



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM
GERONTOLOGIA



SABINE HELENA DANTAS

EMULSÃO À BASE DE CARVACROL EM MODELO DE ENVELHECIMENTO
ANIMAL INDUZIDO POR D-GALACTOSE

JOÃO PESSOA/PB

2021

SABINE HELENA DANTAS

**EMULSÃO À BASE DE CARVACROL EM MODELO DE ENVELHECIMENTO
ANIMAL INDUZIDO POR D-GALACTOSE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Gerontologia (Modalidade Profissional) da Universidade Federal da Paraíba para a obtenção do título de Mestre em Gerontologia.

Área de Concentração: Gerontologia

Linha de pesquisa: Envelhecimento e tecnologias inovadoras para o cuidado à pessoa idosa

Orientadora: Prof^a.Dr^a Antônia Lêda Oliveira Silva

Coorientadora: Prof^a.Dr^a. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves

João Pessoa/PB

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D192e Dantas, Sabine Helena.

Emulsão à base de carvacrol em modelo de
envelhecimento animal induzido por D-galactose / Sabine
Helena Dantas. - João Pessoa, 2021.

67 f. : il.

Orientação: Antônia Lêda Oliveira Silva.

Coorientação: Islania Giselia Albuquerque Gonçalves.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Envelhecimento. 2. Estresse oxidativo. 3.
D-galactose. 4. Carvacrol. 5. Patente. I. Silva,
Antônia Lêda Oliveira. II. Gonçalves, Islania Giselia
Albuquerque. III. Título.

UFPB/BC

CDU 612.67(043)

SABINE HELENA DANTAS

**EMULSÃO À BASE DE CARVACROL EM MODELO DE ENVELHECIMENTO
ANIMAL INDUZIDO POR D-GALACTOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia (Modalidade Profissional) da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do Título de Mestre em Gerontologia.

Aprovada em: 14 de maio de 2021.

BANCA DE DEFESA



Prof.^a. Dr.^a. Antônia Lêda Oliveira Silva
Presidente da Banca (Orientadora)
Programa de Mestrado Profissional em Gerontologia – UFPB



Prof.^a. Dr.^a. Karina Carla de Paula Medeiros
Membro Externo Titular
Programa de Pós- Graduação em Biologia Estrutural e Funcional – UFRN

Prof. Dr. Robson Antônio de Medeiros
Membro Interno Titular
Programa de Mestrado Profissional em Gerontologia – UFPB

Dedico este trabalho aos meus pais, Sandra e Isac,
que nunca mediram esforços para investir na minha
felicidade e no meu crescimento pessoal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nunca me deixar fraquejar nos momentos em que mais me senti frágil, por escutar meus desabafos e iluminar e abençoar todos os meus caminhos até aqui.

Aos meus pais, Sandra e Isac, e à minha irmã, Camila, por serem apoio em meio as tribulações, por sempre serem abrigo quando preciso, por nunca medirem esforços para me ajudar e por todo amor incondicional. Amo muito vocês.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Antônia Leda Oliveira Silva, por todos os ensinamentos que me guiaram nessa trajetória e pela parceria.

À minha coorientadora, Islania Giselia Albuquerque Gonçalves, por todo apoio e ensinamentos que contribuíram para minha formação.

À banca examinadora, Robson Antão de Medeiros e Karina Carla de Paula Medeiros, por todas as contribuições necessárias para a melhora do meu trabalho.

À secretaria do curso, pela cooperação.

Aos meus colegas de turma do mestrado, por toda parceria e companheirismo, por me acolherem e me ajudarem sempre que precisei. Estamos juntos. Levá-los-ei para a vida toda.

A todos os colaboradores do Instituto Paraibano de Envelhecimento.

À toda equipe do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular, Fátima, Robson, Arthur Pontes, Tays Amanda, Mathania Almeida, Geovânia Menezes, Ana Caroline Meneses, Alinne Villar, Rafaelly Santos, Evelylen Cardoso, Mariana Freire, Júlio Oliveira e Vera Monteiro, por toda ajuda e apoio na condução deste trabalho.

Às minhas amigas-irmã da faculdade: Rayane Gomes, Jéssica Ferreira, Rildeane Gabriel, Raimunda Nogueira e Jaciclene Lopes. Obrigada por todo companheirismo e amizade que já duram anos. Que continuemos unidas e sempre alçando grandes voos.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização desta pesquisa.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.”
Madre Teresa de Calcutá*

DANTAS, Sabine Helena. **Emulsão à base de carvacrol em modelo de envelhecimento induzido por D-galactose**. 2021. 67f. (Dissertação) Programa de Mestrado Profissional em Gerontologia - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2021.

RESUMO

Introdução: O envelhecimento é um processo caracterizado pelo declínio gradual das funções celulares, moleculares e teciduais. Evidências sugerem que o acúmulo de células senescentes associado ao estresse oxidativo tem sido implicado na promoção de várias doenças na pessoa idosa, entre elas as doenças cardiovasculares, que são tidas como a maior causa de morbimortalidade no mundo. Nesse sentido, a fim de retardar ou atenuar os efeitos do envelhecimento, a busca por novas fontes naturais com atividade antioxidante tem despertado bastante interesse. **Objetivos:** Identificar as evidências científicas sobre o efeito de plantas e seus metabólitos no envelhecimento cardiovascular em modelo animal induzido por D-galactose; avaliar o efeito cardioprotetor do carvacrol em modelo de envelhecimento induzido por D-galactose e; propor a deposição de uma patente, sendo uma emulsão à base de carvacrol, que possui propriedades cardioprotetoras em modelo de envelhecimento animal induzido por D-galactose. **Método:** Trata-se de um estudo experimental pré-clínico, estruturado em três etapas: na primeira, procurou-se identificar evidências científicas a partir de uma revisão integrativa com busca de artigos científicos nas bases de dados *Web of Science*, *Scopus* e *Medical Literature Analysis and Retrieval System On-line (MEDLINE/PubMed)*, utilizando os descritores indexados *aging*, *D-galactose cardiovascular diseases*, operador booleano *and* e estratégia População, Interesse e Contexto (*PICO*), no período de fevereiro a julho de 2020, com período de publicação de 2012 a 2019. A segunda etapa foi uma pesquisa experimental pré-clínica, em que se avaliou o efeito cardioprotetor do carvacrol em modelo de envelhecimento animal induzido por D-galactose. Para isso, ratos de 8-9 semanas de idade foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo controle tratado com veículo (CTL), grupo D-galactose 250mg/kg (Dgal) e grupos D-galactose + carvacrol nas doses de 50mg/kg e 100mg/kg (Dgal+C50 e Dgal+C100), respectivamente, sendo submetidos a administrações diárias, via intraperitoneal (D-galactose) e oral (carvacrol), durante oito semanas de tratamento. A terceira etapa compreendeu o depósito de uma patente, caracterizada como uma emulsão à base de carvacrol. **Resultados e Discussão:** Os dados obtidos na primeira etapa compreenderam a análise de 8 artigos que demonstraram efeitos benéficos de plantas e seus metabólitos sobre o envelhecimento cardiovascular em modelo induzido por D-galactose. Na etapa dois, os dados obtidos na pesquisa demonstraram que o carvacrol foi capaz de promover efeito cardioprotetor sobre o estresse oxidativo e hipertensão arterial em ratos envelhecidos por D-galactose. Os resultados alcançados nas duas primeiras etapas do estudo subsidiaram a proposta de depósito de patente, apresentada como uma emulsão à base de carvacrol, com a seguinte composição: óleo de carvacrol, solubilizado em cremofor® e diluído em solução salina fisiológica, de modo a serem obtidas as doses desejadas para cada protocolo experimental. **Considerações finais:** Após demonstrados os efeitos cardioprotetores em estudo pré-clínico frente ao modelo de envelhecimento induzido por D-galactose, foi proposta a construção de uma patente, caracterizada como uma emulsão à base de carvacrol, a ser depositada, e que apresenta um forte potencial de uso terapêutico a ser testado inclusive em estudos clínicos.

Descritores: Envelhecimento. Estresse oxidativo. D-galactose. Carvacrol. Patente.

DANTAS, Sabine Helena. **Emulsion based on carvacrol in a D-galactose-induced aging model**. 2021. 67p. (Dissertation) Professional Master's Program in Gerontology - Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2021

ABSTRACT

Introduction: Aging is a process characterized by a gradual decline in cellular, molecular and tissue functions. Evidence suggests that the accumulation of senescent cells associated with oxidative stress has been implicated in the promotion of various diseases in the elderly, including cardiovascular diseases, which are considered the greatest cause of morbidity and mortality in the world. In this sense, in order to delay or mitigate the effects of aging, the search for new natural sources with antioxidant activity has aroused a lot of interest. **Objectives:** To identify scientific evidence on the effect of plants and their metabolites on cardiovascular aging in an animal model induced by D-galactose; evaluate the cardioprotective effect of carvacrol in an aging model induced by D-galactose, and propose the deposition of a patent, being an emulsion based on carvacrol, which has cardioprotective properties in an animal aging model induced by D-galactose. **Method:** This is a pre-clinical experimental study, structured in three stages: in the first, an attempt was made to identify scientific evidence from an integrative review with search for scientific articles in the Web of Science, Scopus and Medical Literature databases Analysis and Retrieval System On-line (MEDLINE / PubMed), using the indexed descriptors aging, D-galactose cardiovascular diseases, Boolean operator and strategy Population, Interest and Context (PICO), from February to July 2020, with period of publication from 2012 to 2019. The second stage was a pre-clinical experimental study in which the cardioprotective effect of carvacrol was evaluated in an animal D-galactose-induced aging model. For this, 8-9 week old rats were divided into four experimental groups: vehicle-treated control group (CTL), 250mg / kg D-galactose group (Dgal) and 50mg / kg D-galactose + carvacrol groups. and 100mg / kg (Dgal + C50 and Dgal + C100), respectively, being submitted to daily administrations, intraperitoneal (D-galactose) and oral (carvacrol), during eight weeks of treatment. The third stage involved filing a patent, characterized as an emulsion based on carvacrol. **Results and Discussion:** the data obtained in the first stage included the analysis of 8 articles that demonstrated beneficial effects of plants and their metabolites on cardiovascular aging in a D-galactose-induced aging model. In step two, the data obtained in the research demonstrated that carvacrol was able to promote a cardioprotective effect on oxidative stress and arterial hypertension in rats aged by D-galactose. The results obtained in the first two stages of the study supported the patent filing proposal, presented as a carvacrol-based emulsion, with the following composition: carvacrol oil, solubilized in cremofor® and diluted in physiological saline, in order to be the desired doses were obtained for each experimental protocol. **Final considerations:** After demonstrating the cardioprotective effects in a preclinical study against D-galactose-induced aging model, it was proposed to construct a patent, characterized as an emulsion based on carvacrol, to be deposited, and which presents a strong potential for therapeutic use to be tested including in clinical studies.

Keywords: Aging. Oxidative Stress. D-galactose. Carvacrol. Patent.

DANTAS, Sabine Helena. **La emulsión a base de carvacrol un modelo de envejecimiento inducido por D-galactosa**, 2021. 67f. (Disertación) Programa de Maestría Profesional en Gerontología - Centro de Ciencias de la Salud, Universidad Federal de Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2021.

RESUMEN

Introducción: El envejecimiento es un proceso caracterizado por una disminución gradual de las funciones celulares, moleculares y tisulares. La evidencia sugiere que la acumulación de células senescentes asociada al estrés oxidativo se ha implicado en la promoción de diversas enfermedades en los ancianos, incluidas las cardiovasculares, que se consideran la mayor causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. En este sentido, con el fin de retrasar o mitigar los efectos del envejecimiento, la búsqueda de nuevas fuentes naturales con actividad antioxidante ha despertado mucho interés. **Objetivos:** Identificar evidencia científica sobre el efecto de las plantas y sus metabolitos sobre el envejecimiento cardiovascular en un modelo animal inducido por D-galactosa; evaluar el efecto cardioprotector del carvacrol en un modelo de envejecimiento inducido por D-galactosa, y proponer la deposición de una patente, siendo una emulsión a base de carvacrol, que tiene propiedades cardioprotectoras en un modelo de envejecimiento animal inducido por D-galactosa. **Método:** Se trata de un estudio experimental preclínico, estructurado en tres etapas: en la primera se intentó identificar evidencia científica a partir de una revisión integradora con búsqueda de artículos científicos en las bases de datos Web of Science, Scopus y Medical Literature Analysis and Retrieval System On-line (MEDLINE / PubMed), utilizando los descriptores indexados envejecimiento, D-galactosa enfermedades cardiovasculares, operador booleano y estrategia Población, Interés y Contexto (PICo), de febrero a julio de 2020, con período de publicación de 2012 a 2019 La segunda etapa fue una investigación experimental preclínica en la que se evaluó el efecto cardioprotector del carvacrol en un modelo de envejecimiento animal inducido por D galactosa. Para ello, se dividieron ratas de 8 a 9 semanas de edad en cuatro grupos experimentales: grupo de control tratado con vehículo (CTL), grupo de D-galactosa de 250 mg / kg (Dgal) y grupos de D-galactosa + carvacrol de 50 mg / kg y 100 mg / kg (Dgal + C50 y Dgal + C100), respectivamente, siendo sometidos a administraciones diarias, intraperitoneal (D-galactosa) y oral (carvacrol), durante ocho semanas de tratamiento. La tercera etapa consistió en la presentación de una patente, caracterizada como una emulsión a base de carvacrol. **Resultados y Discusión:** los datos obtenidos en la primera etapa incluyeron el análisis de 8 artículos que demostraron efectos beneficiosos de las plantas y sus metabolitos sobre el envejecimiento cardiovascular en un modelo inducido por D-galactosa. En el paso dos, los datos obtenidos en la investigación demostraron que el carvacrol fue capaz de promover un efecto cardioprotector sobre el estrés oxidativo y la hipertensión arterial en ratas envejecidas por D-galactosa. Los resultados obtenidos en las dos primeras etapas del estudio apoyaron la propuesta de solicitud de patente, presentada como una emulsión a base de carvacrol, con la siguiente composición: aceite de carvacrol, solubilizado en cremofor® y diluido en suero fisiológico, para ser las dosis deseadas. se obtuvieron para cada protocolo experimental. **Consideraciones finales:** Tras demostrar los efectos cardioprotectores en un estudio preclínico frente al modelo de envejecimiento inducido por la D-galactosa, se propuso construir una patente, caracterizada como una emulsión a base de carvacrol, a depositar, y que presenta un fuerte potencial terapéutico. utilizar para ser probado incluso en estudios clínicos.

Descriptores: Envejecimiento. Estrés oxidativo. D-galactosa. Carvacrol. Patentar.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Síntese das características dos estudos incluídos na revisão integrativa de acordo com os autores, ano de publicação, objetivos, exposição/intervenção e o desfecho/resultados utilizados – 2020

.....

