocidal properties against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Journal of Biopesticides**, v. 5, n. SUPPL., p. 106–110, 2012.

PEITZIKA, S. C.; PONTIKI, E. A Review on Recent Approaches on Molecular Docking Studies of Novel Compounds Targeting Acetylcholinesterase in Alzheimer Disease. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1084, 1 fev. 2023. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9921523/>>. Acesso em: 19 set. 2025.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

PRESTI, L. Activity of Catmint (*Nepeta cataria*) essential oil against *Anisakis* larvae. **Tropical Biomedicine**, v. 34, n. 1, p. 22–31, 2017.

PRIEST, N. D. et al. The bioavailability of ²⁶Al-labelled aluminium citrate and aluminium hydroxide in volunteers. **Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 9, n. 3, p. 221–228, 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8696074/>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

RADUAN, S. Z. et al. Neurotoxicity of aluminium chloride and okadaic acid in zebrafish: Insights into Alzheimer's disease models through anxiety and locomotion testing, and acute toxicity assessment with *Litsea garciae* bark's methanolic extract. **Journal of King Saud University - Science**, v. 35, n. 7, p. 102807, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102807>>.

RAMACHANDRAN, A. K. et al. E-Pharmacophore modelling, molecular docking and dynamics approaches for in silico identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products against Alzheimer's disease. 28 out. 2023. Disponível em: <<https://www.researchsquare.com>>. Acesso em: 19 set. 2025.

RAWAT, K. et al. Identification of AChE targeted therapeutic compounds for Alzheimer's disease: an in-silico study with DFT integration. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 1–21, 1 dez. 2024. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-024-81285-2>>.

REGO, A. C.; OLIVEIRA, C. R. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: Implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 10, p. 1563–1574, 1 out. 2003. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023/A:1025682611389>>. Acesso em: 16 fev. 2025.

REICHERT, W. et al. Repellency Assessment of *Nepeta cataria* essential oils and Isolated Nepetalactones on *Aedes aegypti*. [s.d.] Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36814-1>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

RODRÍGUEZ-FUENTES, G. et al. Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following Chlorpyrifos exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 172–173, p. 19–25, jun. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045615000514>>.

RODRIGUEZ, S. et al. Bioactive Sesquiterpene Obtained from *Schinus areira* L. (Anacardiaceae) Essential Oil. **Proceedings 2019, Vol. 41, Page 85**, v. 41, n. 1, p. 85, 15 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2504-3900/41/1/85/htm>>. Acesso em: 14 ago. 2025.

RUIPÉREZ, F. et al. Pro-oxidant activity of aluminum: Promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 117, p. 118–123, 1 dez.

2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013412002838>>. Acesso em: 17 ago. 2025.

SABOGAL-GUÁQUETA, A. M.; OSORIO, E.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice. **Neuropharmacology**, v. 102, n. 5, p. 111–120, mar. 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390815301660>>.

SACHETT, A. et al. Protein quantification protocol optimized for zebrafish brain tissue (Bradford method). **Protocols.io**, p. 1–11, 2020a. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjnfkmbn>>.

SACHETT, A. et al. Quantification of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) optimized for zebrafish brain tissue. **Protocols.io**, p. 1–9, 2020b. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjp8kmrw>>.

SACHETT, A. et al. Quantification of nonprotein sulfhydryl groups (NPSH) optimized for zebrafish brain tissue. p. 1–8, 2020c. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bjrkkm4w>>.

SANTANA, S.; RICO, E. P.; BURGOS, J. S. Can zebrafish be used as animal model to study Alzheimer's disease? **American Journal of Neurodegenerative Diseases**, v. 1, n. 1, p. 32–48, 2012.

SATHISH KUMAR, K. et al. Biochemical, Antioxidant, and Antimicrobial Profiling of Essential Oils of Indian Origin for Culinary Applications. **International Journal of Food Science**, v. 2024, n. 1, p. 9326683, jan. 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11698606/>>. Acesso em: 14 ago. 2025.