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do carvacrol.....	24
Figura 2 – Fluxograma de seleção e de inclusão dos estudos da revisão integrativa.....	35
Figura 3 – Imagens da intensidade de fluorescência basal emitida pela sonda DHE em cortes histológicos de artéria mesentérica superior isolada de rato dos diferentes grupos experimentais tratados com D-galactose e carvacrol por oito semanas (objetiva 10 X).....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curvas de concentração-resposta para FEN (10^{-9} – 3×10^{-4} M), em secções de artéria mesentérica superior isoladas de ratos dos diferentes grupos experimentais, após oito semanas de tratamento.....	43	43
Gráfico 2 - Curvas de concentração-resposta para ACh (10^{-10} – 3×10^{-4} M), em secções de artéria mesentérica superior isoladas de ratos, pré-contraídas com FEN, dos diferentes grupos experimentais, após tratamento por oito semanas.	45	45
Gráfico 3 - Curvas de concentração-resposta para NPS (10^{-12} – 3×10^{-6} M), secções de artéria mesentérica superior de ratos, pré-contraídas com FEN, dos diferentes grupos experimentais, durante tratamento por oito semanas.	47	47
Gráfico 4 - Intensidade relativa de fluorescência basal (%) de DHE em cortes histológicos de artéria mesentérica superior isolada de rato dos diferentes grupos tratados por oito semanas.	49	49
Gráfico 5 - Medida da Pressão Arterial Sistólica (PAS, em mmHg) dos diferentes grupos experimentais, durante tratamento por oito semanas.....	51	51
Gráfico 6 - Relação peso do coração pelo peso do animal dos diferentes grupos experimentais, durante tratamento por oito semanas.	52	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AGEs	Produtos Finais de Glicação Avançada
ANOVA	Análise de Variância
AOF	<i>Alpinate Oxyphyllae Fructus</i>
CAT	Catalase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DHE	Di-Hidroetidio
DL50	Dose Letal Média
DPI	Diretoria de Propriedade Intelectual
eNOS	Sintase de Óxido Nítrico Endotelial
e.p.m	Erro Padrão da Média
EVTE	Estudo de Viabilidade Técnica e Econômica
FEN	Fenilefrina
GSH	Glutationa
GSH-Px	Glutationa Peroxidase
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
NOS	Sintase de Óxido Nítrico
NO	Óxido Nítrico
NPS	Nitroprussiato de Sódio
PAS	Pressão Arterial Sistêmica
PBS	Solução Salina Tamponada
PCCL	Polissacarídeo de <i>Cuscuta Chinensis Lam</i>
PGI2	Prostaciclina
PMPG	Programa de Mestrado Profissional em Gerontologia
Prx	Peroxirredoxina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase

UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UPA	Unidade de Produção Animal
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo
VPR	Gravação de Volume de Pressão

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Envelhecimento populacional	19
2.2 Senescência e Remodelamento vascular.....	21
2.3 Evidências científicas sobre os efeitos de plantas e seus metabólitos no envelhecimento do sistema cardiovascular em modelo induzido por D-galactose.....	25
3 PERCURSO METODOLÓGICO.....	33
3.1 Tipo de Estudo.....	33
3.2 Etapas do Estudo	33
3.3 Local da Pesquisa	36
3.4 População e Amostra	36
3.5 Procedimentos para coleta dos dados	38
3.6 Análise dos dados	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Resultados e discussão sobre os dados obtidos da pesquisa	42
4.2 Apresentação do produto	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXO	65

APRESENTAÇÃO

O presente estudo está inserido na linha de pesquisa “Envelhecimento e Tecnologias Inovadoras para o Cuidado à Pessoa Idosa”, do Programa de Mestrado Profissional em Gerontologia (PMPG), do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

A escolha do tema da pesquisa surgiu a partir da necessidade constante, tanto na área acadêmica quanto na esfera profissional, de se buscar novas tecnologias em saúde que possam contribuir para melhorias na qualidade de vida e prevenção dos efeitos associados ao envelhecimento humano. Evidências sugerem que a população mundial, com o passar dos anos, será composta, em sua maioria, por pessoas maiores de 60 anos. Aliado a esse crescimento acelerado, diversas doenças, principalmente as doenças cardiovasculares, têm sua prevalência aumentada em decorrência do aumento da idade, e são tidas como a maior causa de morbimortalidade no mundo.

São exemplos de doenças cardiovasculares a hipertensão arterial sistêmica, o infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, entre outras. Estas geram altos custos em saúde, tanto na prevenção, quanto nos tratamentos clínicos, cirúrgicos, internações, causando, assim, desfechos negativos, tanto clínicos como humanísticos. Dessa forma, gera-se um impacto tanto na vida individual, quanto em toda unidade familiar associada.

Diante dessa problemática, o incentivo ao desenvolvimento de estudos pré-clínicos na área do envelhecimento, por meio da utilização de compostos/substâncias que possam demonstrar efeitos benéficos sobre esse processo, principalmente a nível de sistema cardiovascular, torna-se necessário devido a relevância e prevalência de condições clínicas decorrentes do envelhecimento humano.

Com isso, ingressei no Programa de Mestrado Profissional em Gerontologia justamente com o intuito de avaliar as alterações cardiovasculares decorrentes do processo de envelhecimento celular, utilizando, para isso, um modelo de envelhecimento acelerado em animais. Outrossim, também é de meu interesse avaliar se um composto natural seria capaz de atenuar ou retardar esses efeitos. Este estudo encontra-se estruturado em cinco tópicos: introdução, revisão da literatura, percurso metodológico, resultados e discussão e considerações finais.

Na introdução (exposta na seção seguinte), a temática foi contextualizada de acordo com as referências presentes na literatura científica. Apresentam-se os objetivos, a problemática e a justificativa para realização da pesquisa, bem como é demonstrada a questão norteadora. A

revisão da literatura apontou evidências científicas sobre o objeto de estudo a partir dos resultados de uma revisão integrativa pertinente à temática.

No percurso metodológico, foram delineadas as etapas para a realização da pesquisa, incluindo tipo de estudo, local da pesquisa, amostra, protocolo experimental, aspectos éticos do estudo e análise dos dados. Os resultados e as discussões apresentaram os achados da pesquisa, assim como subsidiaram a elaboração do produto tecnológico.

Nas considerações finais, são apresentados os conhecimentos adquiridos por meio da pesquisa e a relevância do estudo para as práticas relacionadas à promoção da saúde no âmbito do envelhecimento.

1 INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento, caracterizado pelo declínio gradual das funções celulares, moleculares e teciduais, é considerado como o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças ligadas à idade, incluindo as doenças cardiovasculares, que são a principal causa de morbidade e mortalidade a nível mundial (ARAMILLO *et al.*, 2018; PENNDORF; WITTE; KRETZ, 2018). Dados apontam que em 2050, aproximadamente um quarto da população mundial será formada por idosos. Entretanto, o aumento da expectativa de vida observado na população, não necessariamente vem acompanhado de melhorias na qualidade de vida (AZMAN; ZAKARIA, 2019; XU *et al.*, 2019b).

O acúmulo de células senescentes tem sido implicado na promoção de várias doenças na pessoa idosa, entre elas as doenças cardiovasculares, que estão associadas ao aumento da síntese e liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) (XU *et al.*, 2019b). O envelhecimento cardiovascular é um processo dinâmico causado por diversos mecanismos que incluem uma mudança progressiva na função e estrutura, resultando no comprometimento da homeostase cardiovascular (GUDE *et al.*, 2018). Resumidamente, com o estresse oxidativo importante, os vasos e o coração tornam-se mais rígidos e com disfunção endotelial à medida que envelhecemos, fator que predispõe ao surgimento de DCVs (Doenças Cardiovasculares) (LAINA; STELLOS; STAMATELOPOULOS, 2018). Devido à alta prevalência das DCVs no envelhecimento, compreender as causas e os mecanismos associados é de considerável importância (OBAS; VASAN, 2018; REN, ZHANG, 2018).

Foi demonstrado na literatura que ratos submetidos a oito semanas de administração de D-galactose para induzir o envelhecimento mimético desenvolveram as características do estresse oxidativo, remodelamento vascular, mudanças na anatomia cardíaca e acúmulo de células senescentes semelhantes às de ratos naturalmente idosos, indicando que esse modelo de envelhecimento acelerado pode ser considerado como modelo experimental confiável de envelhecimento no nível de Sistema Cardiovascular, além de ser o mais utilizado por promover menos efeitos colaterais e ser responsável por uma maior taxa de sobrevivência durante o período do tratamento experimental (CHEN *et al.*, 2018; BO-HTAY *et al.*, 2018).

A fim de desacelerar ou reverter o processo de envelhecimento, a exploração de biomarcadores e a busca por novos alvos terapêuticos, sobretudo aqueles com atividade antioxidante, que possam atuar nesse processo, têm atraído bastante interesse (XU *et al.*, 2019a).

Diante disso, tem-se o carvacrol, um composto natural da classe dos monoterpenos, constituinte do óleo essencial produzido por plantas e especiarias, como cominho preto (*Nigella sativa* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (FACHINI-QUEIROZ *et al.*, 2012). O carvacrol possui diversos efeitos terapêuticos importantes, como antimicrobiano, bactericida, antifúngico, anticâncer, imunomodulador, além de se destacar pela sua ação antioxidante (SILVA *et al.*, 2018).

Considerando a problemática do envelhecimento, suas consequências e seus impactos sobre a população, questiona-se: Qual o efeito antioxidante do carvacrol na prevenção ou retardo do envelhecimento sobre o sistema cardiovascular induzido pela ingestão crônica de D-galactose?

Visando responder a esse questionamento, este estudo tem os **objetivos** de:

- Identificar as evidências científicas sobre o efeito de plantas e seus metabólitos no envelhecimento cardiovascular em modelo animal induzido por D-galactose;
- Avaliar o efeito cardioprotetor do carvacrol em modelo de envelhecimento induzido por D-galactose;
- Propor o depósito de uma patente, sendo uma emulsão à base de carvacrol, que possui propriedades cardioprotetoras em modelo de envelhecimento animal induzido por D-galactose.

Apresenta-se, a seguir, a revisão da literatura pertinente a este trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Envelhecimento Populacional

O envelhecimento é um processo que se caracteriza pelo acúmulo de mudanças fisiológicas que ocorrem gradualmente, levando ao declínio funcional do indivíduo ao longo do tempo (AZMAN; ZAKARIA, 2019). Além disso, o envelhecimento é considerado um fator de risco para a progressão de doenças crônicas, incluindo câncer, doenças pulmonares, neurodegenerativas e cardiovasculares (REN; ZHANG, 2018).

A população mundial formada por indivíduos com 60 anos ou mais está aumentando e, segundo as Nações Unidas, estima-se que quase dobrará de 12% em 2015 para 22% até 2050 (AZMAN; ZAKARIA, 2019). Nesse sentido, as tendências demográficas atuais indicam que a expectativa de vida tende a continuar a aumentar, e ainda não se sabe quando a expectativa de vida máxima de um ser humano será atingida (FLATT; PARTRIDGE, 2018).

Embora o aumento da expectativa de vida seja visto positivamente por muitos, deve-se levar em consideração a necessidade de se adotar medidas de manutenção da saúde das pessoas e, dessa forma, reduzir a taxa crescente de morbidade no final da vida (FLATT; PARTRIDGE, 2018; AZMAN; ZAKARIA, 2019).

Globalmente, o envelhecimento populacional tornou-se um desafio em várias dimensões, especialmente no que diz respeito às necessidades de cuidados complexos e comórbidos de pessoas idosas nos sistemas de saúde e de assistência social, o que pode sobrecarregar consideravelmente o sistema público de saúde atual (CHEN, 2020; CHUNG, 2019).

2.1.1 O papel das Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel importante nas várias funções fisiológicas dos organismos vivos e na fisiopatologia de diversas doenças (YANG; CHEN; SHI, 2019). Esses compostos são altamente reativos e incluem tanto radicais livres de oxigênio (como superóxido, radicais hidroxila e radicais peroxila), quanto não radicais (como peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e ozônio), que são produtos de numerosas reações enzimáticas que ocorrem em vários locais das células, como no citoplasma, no retículo endoplasmático, na mitocôndria e nos peroxissomos (FORRESTER *et al.*, 2018; KRYLATOV *et al.*, 2018).

Em concentrações fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio desempenham importantes papéis como segundos mensageiros que traduzem sinais intracelulares envolvidos em vários processos biológicos (SENONER; DICHTL, 2019; KRYLATOV *et al.*, 2018). Porém, quando acontece um desequilíbrio entre a produção dessas espécies reativas e no sistema de defesa antioxidante, como enzimas – por exemplo, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxirredoxina (Prx) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) –, bem como compostos não enzimáticos – por exemplo, tocoferol, vitamina E, beta-caroteno, ascorbato, glutathiona (GSH) e nicotinamida –, ocorre o estresse oxidativo, que leva a danos nas estruturas celulares (SENONER; DICHTL, 2019; FARÍAS *et al.*, 2017).

As principais morfologias celulares afetadas por ROS são proteínas, lipídios e DNA, causando e acelerando uma série de condições patológicas, como o envelhecimento e o aparecimento de várias doenças, incluindo distúrbios neurodegenerativos, câncer, doenças renais, doenças pulmonares e doenças metabólicas (INCALZA *et al.*, 2018).

Além disso, as ROS também estão envolvidas em patologias cardiovasculares, pois vários fatores de risco cardiovascular, como diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, fibrilação atrial, doença periférica arterial, obesidade, síndrome metabólica, dislipidemia, hábito de fumar e poluição estão associados com um aumento da produção dessas espécies (PIGNATELLI *et al.*, 2018; FARÍAS *et al.*, 2017). As ROS podem estimular o crescimento miocárdico, a remodelação da matriz e a disfunção celular pela ativação de várias cinases de sinalização de hipertrofia e fatores de transcrição (SENONER; DICHTL, 2019).

As principais fontes de ROS no coração são constituídas por ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, devido as mitocôndrias presentes nos cardiomiócitos. Além disso, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases (NADPH) e sintase de óxido nítrico (NOS) são outras duas fontes importantes de produção de ROS e sua geração desregulada promovem a expressão de características de senescência (células *in vitro* em cultura) e envelhecimento (*in vivo*, modelos animais e humanos), o que acaba contribuindo para a patogênese de doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose, insuficiência cardíaca, cardiomiopatia e hipertrofia cardíaca (DONG *et al.*, 2019; PAPACONSTANTINO, 2019).

As respostas fisiológicas às ROS endógenas e/ou exógenas envolvem uma série complexa de interações proteína-proteína sensíveis a essas espécies, alterações conformacionais de proteínas e modificações de proteínas que resultam na formação de complexos macromoleculares que promovem processos fisiológicos de senescência, envelhecimento e doenças associadas à idade (PAPACONSTANTINO, 2019). Dessa forma, o aumento dos níveis de ROS promove sérias implicações na iniciação e progressão de doenças

cardiovasculares, pois medeiam várias vias de sinalização que fundamentam a fisiopatologia cardiovascular (LEBARON *et al.*, 2019).

2.2 Senescência e Remodelamento vascular

O envelhecimento é um processo universal que tem como característica principal a perda gradual de função, ou degeneração, que ocorre tanto nos níveis moleculares, teciduais, bem como nos níveis celulares. O acúmulo de células senescentes tem sido implicado na promoção de várias doenças na pessoa idosa.

Esse fenômeno foi descrito por Hayflick e Moorhead, em 1961, e é caracterizado como uma parada irreversível do ciclo celular, que ocorre em resposta ao estresse (CALCINOTTO *et al.*, 2019; VICENTE *et al.*, 2016). São observadas em células senescentes a expressão elevada de p19ARF, p53 e PAI-1, sendo utilizados como biomarcadores do processo de senescência celular (CALCINOTTO, ALIMONTI, 2017).

Uma das características que definem as células senescentes é a interrupção do ciclo celular. Esta saída do ciclo ocorre por meio da ativação das principais vias supressoras de tumor: p27, p53/p21^{CIP1} e p16^{INK4a}/Rb, levando a mudanças generalizadas na organização da cromatina das células, pois estas crescem em volume e adotam morfologia achatada, além de alterações na expressão gênica das mesmas. Essas alterações incluem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, interleucinas, proteases e fatores de crescimento, que foram relatados como SASP, um Fenótipo Secretor Associado à Senescência (CALCINOTTO *et al.*, 2019; HERRANZ; GIL, 2018).

Tais citocinas, quando liberadas, resultam, entre outros efeitos, num processo crônico de inflamação celular, que é característico do envelhecimento, sugerindo, assim, que o processo de senescência celular pode desempenhar um papel importante na progressão das patologias associadas à idade (CALCINOTTO *et al.*, 2019; HERRANZ; GIL, 2018).

Na homeostase, os vasos têm a capacidade de responder a vários estímulos, tais como vasoconstrição, devido a uma resposta agonista adrenérgica ou circulatória (por exemplo, angiotensina II ou endotelina). Por outro lado, têm a missão de equilibrar o tônus vascular através de mediadores vasodilatadores, como o Óxido Nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio e algumas prostaglandinas (por exemplo, PGI₂) (SANTULLI; IACCARINO, 2016).

De fato, a produção de NO é o principal marcador da função vascular. No vaso, sua síntese é realizada principalmente pela sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS),

estando processo de envelhecimento relacionado a uma diminuição na produção desse mediador. Em modelos de camundongos submetidos ao processo de senescência acelerada, a disfunção endotelial está ligada à disfunção da eNOS (RIBEIRO *et al.*, 2016).

A liberação aumentada de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo), consequente diminuição da biodisponibilidade de NO, processos inflamatórios, proliferação de células musculares lisas, entre outros, são mecanismos importantes que podem desencadear o processo de envelhecimento vascular. Esses fatores estão envolvidos em mudanças específicas na estrutura (remodelamento vascular) e função de artérias e pequenos vasos, gerando um comprometimento no relaxamento do vaso dependente do endotélio (RIZZONI *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2016; VENDROV *et al.*, 2015).

O processo de envelhecimento vascular resulta no espessamento da camada íntima e média do vaso, bem como à diminuição gradativa de elasticidade arterial, tendo como consequência o fenômeno da rigidez vascular. Vários processos, como o aumento de colágeno e a diminuição do conteúdo de elastina, inflamação vascular, aumento da glicosilação de proteínas, além da atividade de metaloproteinases da matriz e estímulos sistêmicos, como a via de sinalização da angiotensina II, estão ligados a esse fenômeno, que está relacionado com a propensão a doenças cardiovasculares (CALCINOTTO *et al.*, 2019; WANG; KHALIL, 2018; MESCHIARI *et al.*, 2017).

A vasculatura também desempenha um papel importante na conexão de todos os tecidos através do fluxo sanguíneo. De fato, a inflamação vascular se estende a outros componentes do organismo, levando a um efeito a nível sistêmico. No sangue jovem, há predomínio de fatores de crescimento em detrimento de mediadores inflamatórios, além de células progenitoras endoteliais, que são essenciais para a “limpeza” e a regeneração vascular.

Por outro lado, no sangue envelhecido há predomínio de fatores pró-inflamatórios, largamente liberados por células senescentes, além de uma falha no sistema imunológico, resultando no acúmulo de células senescentes no tecido vascular, levando a um “ambiente estressante”, que está associado ao desenvolvimento e progressão das doenças cardiovasculares (CANNATÁ *et al.*, 2017; GREGERSEN *et al.*, 2016; MINCIULLO *et al.*, 2016).

Assim, o remodelamento vascular, pelo processo de envelhecimento ou decorrente de patologias, é acompanhado pelo estresse oxidativo e inflamação, resultando no aumento de células senescentes nesses tecidos (CALCINOTTO *et al.*, 2019). Sendo assim, compreender o processo de envelhecimento é necessário não apenas para aprender sobre a etiologia relacionada aos processos degenerativos, mas fundamental para conhecer e

desenvolver técnicas capazes de atenuar ou retardar os efeitos da senescência cardiovascular, criando um ambiente favorável que atenua a progressão da disfunção endotelial e o remodelamento vascular associado (ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017).

2.2.1 Modelo de envelhecimento induzido por D-galactose

O modelo de envelhecimento induzido por D-galactose é baseado na teoria metabólica do envelhecimento, cujos sintomas são semelhantes aos do processo natural de envelhecimento (KONG *et al.*, 2018). Entre os modelos de envelhecimento conhecidos, é o preferido devido à sua conveniência, menos efeitos colaterais e maior taxa de sobrevivência durante o período experimental (AZMAN; ZAKARIA, 2019).

A D-galactose é um monossacarídeo redutor que está presente naturalmente no corpo e também em muitos alimentos, como leite, manteiga, queijo, iogurte, mel, beterraba, ameixa, cereja, figo e salsão (AZMAN; ZAKARIA, 2019). Além disso, é um nutriente fisiológico, que pode ser metabolizado pela ação das enzimas D-galactoquinase e galactose-1-fosfato uridiltransferase em concentrações fisiológicas normais (LIU *et al.*, 2020).

No entanto, quando ocorre acúmulo excessivo de D-galactose, esta é convertida em aldose e peróxido de hidrogênio sob a catálise da enzima galactose oxidase, resultando na produção de ROS, bem como de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (LIU *et al.*, 2020; AZMAN; ZAKARIA, 2019).

A formação em excesso de ROS resulta diretamente em estresse oxidativo e respostas pró-inflamatórias, o que ocasiona desequilíbrio redox, resultando em oxidação de proteínas, peroxidação de lipídica e danos mitocondriais e ao DNA, que podem inibir precisamente as funções celulares normais e até mesmo causar apoptose (KONG *et al.*, 2018). Além disso, os AGEs podem se acumular em vários tecidos e órgãos do corpo, levando a danos contínuos às células, tecidos e órgãos e, por fim, acelerar o envelhecimento.

Nesse sentido, a preservação da função da defesa antioxidante bem como a inibição do estresse oxidativo são métodos importantes para retardar e controlar o processo de envelhecimento (WANG *et al.*, 2020).

2.2.2 O Carvacrol

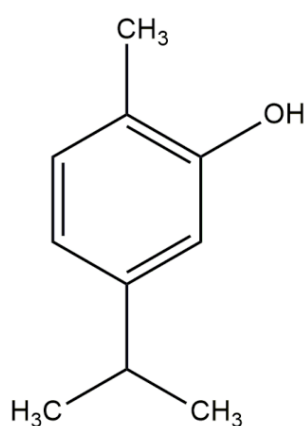
O interesse por produtos naturais que possuem atividade biológica tem estimulado significativamente estudos envolvendo plantas. Os produtos vegetais e seus derivados têm sido considerados uma fonte de elementos terapêuticos desde a antiguidade (SAMARGHANDIAN *et al.*, 2016). Esses produtos representam mais de 50% de todos os medicamentos em uso clínico no mundo (VEERESHAM, 2012).

As propriedades farmacêuticas de plantas aromáticas são parcialmente atribuídas à presença de óleos essenciais em sua constituição, que são constituídos por uma mistura complexa de terpenos e alguns não-terpenos (NAKAMURA DE VASCONCELOS *et al.*, 2018). Atualmente, existe um grande interesse sobre a pesquisa em óleos essenciais de diferentes fontes vegetais com potencial atividade antioxidante.

Comumente, óleos essenciais têm sido relatados como promissores no desenvolvimento de agentes terapêuticos aplicados a doenças cardiovasculares (DE ANDRADE *et al.*, 2017). Os monoterpenos são componentes voláteis de baixo peso molecular que representam cerca de 90% dos óleos essenciais e são dotados de várias propriedades biológicas e farmacológicas (COSTA *et al.*, 2019).

O carvacrol, 2-metil-5-(1-metiletil)-fenol (figura 1), cuja fórmula molecular é $C_{10}H_{14}O$, é um monoterpeno fenólico constituinte do óleo essencial de algumas espécies de plantas da família *Lamiaceae*, tais como orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e pimenta (*Lepidium flavum*) (LIU; QIAO; ZHANG, 2019; SHARIFI-RAD *et al.*, 2018).

Figura 1 – Estrutura química do carvacrol



Fonte: ZHANG *et al.*, 2018.

Ele possui peso molecular de 150,22 g/mol e densidade de 0,977 g/mL à temperatura de 25°C (SAMARGHANDIAN *et al.*, 2016). Ademais, é um metabólito secundário volátil que é

líquido à temperatura ambiente, além de ser insolúvel em água, mas solúvel em etanol (LIU; QIAO; ZHANG, 2019).

Na literatura científica, alguns estudos sobre a toxicidade do carvacrol foram relatados. Uma dose letal média (DL50) de carvacrol de 810 mg/kg de peso corporal foi observada em ratos tratados por gavagem oral, enquanto que, em camundongos, os valores de DL50 de 80 mg/kg, 73,30 mg/kg e 680 mg/kg foram relatados para administração intravenosa, intraperitoneal e subcutânea, respectivamente (MARCHESE *et al.*, 2018). Em sua estrutura química, o grupo –OH está presente na posição –orto em relação ao grupo metil presente no anel aromático. A posição e a presença dos substituintes são essenciais para as propriedades químicas e atividades biológicas do composto (MARCHESE *et al.*, 2018).

Vários estudos indicam que o carvacrol apresenta uma variedade de atividades importantes, incluindo suas propriedades anti-inflamatória, antitumoral, analgésica, anti-hepatotóxica, antimicrobiana e inseticida (SAMARGHANDIAN *et al.*, 2016). Além disso, pesquisas demonstram que o carvacrol possui fortes propriedades antioxidantes por aumentar significativamente os níveis de algumas enzimas antioxidantes, tais como GSH, e por sua capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio, prevenindo, assim, contra o estresse oxidativo, fenômeno presente em doenças cardiovasculares e no envelhecimento. Desse modo, sugere-se que o carvacrol pode ser eficaz na prevenção e atenuação de diversas doenças (SAMARGHANDIAN *et al.*, 2016; MELUSOVA *et al.*, 2014).

2.3 Evidências científicas sobre os efeitos de plantas e seus metabólitos no envelhecimento do sistema cardiovascular em modelo induzido por D-galactose

Para elaboração da Revisão Integrativa, se obteve a amostra final de oito artigos, sendo o mais antigo deles, publicado em 2012, já o mais recente, em 2019, dos quais um (12,5%) foi publicado em 2012, um (12,5%) em 2014, dois (25%) em 2016, um (12,5%) em 2017, um (12,5%) em 2018 e, por fim, dois (25%) em 2019. Em relação ao idioma presente dos estudos, todos foram publicados em inglês e em periódicos internacionais.

Em relação à localização da realização dos trabalhos, todos foram concentrados no continente Asiático, com seis deles sendo realizados exclusivamente na China (75%) e dois (25%) em Taiwan. Com relação ao método, houve a predominância de delineamento quantitativo e de estudos do tipo experimental para todos os oito artigos analisados (100%).

A relação dos estudos incluídos na revisão está sintetizada no Quadro 1 e organizada de acordo com os autores, ano de publicação, objetivos, exposição/intervenção e os

desfechos/conclusão. Na presente revisão integrativa, foram selecionados um total de 8 artigos que demonstraram os efeitos de várias plantas e seus metabólitos (*Ginkgo biloba*, ginsenosídeo, Antocianinas, *Cuscuta chinensis Lam*, AOF, folhas e flores de *Paeonia rockii* e extrato do chá de *Apocynum venetum*) na terapêutica de doenças cardiovasculares causadas pelo envelhecimento induzido por D-galactose em ratos.

De acordo com o quadro 1 observa-se que todas as substâncias dos estudos selecionados demonstraram possuir efeitos benéficos sobre o envelhecimento a nível de sistema cardiovascular em ratos submetidos ao envelhecimento acelerado induzido por D-galactose em diferentes doses.

As pesquisas mostram que o tratamento com os extratos *Alpinate Oxyphyllae Fructus* (AOF), ginsenosídeo e o de *Ginkgo biloba* em ratos envelhecidos promoveu, de forma geral, diminuição na expressão de proteínas relacionadas à senescência e seus biomarcadores, sugerindo que os mesmos podem exercer um efeito cardioprotetor contra o processo de envelhecimento celular. Além disso, os tratamentos com *Aronia melanocarpa* e *Alpinate Oxyphyllae Fructus* promoveram efeitos benéficos sobre as alterações ao nível de anatomia do músculo cardíaco por meio da melhora do processo de fibrose e do quadro de hipertrofia cardíaca.

Ainda, alguns extratos como Sementes de *Cuscuta chinensis Lam*, flores e folhas de *Paeonia rockii*, o *Alpinate Oxyphyllae Fructus* e o chá de *Apocynum venetum* também demonstraram efeitos benéficos sobre o envelhecimento do sistema cardiovascular por promoverem aumento na expressão de enzimas antioxidantes, efeito protetor contra o processo de apoptose celular, além de diminuírem a expressão de fatores pró-inflamatórios.

Quadro 1 – Síntese das características dos estudos incluídos na revisão integrativa de acordo com os autores, ano de publicação, objetivos, exposição/intervenção e o desfecho/resultados utilizados - 2020.