SATISH, S. Studies on therapeutic potential of essential oils of *Nepeta cataria* in treatment of Alzheimer's disease. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 18, p. 42–48, 2013. Disponível em: <http://www.jbiopharm.com/index.php/ajbps/article/view/232/174>
<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133190047>>.

SAVELEV, S. U.; OKELLO, E. J.; PERRY, E. K. Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory

activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 4, p. 315–324, 1 abr. 2004. Disponível em: <[doi/pdf/10.1002/ptr.1451](https://doi.org/10.1002/ptr.1451)>. Acesso em: 19 set. 2025.

SCHÄFER, U.; SEIFERT, M. Oral intake of aluminum from foodstuffs, food additives, food packaging, cookware and pharmaceutical preparations with respect to dietary regulations. **Trace Elements and Electrolytes**, v. 23, n. 3, p. 150–161, 2006.

SCHAKE, P. et al. PLIP 2025: introducing protein–protein interactions to the protein–ligand interaction profiler. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. W1, p. W463–W465, 7 jul. 2025. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaf361>>. Acesso em: 19 set. 2025.

SCHÖNHOLZER, K. W. et al. Intestinal absorption of trace amounts of aluminium in rats studied with ²⁶aluminium and accelerator mass spectrometry. **Clinical Science**, v. 92, n. 4, p. 379–383, 1997.

SEFIDKON, F.; DABIRI, M.; ALAMSHAHI, A. Analysis of the essential oil of *Nepeta fissa* C.A. Mey from Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 2, p. 89–90, 2002.

SENGER, M. R. et al. Aluminum exposure alters behavioral parameters and increases acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Cell Biology and Toxicology**, v. 27, n. 3, p. 199–205, 2011.

SHAKERI, A. et al. Volatile composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant evaluation of the essential oil from *Nepeta sintenisii* Bornm. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 224–229, 1 jun. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015306191?utm_source=chatgpt.com>. Acesso em: 14 ago. 2025.

SHARMA, A. et al. The genus *Nepeta*: Traditional uses, phytochemicals and pharmacological properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 268, n. September 2020, p. 113679, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113679>>.

SHARMA, A.; NAYIK, G. A.; CANNOO, D. S. Pharmacology and Toxicology of *Nepeta cataria* (Catmint) Species of Genus *Nepeta*: A Review. **Plant and Human Health: Pharmacology and Therapeutic Uses**, v. 3, p. 285–299, 1 jan. 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-04408-4_13>. Acesso em: 6 ago. 2025.

SHAW, P. et al. Environmentally relevant concentration of chromium activates Nrf2 and alters transcription of related XME genes in liver of zebrafish. **Chemosphere**, v. 214, p. 35–46, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653518317594?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, R. S. da. **Zebrafish como Modelo para Estudos Comportamentais**. [s.l: s.n.]

SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. **Oxidative Stress**, p. 1–8, 1 jan. 1985.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>>.

SILVA BRUM, L. F. et al. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. **Neurochemical Research**, v. 26, n. 3, p. 191–194, 2001.

SILVA, B. da et al. Nitric oxide involvement in the disability and active disease of multiple sclerosis: Systematic review and meta-analysis. **Nitric Oxide**, v. 145, p. 8–20, 1 abr. 2024.

SIMON, J. E. Phytochemical analysis and anti-inflammatory activity of *Nepeta cataria* accessions. **Journal of Medicinally Active Plants**, v. 7, n. 1, p. 19–27, 2018. Disponível em: <<https://scholarworks.umass.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1123&context=jmap>>.

STEWART, A. M.; KALUEFF, A. V. The Developing Utility of Zebrafish Models for Cognitive Enhancers Research. **Current Neuropharmacology**, v. 10, n. 3, p. 263–271, 2 out. 2012. Disponível em: <<https://www.eurekaselect.com/article/45842>>. Acesso em: 3 mar. 2025.