Artigos	Objetivos	Exposição/Intervenção	Desfecho/Resultados
Artigo 1- LIU <i>et al.</i> , 2012, China, Oxidative Medicine and Cellular Longevity.	O objetivo do presente estudo foi investigar os potenciais efeitos do EGB761 (Extrato de <i>Ginkgo biloba</i>) em cardiomiócitos de ratos submetidos ao envelhecimento acelerado induzido por D-galactose.	Os cardiomiócitos primários de ratos foram tratados com D-galactose e D-galactose+ EGB761 por 48 h. Após o tratamento, mediu-se a percentagem de células positivas para SA- β -gal, produção de AGEs, a atividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático cardíaco (SERCA), captação de cálcio e níveis relativos de proteína.	Neste estudo, foi possível concluir que o EGB761 foi capaz de aliviar a rigidez miocárdica e a tensão de repouso, protegendo os cardiomiócitos contra a disfunção diastólica associada ao envelhecimento. Além disso, o EGB761 atenuou a formação intracelular de AGEs e retardou o processo de senescência celular.
Artigo 2 – LI <i>et al.</i> , 2016, China, Genetics and Molecular Research.	Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do ginsenosídeo Rg1 no processo de envelhecimento celular induzido por D-galactose em musculares lisas vasculares (CMLVs).	Células do Músculo Liso Vascular foram cultivadas e divididas em grupos controle, D-galactose (D-gal), Rg1-L e Rg1-H, que foram cultivadas sem e com D-gal, e com baixa e alta concentração de Rg1, respectivamente. A senescência celular induzida por D-gal foi identificada pela coloração de beta-galactosidase e foram observadas alterações ultra-estruturais nas células. A expressão de p16, p21 e p53 nos quatro grupos de CMLVs foi determinada por Western blotting, e o ciclo celular foi investigado por citometria de fluxo.	Os resultados mostram que o ginsenosídeo Rg1 pôde reduzir a expressão de proteínas relacionadas à senescência (p16, p21 e p53), além de diminuir o número de células senescentes, protegendo contra o processo de envelhecimento a nível celular.
Artigo 3 – XU <i>et al.</i> , 2019a, China, Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research.	O estudo teve como objetivos identificar e esclarecer os efeitos da <i>Aronia melanocarpa</i> (espécie de arbusto da família <i>Rosaceae</i>) sobre o modelo de envelhecimento induzido por D-galactose através de simulações dinâmicas moleculares.	Para acelerar o envelhecimento, ratos da espécie Kunming receberam injeção de D-galactose, na dose de 150 mg/kg/d e foram tratados com antocianinas na dose de 20 e 40 mg/kg.	Os resultados mostraram que as Antocianinas, pigmentos presentes na <i>Aronia melanocarpa</i> , foram capazes de diminuir a lesão cardíaca consequente do processo de envelhecimento, através da diminuição do grau de fibrose cardíaca. Dessa forma, sugere-se que esses compostos podem ser eficazes em retardar a degeneração cardíaca no envelhecimento.

Artigo 4 – CHANG <i>et al.</i>, 2017, Taiwan, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine	O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito protetor de <i>Alpinate Oxyphyllae Fructus</i> (AOF) contra a hipertrofia cardíaca em modelo de envelhecimento animal induzido por D-galactose.	34 ratos Sprague-Dawley machos, com 8 semanas de idade, foram divididos em 5 grupos: um grupo controle normal e os outros quatro foram submetidos ao processo de envelhecimento induzido por D-galactose (150mg/kg/dia). Desses, três grupos foram tratados com AOF nas doses de 50, 100 e 150mg/kg/dia, respectivamente. Os tecidos cardíacos coletados foram corados com hematoxilina-eosina e, para análise das proteínas presentes, foram utilizados os métodos de eletroforese e Western-Blot.	Verificou-se que os grupos tratados com AOF tiveram melhora na hipertrofia cardíaca, de uma maneira dependente da dose. Além disso, os biomarcadores de senescência estiveram diminuídos em comparação ao grupo tratado apenas com D-galactose, sugerindo que o tratamento com AOF pode exercer efeito cardioprotetor contra o processo de senescência.
Artigo 5 – SUN <i>et al.</i>, 2014, China, Molecular Biology Reports	Investigar o mecanismo de apoptose em células do miocárdio de ratos idosos induzidos por D-galactose e estudar o efeito do Polissacarídeo isolado das Sementes de <i>Cuscuta chinensis</i> Lam (PCCL) na apoptose de cardiomiócitos.	50 ratos Sprague Dawley machos foram divididos aleatoriamente em 5 grupos: Grupo controle normal (NC). Grupo de envelhecimento induzido (D-galactose 100 mg/kg/d por 56 dias), Dgalactose+100 mg/kg/d do composto PCCL, Dgalactose+200 mg/kg/d de PCCL, e D-galactose+400 mg/kg/d de PCCL. Mesmo volume de solução (água ou solução aquosa de PCCL) foi dado por gavagem por 56 dias. Em seguida, os corações foram coletados e os parâmetros de apoptose foram avaliados. A caspase-3 (proteína apoptótica) e Citocromo c foram determinadas por espectrometria de fluorescência, a taxa de apoptose foi avaliada pelo método Anexina-FITC por citometria de fluxo, $[Ca^{2+}]_i$ e $[Ca^{2+}]_o$ sobrecarregado por KCL foram observados por microscopia confocal de varredura a laser (LSCM). Bcl-2 e Bax (prot antiapoptóticas) foram examinadas por imuno-histoquímica	Verificou-se que o PCCL exerceu um efeito protetor no processo de apoptose (morte celular) em cardiomiócitos de ratos envelhecidos por D-galactose, pois diminuiu a expressão de proteínas pró-apoptóticas, mantendo um equilíbrio entre os níveis de fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos

Artigo 6 – CHANG <i>et al.</i>, 2016, Taiwan, International Journal Of Molecular Sciences.	O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos Anti-Apoptóticos e de Pró-Sobrevivência do <i>Alpinate Oxyphyllae Fructus</i> (AOF) em coração envelhecido por D-galactose.	Ratos Sprague-Dawley (SD) machos com 8 semanas de idade foram segregados em 5 grupos: grupo controle, grupo de envelhecimento induzido por D-Galactose e os outros 3 tratados com AOF nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg/dia. Após 8 semanas, os corações foram medidos por coloração com hematoxilina-eosina, por marcação com extremidade de entupimento terminal de desoxinucleotidil-transferase dUTP (TUNEL) e Western blot.	8 semanas de tratamento com AOF proporcionou benefícios notáveis em ratos envelhecidos por D-galactose. Esses resultados demonstraram que o tratamento com AOF atenua eficientemente a apoptose dos cardiomiócitos em ratos idosos, além de promover a prevenção da remodelação ventricular em doenças cardiovasculares aumentadas pelo envelhecimento.
Artigo 7 – BAO <i>et al.</i>, 2018, China, Molecules.	Este estudo teve como objetivo investigar o potencial antioxidante de folhas e flores de <i>Paenonia rockii</i> e identificar seus compostos antioxidantes por meio de UHPLC-ESI-HRMSn e uma reação DPPH pré-coluna.	Ensaio <i>in vivo</i>: Ratos foram divididos aleatoriamente em 6 grupos, cada um contendo 10 ratos. Grupo I: recebeu solução salina normal (100 mg/kg) por via subcutânea, 1x ao dia por 6 semanas. Os grupos II-VI receberam doses de 100 mg/kg de D-Gal, via intraperitoneal, 1x ao dia durante 6 semanas. O grupo II recebeu solução salina normal (100 mg/kg), via gavagem, e o grupo III recebeu ácido ascórbico (100 mg/kg em água salina). Os grupos IV-VI receberam doses altas (400 mg/kg), moderadas (200 mg/kg) e baixas (100 mg/kg) de extrato metanólico das flores de <i>Paenonia rockii</i>, via gavagem, por 3 semanas. Também foram realizados testes para determinação dos componentes antioxidantes presentes nas flores e folhas de <i>Paenonia rockii</i> (via DPPH-UHPLC-ESI-HRMSn).	Este estudo revelou a presença de compostos antioxidantes nas flores e folhas de <i>Paenonia rockii</i>, através do método DPPH-UHPLC-ESI-HRMSn <i>in vitro</i>. A capacidade antioxidante das flores de <i>Paenonia rockii</i> foi evidenciada pela redução de 8-iso PGF2α e proteína carbonil e por um aumento simultâneo dos níveis de SOD e GSH (enzimas antioxidantes) <i>in vivo</i>.
Artigo 8 - LI <i>et al.</i>, 2019, China, Antioxidants.	Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor do extrato do chá de <i>Apocynum venetum</i> (AVTE) e determinar seus compostos bioativos, em modelo de envelhecimento induzido por D-galactose em camundongos.	Os ratos foram divididos em 4 grupos (grupo controle, grupo modelo, grupo de baixa dose e grupo de alta dose), a fim de se estudar o efeito preventivo do extrato em modelo de envelhecimento induzido por D-galactose. O grupo controle não recebeu tratamento adicional. Os ratos dos outros 3 grupos receberam 120 mg/kg/d de D-galactose injetados por via intraperitoneal. Os ratos do grupo de baixa dose receberam 250 mg/kg/d do extrato administrado por via oral enquanto os camundongos do	Em resumo, os efeitos do AVTE (250, 500 mg/kg) sobre o modelo D-gal incluem melhoria da morfologia, edema e inflamação dos hepatócitos; regulação positiva de SOD, CAT, GSH, GSH-Px, T-AOC e regulação negativa dos níveis de MDA; reduções na concentração de fatores pró-inflamatórios (IL-6, TNF-α e IL-1β) e aumento na concentração de fator anti-inflamatório IL-10.

		grupo de altas doses receberam 500 mg/kg/d, também administrado por via oral. Também foram realizadas análises histológicas, medidas de citocinas, etc.	
--	--	---	--

Fonte: Autoria própria (2021).

A D-galactose tem sido amplamente usada em estudos farmacológicos experimentais relacionados ao envelhecimento, principalmente para avaliar alterações a nível cardiovascular (BO-HTAY *et al.*, 2018). Na presente revisão integrativa, foram selecionados um total de 8 artigos que demonstraram os efeitos de várias substâncias na terapêutica de doenças cardiovasculares causadas pelo envelhecimento induzido por D-galactose em ratos.

De acordo com Chang *et al* (2017), que utilizou o *Alpinate Oxyphyllae Fructus* (AOF) em seus estudos, esta planta medicinal é responsável por induzir um efeito protetor contra a hipertrofia cardíaca em ratos idosos, impedindo a deterioração funcional cardíaca relacionada a idade. Foi demonstrado que o tratamento com AOF proporciona efeitos potencialmente positivos na morfologia das células cardíacas e na contração cardíaca.

Além disso, foi verificado que o AOF também foi responsável por inibir a apoptose (morte celular) cardíaca em ratos envelhecidos por D-galactose por aumentar os níveis de algumas proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xL, além de diminuir significativamente os níveis de várias proteínas pró-apoptóticas, como Caspase-3,8 e 9. Estes resultados sugerem que o tratamento com AOF atenua eficientemente a apoptose de cardiomiócitos em ratos idosos, além de prevenir contra a remodelação ventricular presente em doenças cardiovasculares no envelhecimento (CHANG *et al.*, 2017).

Outra substância que exerceu um efeito cardioprotetor contra as doenças cardiovasculares em decorrência do processo de envelhecimento foi o Polissacarídeo isolado de sementes de *Cuscuta chinensis Lam* (PCCL) (SUN *et al.*, 2014). A partir dos resultados do estudo foi possível observar que esse composto natural foi capaz de prevenir o fenômeno de apoptose celular por causar uma diminuição da expressão de proteínas pró-apoptóticas, sugerindo ser um importante candidato a ser utilizado na terapêutica contra os efeitos cardiovasculares relacionados ao envelhecimento (AHMAD *et al.*, 2017; DONNAPEE *et al.*, 2014).

De acordo com os estudos feitos por Liu *et al.* (2012), que objetivaram investigar os potenciais efeitos do EGB761 (Extrato padronizado de *Ginkgo biloba*) sobre a disfunção diastólica celular em ratos envelhecidos por D-galactose, foi possível concluir que este extrato aliviou a rigidez miocárdica, protegendo contra a rigidez diastólica associada ao

envelhecimento nos cardiomiócitos. Além disso, ocasionou diminuição significativa de marcadores de senescência cardíaca e de produtos de glicação avançada (AGEs) que são tóxicos e estão relacionados a várias doenças, como a diabetes.

O extrato de *Ginkgo biloba* tem sido utilizado na medicina tradicional chinesa há milhares de anos para tratar várias doenças associadas ao envelhecimento. Este trabalho é o primeiro a comprovar diretamente a eficácia da disfunção diastólica anti-idade associada ao EGB761 em cardiomiócitos *in vitro* (LIU *et al.*, 2012).

O EGB761 pode aliviar a rigidez miocárdica e a tensão de repouso, protegendo o coração contra a disfunção diastólica associada ao envelhecimento nos cardiomiócitos. Outras substâncias estudadas, como as Antocianinas presentes na *Aronia melanocarpa* e o ginsenosídeo Rg1, também demonstraram efeitos sobre a senescência celular através da inibição deste processo e da diminuição da expressão de proteínas relacionadas à senescência, além de terem sido responsáveis pela diminuição da lesão cardíaca causada pelo processo de envelhecimento. Isso sugere que essas substâncias podem servir de base para mais pesquisas e, futuramente, serem utilizadas na terapêutica de doenças relacionadas ao envelhecimento cardiovascular (LI *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2019a; LI *et al.*, 2016).

Um dos fenômenos presente no processo de envelhecimento e nas patologias cardiovasculares é o estresse oxidativo, que decorre do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, causado por uma série de processos celulares complexos, como o acúmulo de peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e ânions superóxido. O acúmulo de ROS e consequente diminuição de enzimas antioxidantes endógenas (como CAT, SOD e GPx) leva a um dano oxidativo no DNA, em proteínas e lipídios, gerando disfunção celular (SENONER; DICHTL, 2019; RITCHIE *et al.*, 2017; TOYOKUNI, 2016).

O estudo realizado por Bao *et al.*, em 2018, buscou determinar o potencial antioxidante do extrato de flores e folhas da *Paenia rockii*, bastante utilizada na medicina tradicional chinesa e com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e cardioprotetoras, principalmente contra o fenômeno do estresse oxidativo.

O tratamento com D-galactose para induzir o envelhecimento acelerado em roedores promoveu aumento dos níveis de 8-iso PGF2 α e MDA, que são indicadores bioquímicos no fígado e no cérebro, além de ter sido capaz de reduzir os níveis das enzimas antioxidantes SOD e GSH.

Os resultados da pesquisa mostraram que o extrato de flores de *Paenia rockii* foi capaz de promover aumento dos níveis da enzima antioxidante SOD, e uma diminuição dos níveis de

indicadores bioquímicos, que normalmente estariam aumentados em decorrência da ação da D-galactose.

Essa atividade antioxidante do extrato deve-se a presença de grandes quantidades de flavonóides totais e de ácidos fenólicos presentes. Diante disso, sugere-se o potencial terapêutico dos extratos de flores e folhas de *Paenia rockii* na prevenção ou tratamento de doenças causadas pelo estresse oxidativo (BAO *et al.*, 2018).

Outro possível candidato na prevenção/atenuação das doenças citadas acima é o extrato do chá de *Apocynum venetum*, o qual também faz parte da medicina tradicional chinesa. Li *et al* (2019) buscaram avaliar o efeito protetor desse extrato em modelo de envelhecimento induzido por D-galactose em ratos, além de analisar seus compostos antioxidantes.

Com relação aos resultados, foi possível verificar seu efeito anti-inflamatório, pois diminuiu a concentração de fatores pró-inflamatórios (IL-6, TNF- α e IL-1 β), houve aumento da expressão de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSH-Px), além de melhorar os quadros de edema, necrose e inflamação no fígado em decorrência do processo de envelhecimento induzido por D-galactose. Sendo assim, é possível sugerir que o chá feito à base de *Apocynum venetum* possui propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que são de extrema importância no tratamento de doenças causadas pelo estresse oxidativo e envelhecimento (LI *et al.*, 2019).

A próxima seção se destina aos aspectos metodológicos deste trabalho.

3 PERCURSO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo experimental pré-clínico. De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2013), os ensaios pré-clínicos caracterizam-se pelas pesquisas realizadas com a finalidade de se descobrir ou comprovar a eficácia farmacológica, e os possíveis efeitos tóxicos do produto farmacêutico em experimentação, podendo ser realizados *in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*.

Dessa forma, este estudo buscou avaliar os efeitos de um composto natural, o Carvacrol, sobre o sistema cardiovascular, em modelo de envelhecimento animal induzido por D-galactose.

3.2 Etapas da Pesquisa

3.2.1 Revisão integrativa

Trata-se de uma revisão integrativa de literatura, no intuito de sumarizar os resultados de estudos publicados sobre o tema, com a finalidade de cooperar para a obtenção de conhecimento científico e o cuidado em saúde baseado em evidência. Esse tipo de revisão decorre da premissa que a combinação de métodos de pesquisa pode contribuir na melhora do cuidado prestado (LACERDA *et al.*, 2012; FLEMMING, 2007).

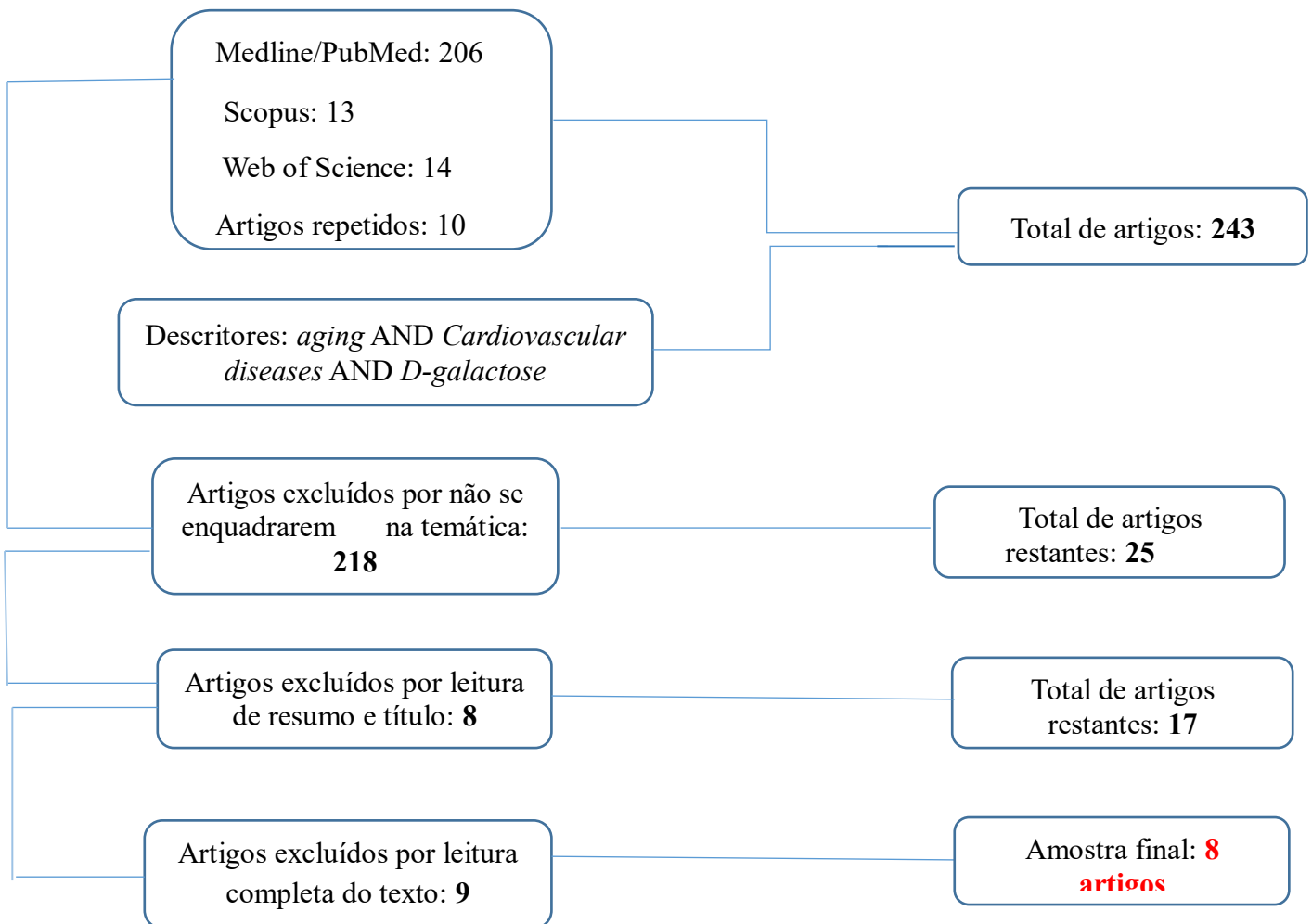
Para tanto, seguiu-se as seguintes fases: introdução e justificativa do tema e elaboração da pergunta norteadora: O efeito antioxidante desses compostos naturais é suficiente para prevenir os efeitos do envelhecimento sobre o sistema cardiovascular induzido pela ingestão crônica de D-galactose?

Depois, partiu-se para a busca nas bases de dados, a coleta de dados, análise crítica dos resultados dos estudos incluídos, discussão desses resultados e apresentação da revisão integrativa. Seguiu-se o percurso metodológico de acordo com PRISMA.

As bases pesquisadas foram: *Medline*, *Scopus* e *Web of Science*, e usando os descritores indexados no *Mesh Terms* e seus cruzamentos “aging”, “D-galactose”, “Cardiovascular diseases”, com o uso do operador booleano AND. Realizou-se ajuste na estratégia de busca de acordo com as especificidades de cada base, adequando-se à pergunta norteadora e aos critérios de inclusão do estudo. Não foi utilizado limitador de tempo e de idioma, nem como a pesquisa em literatura cinzenta.

Assim, os critérios de inclusão foram: artigos científicos de dados primários, que abordassem estudos avaliando os efeitos de plantas e seus metabólitos sobre as doenças cardiovasculares no modelo de envelhecimento induzido por D-galactose em ratos. Os critérios de exclusão, por sua vez, foram os seguintes: artigos de revisão; artigos que não utilizaram o modelo de envelhecimento induzido por D-galactose em ratos; estudos que não avaliaram efeitos de compostos naturais; capítulos de livro; trabalhos científicos apresentados em congressos; artigos duplicados.

A partir da busca nas bases de dados, o método de seleção e de inclusão dos estudos foi baseado nas seguintes etapas: primeiro, foram retirados os artigos que não se encaixavam ao tema da pesquisa, sendo assim, do total de 243 artigos, foram excluídos 218. Em seguida, foi realizada a leitura dos títulos e resumos dos 25 artigos restantes, de acordo com os critérios de inclusão do estudo. A partir daí, foram excluídos 8 artigos que não se encaixavam às propostas e se procedeu a leitura, na íntegra, de 17 artigos, sendo 9 excluídos por não responderem à questão norteadora desta revisão e não contemplarem o objetivo da pesquisa. Sendo assim, concluiu-se com uma amostra composta por 8 estudos selecionados. A Figura 2, exposta na página seguinte, mostra o processo de seleção dos estudos desta revisão integrativa.

Figura 2 - Fluxograma de seleção e de inclusão dos estudos da revisão integrativa

Fonte: Autoria própria (2021).

3.2.2 Experimento *ex vivo*

Tratou-se de uma pesquisa experimental, com ensaios *in vitro* realizados no Laboratório de farmacologia cardiovascular do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos IPeFarM/UFPB, bem como ensaios *in vivo*, realizados no Laboratório de Ensaios Pré-Clínicos de Envelhecimento, localizado no Instituto Paraibano de Envelhecimento. A pesquisa objetivou avaliar o efeito do Carvacrol, um monoterpene, sobre as doenças cardiovasculares em modelo de envelhecimento acelerado induzido por D-galactose.

3.2.3 Produto: Emulsão à base de carvacrol

O produto objeto desta pesquisa é uma emulsão com a seguinte composição: óleo de carvacrol (mL), solubilizado em cremofor® (na proporção de 0,03%) e diluído em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), de modo a serem obtidas as doses desejadas para cada protocolo experimental.

Este produto foi encaminhado para a Agência de Inovação da UFPB-INOVA-UFPB para que seja depositada a sua patente. Esta está tramitando em sigilo, com várias reivindicações, dentre as quais por sua atividade antioxidante e anti-senescente.

3.3 Local da Pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos IPeFarM/UFPB, bem como no Laboratório de Ensaio Pré-Clínicos de Envelhecimento, localizado no Instituto Paraibano de Envelhecimento.

3.4 População e Amostra

Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, todos entre 8-9 semanas de idade, provenientes da Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM da Universidade Federal da Paraíba. Estes animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$), ventilação, com ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso a água e alimentação. Os animais foram instalados em gaiolas plásticas de dimensão 49x34x16 (CxLxA, em cm), com no máximo 4 ratos cada uma. O modelo de envelhecimento acelerado foi induzido através da injeção de D (+) galactose, na dose de 250 mg/kg/dia por via intraperitoneal.

Os ratos foram divididos em 4 grupos:

- Grupo Controle (CTL): Ratos que receberam solução salina, por via oral e intraperitoneal, por 8 semanas (n=8);
- Grupo D-Galactose (Dgal): Ratos submetidos a 250mg/kg/dia, i.p. de D-galactose durante 8 semanas (n=8);
- Grupo D-Galactose + Carvacrol 50 mg/kg (Dgal+C50): Ratos submetidos a 250mg/kg/dia, i.p. de D-galactose durante 8 semanas, e tratados com carvacrol na dose de 50 mg/kg, por via oral (n=8);

- Grupo D-Galactose + Carvacrol 100mg/kg (Dgal+C100): Ratos submetidos a 250mg/kg/dia, i.p. de D-galactose durante 8 semanas, e tratados com carvacrol na dose de 100 mg/kg, por via oral (n=8);

A solução de carvacrol foi diariamente preparada nas doses utilizadas no estudo. Todos os grupos experimentais descritos foram submetidos à administração diária, por via intragástrica (i.g.) em volume padronizado igual ou inferior a 5 mL/Kg, nos seus respectivos tratamentos, durante o período de oito semanas. Os animais que pertenceram aos grupos submetidos ao tratamento com D-galactose (Dgal, Dgal+C50, Dgal+C100) receberam administração diária, por via intraperitoneal (i.p.), de D-galactose, durante as oito semanas de tratamento. Os grupos CTL (controle) e Dgal receberam solução salina solubilizadas em cremofor®, na mesma proporção utilizada para a solubilização do carvacrol.

3.4.1 Substâncias

Para a realização dos protocolos experimentais, foram utilizadas as seguintes substâncias: carvacrol, cremofor®, cloridrato de acetilcolina (ACh), fenilefrina (FEN), nitroprussiato de sódio (NPS), di-hidroetídio (DHE) e D-galactose. Todos foram obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil). Já o Cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina foram obtidos da Syntec; Santana de Parnaíba – SP, Brasil.

3.4.2 Solução nutritiva

Nos protocolos *in vitro* foi utilizada solução de Tyrode, aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantida a 37° C. Para preparação dessa solução nutritiva foram utilizados os seguintes sais: NaCl; KCl; MgCl₂. 6H₂O; NaH₂PO₄.H₂O; NaHCO₃; Glicose; CaCl₂.2H₂O; todos obtidos da Sigma-Aldrich®.

3.4.3 Obtenção e preparação das soluções de carvacrol

O carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) foi adquirido da Sigma-Aldrich Brasil LTDA (Cat#282197). Para preparação das soluções estoques, o carvacrol foi previamente solubilizado em cremofor® e diluído em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), de modo a serem obtidas as doses desejadas para cada protocolo experimental. As concentrações de cremofor® em

solução não excederam 0,03%, e esse solubilizante foi testado com a finalidade de comprovar a ausência de efeito biológico.

3.5 Procedimentos para Coletas dos Dados

3.5.1 Aspectos Éticos do Estudo

Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com projeto aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB), sob o número de protocolo **3183120919**.

3.5.2 Metodologia de medida da pressão arterial (Tail Cuff)

O sistema de aquisição de pressão arterial não invasivo CODA 8 (Kent Scientific, Torrington, CT) foi usado para todas as medições do punho da cauda. Este sistema usa VPR (Gravação de Volume de Pressão) para detectar a pressão arterial com base nas alterações de volume da cauda. A desobstrução da oclusão e dos manguitos VPR foi verificada rotineiramente antes do início dos experimentos. Os estudos de medição da pressão arterial e procedimentos de aclimação dos animais foram realizados em uma área tranquila, sem barulho excessivo, e em condições de temperatura ideal (22 ± 2 ° C) (WILDE *et al.*, 2017).

Depois de aquecidos por 30 minutos, os ratos foram então encorajados a entrar nos tubos de contenção de acrílico, e os suportes de extremidade desses tubos foram ajustados para evitar movimento excessivo do animal. O manguito de oclusão foi colocado na base da cauda e o manguito do sensor VPR foi colocado adjacente ao manguito de oclusão. Os ratos foram aquecidos por 5 minutos antes e durante as gravações da pressão arterial. Para medir a pressão arterial, o manguito de oclusão é inflado a 250 mm Hg e desinflado por 20s. Os sensores de pulso captaram os estímulos mecânicos e transformaram em estímulo elétrico, tendo a medida do pulso (WILDE *et al.*, 2017).

Ao observar que o sinal do pulso estava estável, foram realizadas as medidas de pressão arterial. Promoveu-se uma interrupção do fluxo sanguíneo na artéria ao inflar a bomba do sistema, perdendo assim o pulso captado pelo sensor. Quando foi retornado o pulso do animal, caracterizou-se a pressão sistólica, e o posterior retorno do pulso à sua amplitude total caracterizou-se a pressão diastólica (WILDE *et al.*, 2017; FRITZ; RINALDI, 2008).

Os sinais a partir dos sensores de pressão e sensores de pulso foram convenientemente amplificados e depois registrados em um *software* adequado (Labchart) no qual foram visualizadas as medidas de pulso, pressão e frequência cardíaca. Em seguida, tais medidas foram salvas para avaliar posteriormente todo procedimento (WILDE *et al.*, 2017).

3.5.3 Preparação de anéis de artéria mesentérica superior isolada de rato

Para realização dos ensaios de reatividade foram utilizados uma média de 4 animais por grupo. Imediatamente após a eutanásia dos animais, as artérias mesentéricas superiores foram identificadas, removidas e imediatamente colocadas sob solução gelada de Tyrode, onde o vaso foi dissecado e seccionado em anéis (1-2mm de comprimento), preservando a camada muscular e endotelial.

Em seguida, os cortes foram transferidos para um sistema de banho de órgãos isolados. Estes anéis foram montados em duas hastes de aço, sendo uma fixa, e outra acoplada a um Transdutor de força (*PowerLab, ADInstruments*, MA, EUA) sujeito a variações de tensões isométricas. As artérias foram mantidas em cubas com capacidade para 10ml, contendo solução de Tyrode, a 37°C e aeradas com uma mistura carbogênica de 95% de O₂ e 5% de CO₂. Dependendo do protocolo, o endotélio de alguns anéis foram removidos através de atrito mecânico entre as paredes internas do vaso e uma haste de metal.