STREISINGER, G. et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature** **1981 291:5813**, v. 291, n. 5813, p. 293–296, 1981. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/291293a0>>. Acesso em: 3 mar. 2025.

STYKEL, M. G.; RYAN, S. D. Nitrosative stress in Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease** **2022 8:1**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 11 ago. 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41531-022-00370-3>>. Acesso em: 29 jan. 2025.

SULAIMAN, R.; WANG, M.; REN, X. Exposure to Aluminum, Cadmium, and Mercury and Autism Spectrum Disorder in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Chemical**

research in toxicology, v. 33, n. 11, p. 2699–2718, 16 nov. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32990432/>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

SUMALAN, R.-M.; ALEXA, E.; POIANA, M.-A. Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and Fusarium mycotoxins production in wheat. 2013. Disponível em: <<http://journal.chemistrycentral.com/content/7/1/32>>. Acesso em: 14 ago. 2025.

SUN, C. et al. Eucommia ulmoides Olive Male Flower Extracts Ameliorate Alzheimer's Disease-Like Pathology in Zebrafish via Regulating Autophagy, Acetylcholinesterase, and the Dopamine Transporter. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 15, n. June, p. 1–15, 2022.

TAN, J. et al. Hepatoprotective effect of essential oils of Nepeta cataria L. On acetaminophen-induced liver dysfunction. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 8, p. 1–9, 2019.

TAUFFENBERGER, A.; MAGISTRETTI, P. J. Reactive Oxygen Species: Beyond Their Reactive Behavior. **Neurochemical Research**, v. 46, n. 1, p. 77–87, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11064-020-03208-7>>.

THOMAS, R. S. et al. The Next Generation Blueprint of Computational Toxicology at the U.S. Environmental Protection Agency. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 169, n. 2, p. 317–332, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30835285/>>. Acesso em: 14 out. 2025.

TIWARI, G. et al. Assessment of Genetic Diversity , Micromorphology and Antimicrobial Activity in Nepeta cataria L . n. 1950, 2023.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010. Disponível em: <[doi/pdf/10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334)>. Acesso em: 19 set. 2025.

TUCKER, A. O.; TUCKER, S. S. Catnip and the catnip response. **Economic Botany**, v. 42, n. 2, p. 214–231, abr. 1988. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF02858923>>. Acesso em: 6 ago. 2025.

UVARAJAN, D. et al. Neuroprotective Effects of Berberine Chloride Against the Aluminium Chloride-Induced Alzheimer's Disease in Zebra Fish Larvae. **Molecular Biotechnology**, p. 1–16, 27 fev. 2025. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-025-01392-x>>. Acesso em: 21 ago. 2025.

VARGA, Z. M. Aquaculture, husbandry, and shipping at the Zebrafish International Resource Center. In: [s.l: s.n.]p. 509–534.

VAZIRIAN, M. et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* essential oil from Iran. **Research Journal of Pharmacognosy**, v. 2, n. 1, p. 41–46, 1 jan. 2015. Disponível em: <https://www.rjpharmacognosy.ir/article_7578.html>. Acesso em: 14 ago. 2025.

VIJAYAKUMAR, R. et al. Non-enzymatic and enzymatic antioxidant variations in tender and mature leaves of *Strychnos nux-vomica* L. (Family: Loganiaceae). **Comptes Rendus - Biologies**, v. 332, n. 1, p. 52–57, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2008.09.012>>.

VUKIĆ, M. D. et al. Chemical Composition of Various *Nepeta cataria* Plant Organs' Methanol Extracts Associated with In Vivo Hepatoprotective and Antigenotoxic Features as well as Molecular Modeling Investigations. **Plants**, v. 11, n. 16, 2022.

WANGE, R. L.; BROWN, P. C.; DAVIS-BRUNO, K. L. Implementation of the principles of the 3Rs of animal testing at CDER: Past, present and future. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 123, p. 104953, 1 jul. 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0273230021000933?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 out. 2025.

WENHAI HUANG et al. Development of a Zebrafish Model for Rapid Drug Screening against Alzheimer's Disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 4, p. 174–185, 10 abr. 2016. Disponível em: <<http://www.davidpublisher.com/index.php/Home/Article/index?id=24661.html>>.

WHO. **Aluminium in drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality**. [s.l: s.n.].

WOJTUNIK-KULESZA, K. et al. Activity of selected group of monoterpenes in alzheimer's disease symptoms in experimental model studies— A non-systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, 2021.

XIE, C. X.; YOKEL, R. A. Aluminum Facilitation of Iron-Mediated Lipid Peroxidation Is Dependent on Substrate, pH, and Aluminum and Iron Concentrations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 327, n. 2, p. 222–226, 15 mar. 1996. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986196901137?via%3Dihub>>.

Acesso em: 17 ago. 2025.

XIONG, Y. et al. Zebrafish larvae acute toxicity test: A promising alternative to the fish acute toxicity test. **Aquatic Toxicology**, v. 246, p. 106143, 1 maio 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X22000704?via%3Dihub>>.

Acesso em: 13 out. 2025.

XU, P. et al. The Protective Effect of Lavender Essential Oil and Its Main Component Linalool against the Cognitive Deficits Induced by D-Galactose and Aluminum Trichloride in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, n. 1, p. 7426538, 1 jan. 2017. Disponível em: <[doi/pdf/10.1155/2017/7426538](https://doi.org/10.1155/2017/7426538)>. Acesso em: 8 ago. 2025.

YAHIA, E. M.; GARCÍA-SOLÍS, P.; MALDONADO CELIS, M. E. Contribution of fruits and vegetables to human nutrition and health. In: **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. [s.l: s.n.]p. 19–45.

YANG, S. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Peganum harmala*, *Nepeta cataria* and *Phellodendron amurense* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 5, p. 560–564, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.03.007>>.

YEN, J. et al. Differential acetylcholinesterase inhibition of chlorpyrifos, diazinon and parathion in larval zebrafish. **Neurotoxicology and teratology**, v. 33, n. 6, p. 735, nov. 2011. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3225599/>>. Acesso em: 22 ago. 2025.

YILMAZ, A.; BOĞA, M.; TOPÇU, G. Novel terpenoids with potential anti-Alzheimer activity from *Nepeta obtusicrena*. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 5, p. 530–541, 2016.

ZAOUALI, Y.; BOUZAINÉ, T.; BOUSSAID, M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3144–3152, 1 nov. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S027869151000520X?via%3Dihub#s0090>>. Acesso em: 14 ago. 2025.

ZATTA, P.; LAIN, E.; CAGNOLINI, C. Effects of aluminum on activity of krebs cycle enzymes and glutamate dehydrogenase in rat brain homogenate. **European journal of biochemistry**, v. 267, n. 10, p. 3049–3055, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10806405/>>. Acesso em: 4 mar. 2025.

ZHANG, Y. et al. The Food Additive β -Caryophyllene Exerts Its Neuroprotective Effects Through the JAK2-STAT3-BACE1 Pathway. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, n. February, p. 1–10, 2022.

ZHAO, W. et al. The uses of zebrafish (*Danio rerio*) as an in vivo model for toxicological studies: A review based on bibliometrics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 272, p. 116023, 1 mar. 2024. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651324000988?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

ZOMORODIAN, K. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Nepeta cataria* L. against Common Causes of Food-Borne Infections. v. 2012, 2012a.

ZOMORODIAN, K. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils from *Nepeta cataria* L. against Common Causes of Food-Borne Infections. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2012, p. 1–6, 17 jun. 2012b.

ZOMORODIAN, K. et al. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oil of *Nepeta Cataria* L. Against Common Causes of Oral Infections. **Journal of Dentistry (Tehran, Iran)**, v. 10, n. 4, p. 329, maio 2013. Disponível em: <<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3875507/>>. Acesso em: 8 ago. 2025.