Todos os anéis foram submetidos a uma tensão basal de 0,75 g, por um período de estabilização de 1 hora (60 minutos). Durante este período, a solução de Tyrode foi trocada a cada 15 minutos para prevenção do acúmulo e interferência de metabólitos, e a tensão basal foi ajustada quando necessário (ALTURA; ALTURA, 1970).

3.5.4 Avaliação da resposta contrátil em anéis de artéria mesentérica superior

Após avaliar a integridade funcional dos segmentos vasculares, os anéis de artéria mesentérica foram submetidos a um novo período de estabilização. Em seguida, concentrações crescentes e cumulativas de fenilefrina (FEN, 10^{-9} – 10^{-4} M) foram adicionadas às cubas do Sistema de banho de órgãos, e as respostas obtidas após a adição do agonista foram utilizadas para a criação de uma curva concentração-resposta.

3.5.5 Avaliação da resposta relaxante em anéis de artéria mesentérica superior

No tônus da contração induzida pela adição cumulativa de FEN (fenilefrina) (10^{-3}M), foram adicionadas concentrações crescentes e cumulativas de acetilcolina (ACh, 10^{-10} – 10^{-4}M) ou nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-12} – 10^{-6}M) no sistema de banho de órgãos. As respostas adquiridas foram utilizadas para a criação de uma curva concentração-resposta.

3.5.6 Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre a hipertrofia cardíaca

Após a eutanásia dos animais, a cavidade torácica foi aberta e os corações removidos e perfundidos com solução salina tamponada para remoção de todo o sangue. Para avaliação da hipertrofia cardíaca, o coração foi dissecado e tanto o VE (ventrículo esquerdo) quanto o VD (ventrículo direito), foram retirados e separados. O grau de hipertrofia ventricular foi calculado através da relação entre o peso dos ventrículos direito e esquerdo do coração e o peso corporal dos animais, em mg/g (ZHANG; WANG, 2019).

3.5.7 Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre a produção de ânions superóxidos

Para realização dos ensaios moleculares, foi utilizada uma média de 5 animais por grupo. Imediatamente após a eutanásia dos animais, as artérias mesentéricas superiores foram retiradas sob solução gelada de Tyrode. As artérias foram isoladas, seccionadas, embebidas em Tissue Tek Compound (OCT) e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e guardadas à uma temperatura de -80°C para posteriores análises. Em seguida, foram cortadas (espessura = $7\text{ }\mu\text{m}$) em micrótomo a temperatura de 20°C (Cryostat Leica, Nussloc, Alemanha), e acondicionadas em lâminas apropriadas. As lâminas com os segmentos de artéria mesentérica foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) e, em seguida, acondicionadas com uma sonda fluorescente para detecção de espécies reativas de oxigênio, o DHE ($10\text{ }\mu\text{M}$), nos diferentes grupos utilizando microscopia de fluorescência (NIKON Eclipse Ti- E, NIKON, Japão).

3.6 Análise dos dados

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m). Para a análise estatística das curvas concentração-resposta foram utilizados os valores de $E_{máx}$ ou pD_2 , que foram calculados a partir da regressão não linear das respostas obtidas.

Foram utilizados os testes *t* de *Student* (não pareado) e análise de variância “*one-way*” ANOVA com o pós-teste de Bonferroni e foram considerados estatisticamente significativos os valores de $P < 0,05$. Todas as análises realizadas foram calculadas pelo programa estatístico *Graph Pad Prism* versão 7.0®.

Os resultados e discussão deste estudo encontram-se no capítulo posterior.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados e discussão sobre os dados obtidos da pesquisa

4.1.1 Avaliação dos efeitos cardioprotetores do carvacrol em modelo de envelhecimento animal induzido por D-galactose

O principal achado deste estudo foi que o tratamento por oito semanas com o carvacrol foi capaz de prevenir o estresse oxidativo e de atenuar o aumento de pressão arterial envolvidos no modelo de envelhecimento estudado. O primeiro ponto importante considerado na concepção deste trabalho foi em relação à abordagem metodológica mais apropriada para estudar o efeito induzido pela substância em modelo “não-clínico” de envelhecimento. Geralmente, os modelos de envelhecimento podem ser classificados em duas categorias: modelo de envelhecimento natural e modelo de envelhecimento acelerado.

O modelo de envelhecimento natural consome tempo e acarreta um grande gasto; portanto, modelos de envelhecimento acelerado são preferíveis devido à sua fácil aplicação, menor duração do estudo e maior taxa de sobrevivência dos animais ao longo do período experimental. Existem vários tipos de modelos de envelhecimento acelerado, que incluem tratamento com hidroxauréia e induzido por D-galactose para estudos *in vitro* e induzidos por radiação, camundongos Klotho, com timo removido e induzido por D-galactose para estudos *in vivo*. Entre esses modelos de envelhecimento, o induzido por D-galactose é um dos preferidos pelos pesquisadores devido à sua conveniência, menos efeitos colaterais e maior taxa de sobrevivência ao longo do período experimental (CEBE *et al.* 2014; YANAR *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo induzido por D-Galactose em modelos animais mimetiza o envelhecimento natural e tem sido amplamente utilizado em estudos farmacológicos anti-envelhecimento (CHANG *et al.*, 2017). Além disso, o envelhecimento acelerado promovido por D-galactose é um modelo interessante, capaz de induzir aumento da senescência, disfunção endotelial, apoptose cardíaca e inflamação. Diante disso, o modelo D-galactose é um modelo útil para se estudar o envelhecimento a nível cardiovascular devido às suas habilidades de imitar as características de senescência do envelhecimento natural (AZMAN; ZAKARIA, 2019).

O processo de envelhecimento é caracterizado pelo declínio gradual das funções celulares, moleculares e teciduais, associado com um declínio progressivo na estrutura e função cardiovascular. Com a idade, o coração e os vasculares apresentam desequilíbrio gradual da homeostase, bem como alterações importantes nas suas morfologias, levando a adaptações do tecido (HUMPHREY; MILEWICZ, 2017).

4.1.2 Avaliação da resposta contrátil em anéis de artéria mesentérica superior

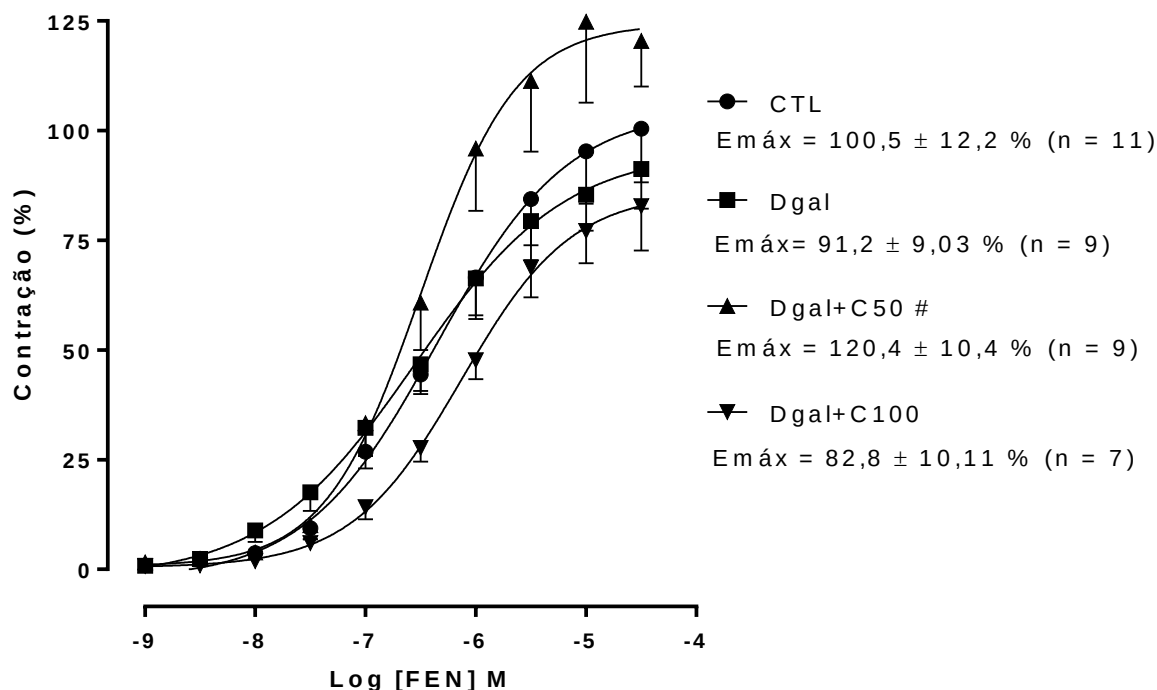


Gráfico 1 - Curvas de concentração-resposta para FEN (10^{-9} – 3×10^{-4} M), em seções de artéria mesentérica superior isoladas de ratos dos diferentes grupos experimentais, após oito semanas de tratamento.

Grupos: CTL (controle, n=11); Dgal (Grupo D-galactose, n=9); Dgal+C50 (ratos envelhecidos por D-galactose tratados com 50mg/Kg de carvedilol, n=9); Dgal+C100 (ratos envelhecidos por D-galactose tratados com 100mg/Kg de carvedilol, n=7). Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one-way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. #P< 0,05 vs Dgal.

Fonte: Autoria própria, 2021.

A estimulação dos receptores α -adrenérgicos produz vasoconstrição de artérias de grande e pequeno calibre, gerando resistência periférica e resultando na função vascular prejudicada. Sendo assim, foi avaliada a resposta contrátil da artéria mesentérica superior através de curvas cumulativas à FEN, um agonista seletivo de receptores adrenérgicos α_1 (LIM, CHESS-WILLIAMS, SELLERS, 2020; SILVA; ZANESCO, 2010).

De acordo com o gráfico 1, a adição crescente e cumulativa de FEN promoveu contração dependente de concentração em artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos em todos os grupos experimentais. Os animais do grupo Dgal (Emáx = 91,2 ± 9,03 %; n = 9) não apresentaram aumento significativo da resposta contrátil mediada por FEN, quando comparado

ao grupo CTL. Já nos animais do grupo Dgal+C50, houve um aumento significativo da resposta contrátil induzida por FEN ($E_{\text{máx}} = 120,4 \pm 10,4 \%$; $n = 9$) quando comparados ao grupo Dgal ($E_{\text{máx}} = 91,2 \pm 9,03 \%$; $n = 9$; $p < 0,05$).

O tratamento com carvacrol, na dose de 100mg/kg, por oito semanas (grupo Dgal+C100) ($E_{\text{máx}} = 82,8 \pm 10,11 \%$; $n = 7$), não foi capaz de alterar significativamente a resposta contrátil induzida por FEN quando comparados ao grupo Dgal ($E_{\text{máx}} = 91,2 \pm 9,03 \%$; $n = 9$) ($p > 0,05$).

Após oito semanas, o grupo tratado com Dgal não apresentou aumento significativo da resposta contrátil por FEN quando comparado ao grupo CTL, sugerindo que o modelo de envelhecimento acelerado induzido por D-galactose não desenvolve hipercontratibilidade da artéria mesentérica de rato. Este resultado corrobora com o estudo de Guevara-Balcazar *et al* (2017), que também demonstraram que não existiram diferenças qualitativas no efeito contrátil induzido pela fenilefrina ao comparar os segmentos torácico e abdominal em nenhum dos grupos de ratos pré-púbere, jovem e idoso, sendo o efeito máximo semelhante entre os dois segmentos.

Resultados contrários foram achados no grupo de animais tratados com carvacrol na dose de 50 mg/kg, pois demonstraram que houve um aumento significativo na resposta contrátil à FEN, quando comparado ao grupo Dgal. No entanto, visto que foi um efeito isolado específico para a dose, estudos adicionais são necessários para se avaliar o efeito contrátil induzido por FEN em ratos tratados com carvacrol na dose de 50mg/kg.

4.1.3 Avaliação da resposta relaxante em anéis de artéria mesentérica superior

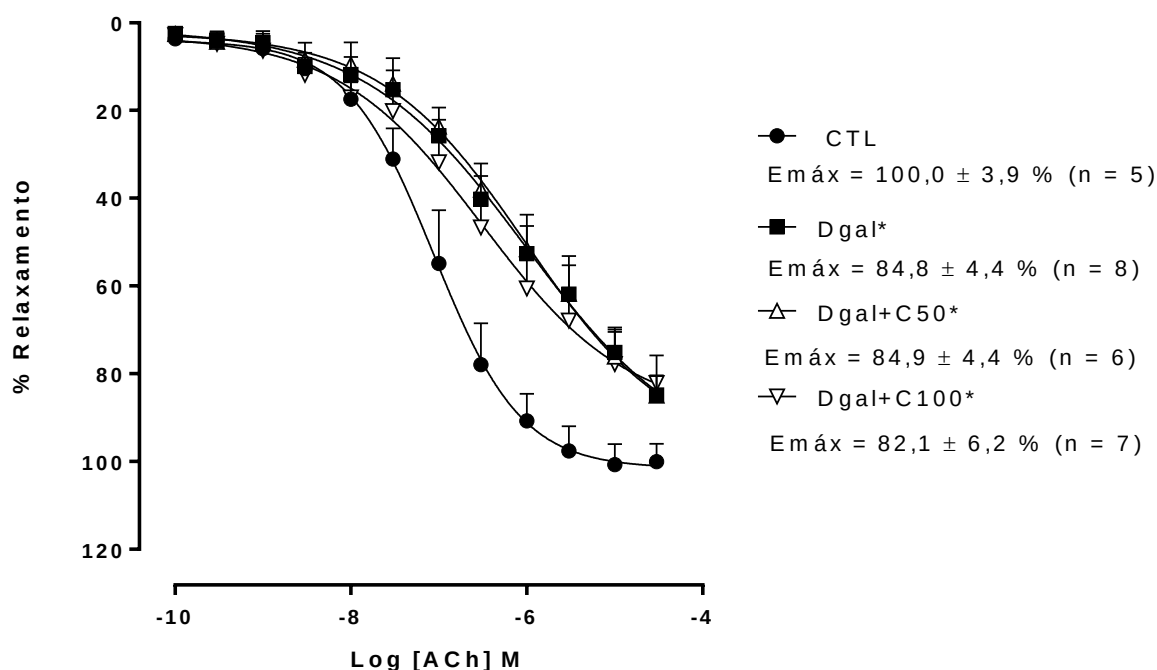


Gráfico 2 - Curvas de concentração-resposta para ACh (10^{-10} – 3×10^{-4} M), em seções de artéria mesentérica superior isoladas de ratos, pré-contraídas com FEN, dos diferentes grupos experimentais, após tratamento por oito semanas.

Grupos: CTL (controle, n=5); Dgal (Grupo D-galactose, n=8); Dgal+C50 (ratos envelhecidos por D-galactose tratados com 50mg/Kg de carvedilol, n=6); Dgal+C100 (ratos envelhecidos por D-galactose tratados com 100mg/Kg de carvedilol, n=7). Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs CTL.

Fonte: Autoria própria, 2021.

Com relação à estrutura e funcionalidade a nível vascular, o endotélio é uma monocamada altamente ativa que desempenha papéis importantes na modulação do tônus vascular, tromboresistência, adesão celular, proliferação de células musculares lisas, entre outras funções, através da produção e liberação de várias moléculas vasoprotetoras, tais como o NO. Este, junto a demais moléculas, tem um importante papel na função vascular, por agir diretamente no equilíbrio do suprimento de oxigênio aos tecidos, na remodelação das estruturas vasculares, e por atuar na regulação do tônus e diâmetro do vaso (SENONER; DICHTL, 2019; FAVERO *et al.*, 2014). Sendo assim, no presente estudo, avaliou-se a resposta relaxante mediada pelo NO, pela atuação da ACh, a nível de endotélio vascular.

O gráfico 2 mostra o percentual de relaxamento nos diferentes grupos experimentais, em função de concentrações crescentes de ACh. Observou-se que o grupo Dgal ($E_{máx} = 84,8$

$\pm 4,4\%$; $n=8$) apresentou diminuição significativa do percentual de relaxamento induzida por ACh, quando comparado ao grupo controle (CTL) ($E_{\text{máx}} = 100,0 \pm 3,9\%$; $n=5$). Além disso, foi possível observar que o tratamento com carvacrol nos grupos Dgal+C50 ($E_{\text{máx}} = 84,9 \pm 4,4\%$; $n=6$) e Dgal + C100 ($E_{\text{máx}} = 82,1 \pm 6,2\%$; $n=7$) não foi capaz de reverter a disfunção endotelial presente no animal Dgal. Tais resultados indicam que o carvacrol não interfere sobre a disfunção endotelial presente no modelo de envelhecimento acelerado.

Nestes experimentos, em preparações de artéria mesentérica superior isolada de ratos, verificou-se que o grupo Dgal diminuiu significativamente o percentual de relaxamento induzido pela ACh, quando comparado ao grupo CTL. Diante disso, sugere-se que o grupo submetido ao modelo de envelhecimento induzido por D-galactose apresentou disfunção endotelial. Esta pode ocorrer pelo aumento da geração de ânions superóxidos e consequente diminuição da biodisponibilidade do NO, comprometendo, assim, a vasodilatação dependente de ACh no vaso (RIZZONI *et al.*, 2019; DE; GHOSH, 2017). Nossos resultados corroboram os obtidos por Dai *et al.* (2018), que mostram um comprometimento do relaxamento induzido por ACh em aortas de ratos envelhecidos por D-galactose (na dose de 150mg/kg), apresentando, portanto, disfunção endotelial. Todavia, o tratamento com carvacrol, nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg, não foi capaz de reverter a disfunção endotelial promovida pelo tratamento com D-galactose.

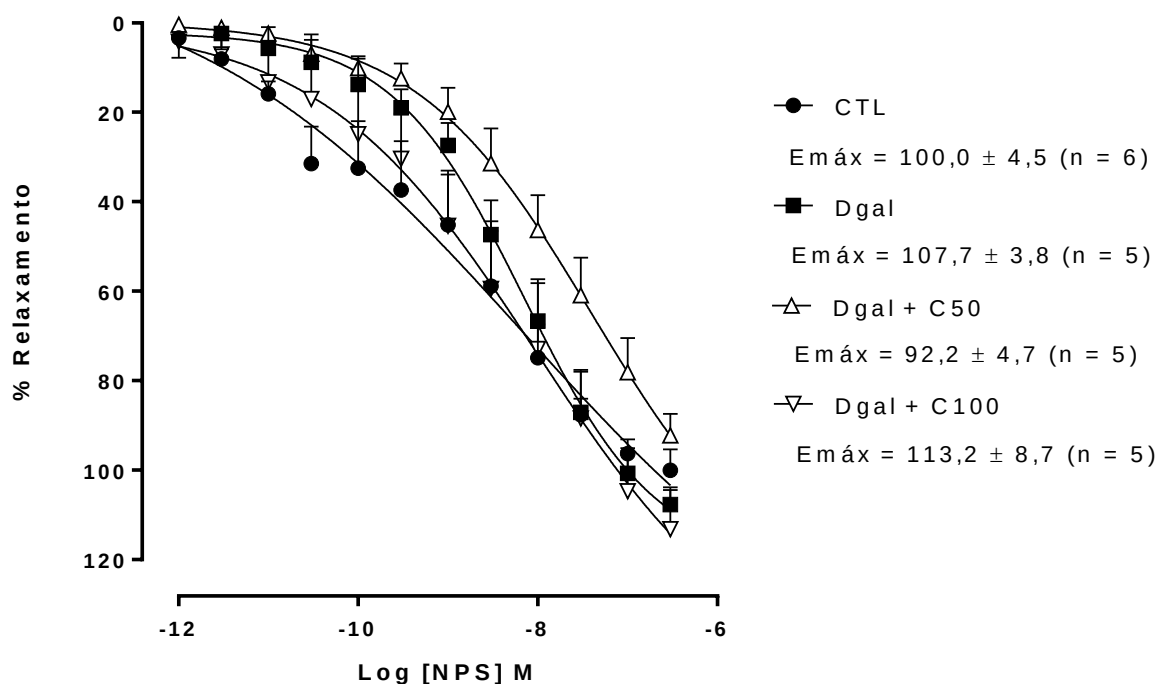


Gráfico 3 - Curvas de concentração-resposta para NPS (10^{-12} – 3×10^{-6} M), secções de artéria mesentérica superior de ratos, pré-contraídas com FEN, dos diferentes grupos experimentais, durante tratamento por oito semanas.

Grupos: CTL (controle, n=6); Dgal (Grupo D-galactose, n=5); Dgal+C50 (ratos envelhecidos por D-galactose tratados com 50mg/Kg de carvacrol, n=5); Dgal+C100 (ratos envelhecidos por D-galactose tratados com 100mg/Kg de carvacrol, n=5). Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguida de pós-teste de Bonferroni. $P > 0,05$.

Fonte: Autoria própria, 2021.

Além da avaliação do relaxamento dependente de endotélio, é importante investigar se há algum comprometimento em vias envolvidas diretamente no relaxamento do vaso. Para isso, utilizamos o composto inorgânico NPS, um doador de NO em sistemas biológicos através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (SILVA *et al.*, 2016).

O gráfico 3 mostra o percentual de relaxamento a nível muscular, nos diferentes grupos experimentais, em função de concentrações crescentes de NPS. De acordo com os valores acima, é possível observar que a resposta relaxante mediada por NPS foi similar nos quatro grupos. Os animais do grupo Dgal não apresentaram nenhuma alteração significativa no efeito máximo induzido por NPS ($Emáx = 107,7 \pm 3,8 \%$; n=5) quando comparados ao grupo CTL ($Emáx = 100,0 \pm 4,5 \%$; n=6) (Gráfico 1).

Os diferentes tratamentos de oito semanas dos animais dos grupos Dgal+C50 ($Emáx = 92,2 \pm 4,7 \%$; n=5) e Dgal+C100 ($Emáx = 113,2 \pm 8,7 \%$; n=5) não promoveram alterações significativas na resposta relaxante mediada por NPS quando comparadas ao grupo Dgal ($Emáx = 107,7 \pm 3,8 \%$; n=5).

= $107,7 \pm 3,8$ %; n=5). Estes resultados indicam que o modelo de envelhecimento acelerado não cursa com alterações da via do óxido nítrico no músculo liso vascular.

O relaxamento produzido pelo NPS em anéis de artéria mesentérica superior não foi alterado e não apresentou diferenças estatísticas em nenhum dos grupos tratados quando comparado ao grupo CTL e Dgal. Estes resultados sugerem que a função muscular lisa vascular não foi alterada nos quatro grupos analisados.

4.1.4 Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre a produção de ânions superóxidos

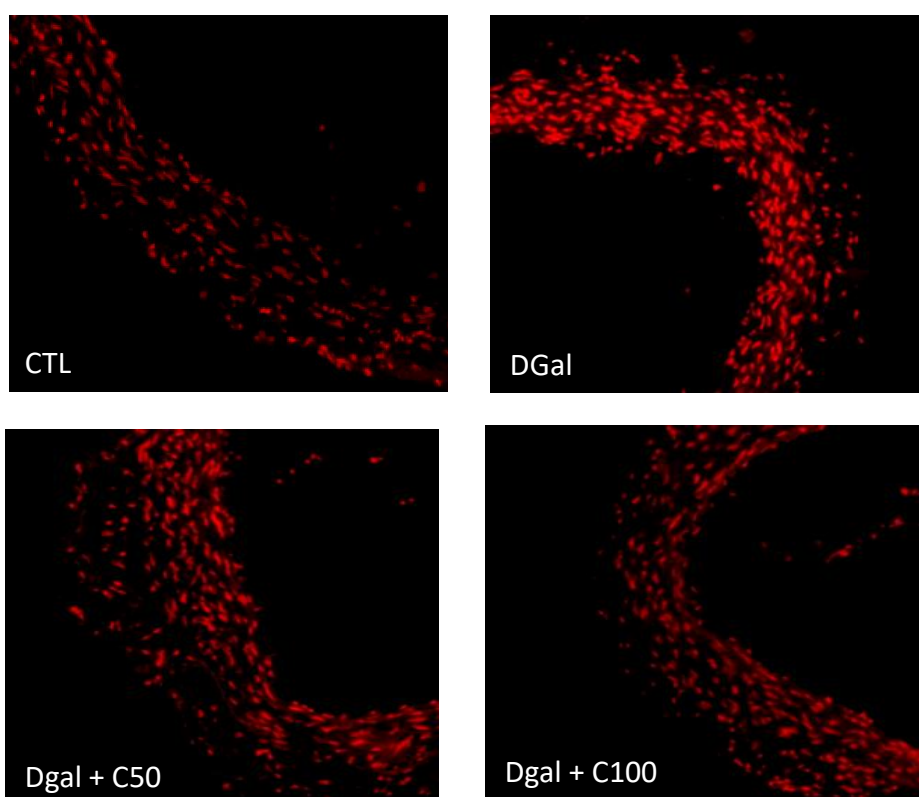


Figura 3 - Imagens da intensidade de fluorescência basal emitida pela sonda DHE em cortes histológicos de artéria mesentérica superior isolada de rato dos diferentes grupos experimentais tratados com D-galactose e carvacrol por oito semanas (objetiva 10 X).

CTL (controle, n=5); Dgal (Grupo D-galactose, n=5); Dgal+C50 (ratos envelhecidos por D-galactose e tratados com 50mg/Kg de carvacrol, n=5); Dgal+C100 (ratos envelhecidos por D-galactose e tratados com 100mg/Kg de carvacrol, n=5).

Fonte: Autoria própria, 2021.

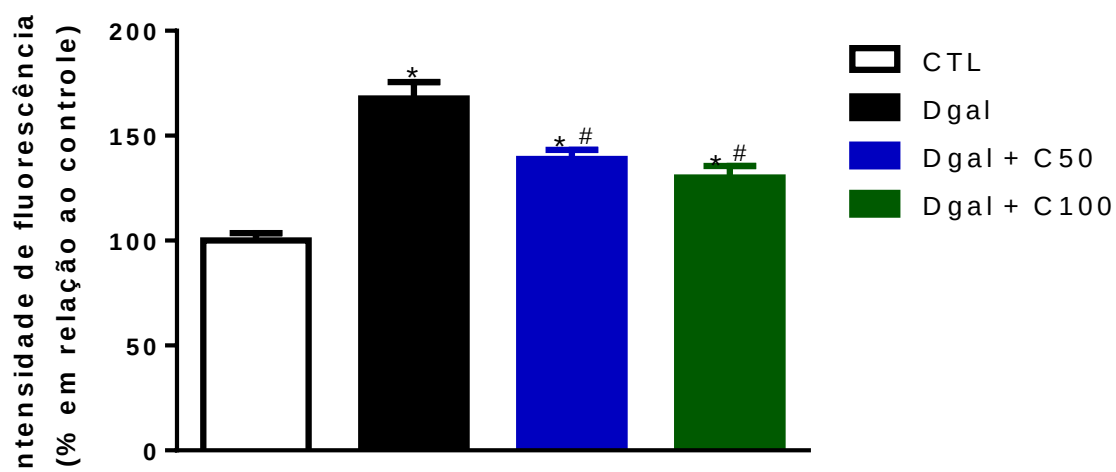


Gráfico 4 - Intensidade relativa de fluorescência basal (%) de DHE em cortes histológicos de artéria mesentérica superior isolada de rato dos diferentes grupos tratados por oito semanas. Grupos: CTL (controle normotenso, n=5); Dgal (Grupo D-galactose, n=5); Dgal+C50 (ratos envelhecidos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, n=5); Dgal+C100 (ratos envelhecidos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, n=5). Os dados estão expressos em valores médios de porcentagem de intensidade de fluorescência em relação ao controle $\pm$ e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguida do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs CTL, # $p < 0,05$ vs Dgal. Fonte: Autoria própria, 2021.

Várias teorias têm sido criadas para explicar como o processo de envelhecimento ocorre e quais são os fatores envolvidos nesse processo. No entanto, o ponto em comum presente em todas as teorias é o papel das espécies reativas de oxigênio e do fenômeno do estresse oxidativo na promoção de doenças associadas ao envelhecimento. Além disso, vários estudos demonstraram que o estresse oxidativo contribui para disfunção endotelial presente nessas doenças (DE; GHOSH, 2017). Diante disso, avaliou-se a produção de ânions superóxidos através da intensidade de fluorescência emitida por uma sonda DHE.

A sonda DHE emitiu fluorescência em cortes de artérias mesentéricas superiores isoladas de todos os animais dos grupos tratados por oito semanas. Os animais do grupo Dgal apresentaram um aumento significativo da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE ($167,75 \pm 7,91$ %, n=5) quando comparados ao grupo CTL ($100,00 \pm 3,61$ %, n=5; $p < 0,05$) (Gráfico 1). O tratamento com carvacrol dos animais dos grupos Dgal+C50 e Dgal+C100 por oito semanas resultou em redução significativa da intensidade de fluorescência emitida pela sonda DHE ($138,84 \pm 4,46$ %, n=5; $130,01 \pm 5,50$ %, n=5, $p < 0,05$, respectivamente), quando comparado ao grupo Dgal e ao grupo CTL (Gráfico 1).

Os resultados do presente estudo mostram que os animais do grupo Dgal apresentaram um aumento significativo da intensidade de fluorescência pela sonda DHE quando comparado ao grupo CTL, podendo sugerir que houve um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio em artéria mesentérica superior desses animais. Resultado semelhante foi encontrado nos estudos de Xu *et al.* (2019a), Dehghani *et al.* (2018), Wu *et al.* (2017) e Chang *et al.* (2017), que utilizaram o modelo de envelhecimento acelerado por D-galactose, o qual promoveu aumento na intensidade de fluorescência por DHE pelo aumento da geração de ROS e estresse oxidativo nos tecidos cardiovasculares de animais, além de diminuir a capacidade antioxidante do organismo.

O tratamento com carvacrol em diferentes doses (50 e 100 mg/kg), porém, foi capaz de promover diminuição dos níveis de ânions superóxidos quando comparado ao grupo tratado por Dgal, alcançando níveis semelhantes ao do grupo CTL. Este efeito, tal qual como aconteceu para os efeitos sobre a pressão arterial sistólica, não parece ser dependente da dose, ou seja, com a dose de 50 mg/kg/dia, o efeito máximo já pode ser observado.

Estudos adicionais com doses menores do que 50 mg/kg/dia são necessários para que seja investigado se o efeito obedece a “lei do tudo ou nada” ou se existe dependência de dose. No entanto, os resultados demonstram que o tratamento com carvacrol exerceu um efeito protetor contra o estresse oxidativo (em nível de artéria mesentérica). Estes achados são semelhantes aos encontrados no estudo realizado por Lee *et al.* (2020), que mostrou que os extratos advindos das Antocianinas (compostos vegetais presentes na amora) atenuaram a formação de ROS induzida por D-galactose em células endoteliais humanas.

Outro resultado semelhante foi o encontrado na pesquisa de Rusu *et al.* (2020), que avaliou a atividade antioxidante do caroço e seito de noz, sendo possível observar que os compostos testados promoveram melhora significativa na atividade antioxidante celular por exercer um efeito protetor contra a geração de ROS presente no modelo Dgal.

4.1.5 Efeito do Carvacrol sobre a Pressão Arterial Sistólica

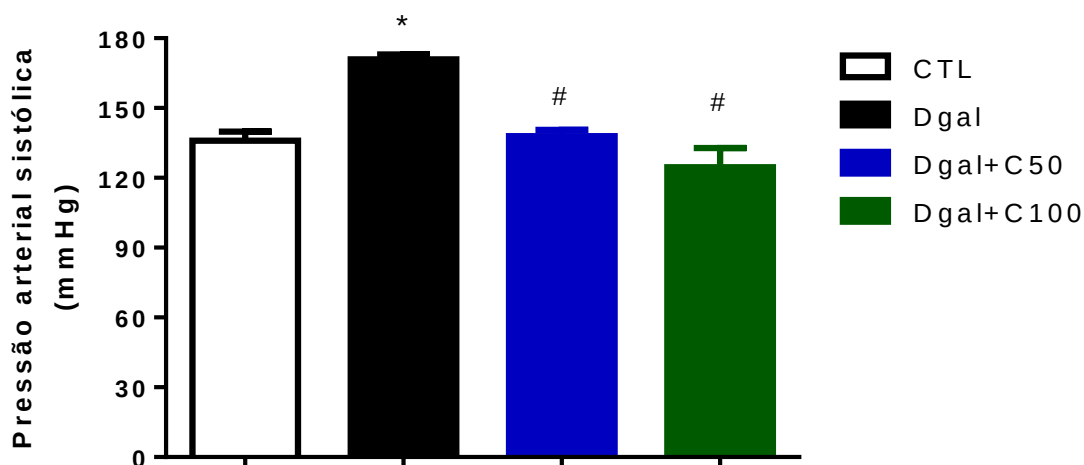


Gráfico 5 - Medida da Pressão Arterial Sistólica (PAS, em mmHg) dos diferentes grupos experimentais, durante tratamento por oito semanas.

Grupos: CTL (controle, n= 6); Dgal (Grupo D-galactose, n=9); Dgal+C50 (ratos envelhecidos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, n=5); Dgal+C100 (ratos envelhecidos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, n=5). Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguida do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs CTL; # $p < 0,05$ vs Dgal.

Fonte: Autoria própria, 2021.

Várias evidências demonstram que o estresse oxidativo pode ser um importante fator envolvido na fisiopatologia da hipertensão. A doença torna-se mais prevalente com o avançar da idade, com mais de 60% das pessoas maiores de 60 anos apresentando essa patologia (WILLIAMS *et al.*, 2018). Diante disso, avaliamos os valores de pressão arterial sistólica nos quatro grupos de animais estudados.

O gráfico 5 mostra os valores de medida de pressão arterial sistólica (mmHg) por Tail Cuff nos quatro grupos tratados por oito semanas. Pode-se observar um aumento significativo da pressão arterial sistólica no grupo Dgal ($170,99 \pm 2,0$ %; n=9) quando comparado ao grupo CTL ($135,95 \pm 3,86$ %; n=6; $p < 0,005$). Os grupos Dgal+C50 e Dgal+C100 ($137,88 \pm 2,75$ %; n=5; $124,58 \pm 8,19$ %; n=5, respectivamente) apresentaram diminuição significativa na PAS quando comparados ao grupo Dgal ($170,99 \pm 2,0$ %; n=9) ($p < 0,05$).

Nestes experimentos, foi possível observar que os animais do grupo Dgal apresentaram hipertensão, através do aumento significativo da PAS, quando comparado ao grupo CTL. Estes resultados foram semelhantes aos encontrados no estudo de Dai *et al.* (2018) e de Dehghani *et*

al. (2018), em que ambos demonstraram que a exposição crônica ao envelhecimento acelerado induzido por D-galactose resultou em aumento da pressão arterial em ratos.

Porém, os animais tratados com carvacrol na dose de 50 mg/kg e 100 mg/kg apresentaram diminuição significativa da pressão arterial sistólica. Resultados semelhantes foram observados nos estudos realizados por Dai *et al.* (2018), em que o tratamento com a substância antioxidante SO₂ atenuou o aumento da pressão arterial induzida pelo modelo Dgal, e por Dehghani *et al.* (2018), que demonstrou que a coadministração de Resveratrol + Vitamina D foram capazes de prevenir a hipertensão presente no modelo D-galactose.

A diminuição de PAS em resposta ao tratamento com carvacrol neste modelo de envelhecimento acelerado pode estar relacionada à sua propriedade antioxidante. Estudos adicionais são necessários para que mecanismos hipotensores adicionais possam ser investigados no modelo Dgal em função do tratamento crônico com o monoterpreno.

4.1.6 Avaliação dos efeitos do carvacrol sobre a hipertrofia cardíaca

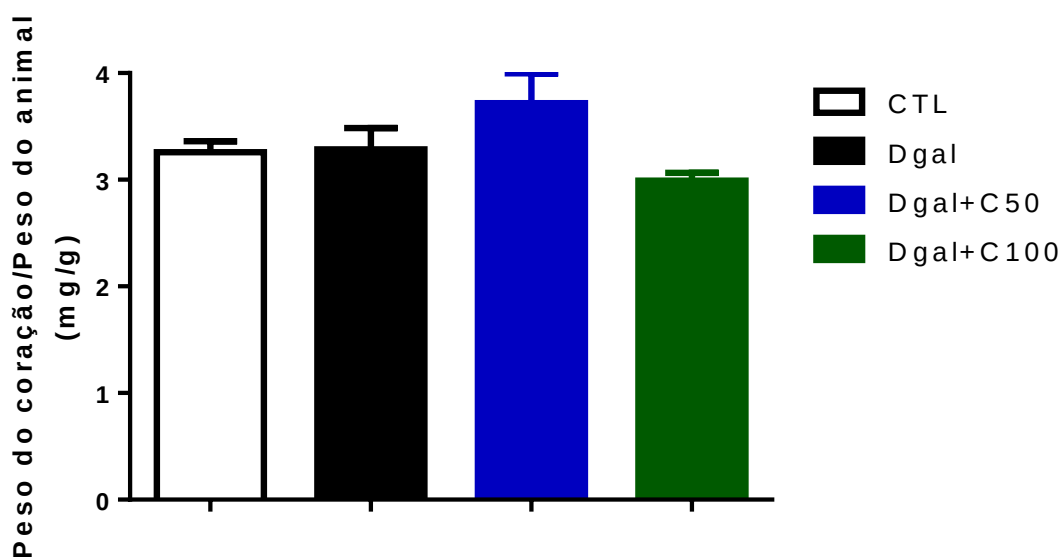


Gráfico 6 - Relação peso do coração pelo peso do animal dos diferentes grupos experimentais, durante tratamento por oito semanas.

Grupos: CTL (controle, n=6); Dgal (Grupo D-galactose, n=9); Dgal+C50 (ratos envelhecidos tratados com 50mg/Kg de carvacrol, n=5); Dgal+C100 (ratos envelhecidos tratados com 100mg/Kg de carvacrol, n=5). Os dados foram analisados utilizando o teste estatístico ANOVA *one way*, seguida do pós-teste de Bonferroni. $P > 0,05$.

Fonte: Autoria própria, 2021.

Estudos indicam que a hipertrofia cardíaca é uma característica importante associada ao processo de envelhecimento a nível cardiovascular (LOFFREDO *et al.*, 2013). No presente estudo, buscamos investigar se o modelo de envelhecimento induzido por D-galactose estaria associado à hipertrofia cardíaca, a qual foi avaliada através da razão do peso do coração pelo peso dos animais dos quatro grupos experimentais. No gráfico 6, pode-se observar que não houve diferença estatística em nenhum dos grupos do estudo.

Nossos resultados divergem do estudo recente conduzido por Chang *et al.* (2017) que, avaliando a partir de outra metodologia, ou seja, a razão do peso do ventrículo esquerdo pelo peso do coração, encontrou que o modelo de envelhecimento acelerado induzido por D-galactose (150 mg/kg/dia) cursava com uma hipertrofia cardíaca. Além do estresse oxidativo, é conhecido na literatura que injeções intraperitoneais de 150 mg/kg/dia de D-galactose por 8 semanas causam um grave desarranjo na arquitetura cardíaca (CHEN *et al.* 2018).

Os cardiomiócitos dos animais tratados com D-galactose foram desordenados, apresentando grandes espaços intersticiais entre as células e maior número de cardiomiócitos apoptóticos em comparação com o grupo controle (CHEN *et al.*, 2018). Dessa forma, emerge a necessidade de se avaliar esse parâmetro por meio de outros métodos experimentais mais específicos, a exemplo da avaliação da histologia a nível de músculo cardíaco ou de outros critérios morfológicos.

Em conjunto, os resultados do presente estudo indicam que o tratamento com o carvacrol diminui significativamente a geração de ROS em nível de artéria mesentérica de ratos envelhecidos através de administração de D-galactose.

Os resultados de um estudo de fase I em relação aos efeitos do carvacrol em indivíduos saudáveis mostraram segurança clínica e tolerabilidade para este agente, sendo, portanto, uma molécula promissora para futuros testes de fase II (GHORANI *et al.*, 2021). Com relação às limitações da presente pesquisa, a pandemia do novo coronavírus atrasou a chegada de alguns insumos/reagentes, bem como de animais, para o andamento do projeto.

4.2 Apresentação do produto

Com o objetivo de se desenvolver tecnologias de intervenção para promoção da saúde e cuidado à pessoa idosa, e após comprovados seus efeitos benéficos frente ao envelhecimento cardiovascular no modelo de envelhecimento estudado, propomos um produto-teste a base do carvacrol, um monoterpene com atividades antioxidantes importantes.

Trata-se de uma emulsão, na qual a formulação-mãe consiste da seguinte composição: óleo de carvacrol, inicialmente solubilizado e emulsificado em cremophor® (na proporção de 0,03%) e diluído em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%), na concentração desejada.

O Cremophor é um agente solubilizante e emulsificante não iônico que é preparado pela reação de óxido de etileno com óleo de rícino. Consiste em um líquido oleoso amarelo claro composto por uma mistura de componentes, principalmente conjugados de polietilenoglicol. Ésteres de ácidos graxos de polietilenoglicol, bem como polietilenoglicóis hidrofílicos e glicerol etoxilado também estão presentes. Essa formulação deverá servir como base para a preparação de futuras formulações farmacêuticas a serem utilizadas em estudos posteriores, inclusive em ensaios clínicos.

O produto seguiu as seguintes etapas:

I – Etapas prévias à formulação do processo no âmbito da UFPB

1. Os resultados de pesquisa tecnológica, e suscetível a serem utilizados na indústria, são apurados pelos criadores quanto à inovação, por meio de busca no Portal da Capes por documentações acadêmicas semelhantes, por meio da ferramenta *Google* (produtos ou soluções tecnológicas semelhantes) e, de mais relevância, pela busca nos Bancos de Dados Nacional (INPI) e Internacionais (ex. Espacenet e Latipat) de Patentes ou de Desenho Industrial (Pedidos de Patentes, Cartas-Patentes ou Pedidos de Registros semelhantes).
2. Um Relatório de Busca de Anterioridade Não Impeditiva é criado pelos autores, e o mesmo é adicionado junto ao processo de solicitação de patente.
3. É elaborado um Estudo de Viabilidade Técnica e Econômica (EVTE) sucinto da solução tecnológica que deve ser protegida e, futuramente, ser deslocada ou licenciada ou incubada, para empresa(s) que possa(m) torná-la acessível para a sociedade.
4. Para os Pedidos de Patentes, deve-se ter atenção quanto às Instruções Normativas DIRPA nº 30/2013 e nº 31/2013, indicando oficialmente, através de documentação padrão, que não houve necessidade de acesso ao patrimônio genético no processo de criação pretendido.

II – Etapas do processo no âmbito da UFPB

5. Os requisitos para proteção de patente deverão seguir para a Diretoria de Propriedade Intelectual da Agência UFPB de Inovação Tecnológica-INOVA/UFPB (11.00.46.19) e deverá ser aberto um processo virtual e cadastrá-lo via SIPAC.
6. O processo para patente deve conter a requisição deliberada de depósito da proteção tecnológica.

7. Após o recebimento do processo, a Diretoria de Propriedade Intelectual (DPI) da INOVA/UFPB deverá analisá-lo quanto aos requisitos relacionados à atividade inventiva, forma, quanto à novidade, utilidade na indústria e suficiência descritiva.

8. Caso seja aprovado, a INOVA/UFPB fará o processo de correção, ajuste e finalização do pedido de proteção junto ao INPI. Se for reprovado, o processo retornará à origem e a DPI-INOVA/UFPB deverá encaminhar um parecer explicativo.

III – Etapas do processo no âmbito externo da UFPB, junto ao INPI

9. O pedido de patente é então formalmente depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial-INPI.

10. Depois de permanecer em sigilo por 18 meses, o pedido é publicado e o exame será solicitado. Para isso, teremos até 36 meses, contados a partir da data do depósito.

11. Concedido o pedido, o INPI oferece um prazo de até 60 dias para que as taxas sejam pagas pela UFPB.

12. Por fim, será solicitada a expedição da carta-patente.

(Manual do Inventor – INOVA UFPB)

A seguir, são apresentadas as considerações finais desta pesquisa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de envelhecimento tem sido nos últimos anos, tema de vários estudos, principalmente no âmbito da prevenção e dos fatores relacionados ao tema, sejam eles, intrínsecos ou extrínsecos. A busca por substâncias ativas e a elucidação científica dos efeitos benéficos das mesmas, tem sido de grande relevância na saúde pública e do mercado consumidor em geral.

A área de investigação objeto deste estudo adequa-se a uma necessidade crescente em termos de saúde pública, atendendo à grande demanda de produtos que possam ser úteis no manejo do processo de senescência e consequente envelhecimento, apresentando um forte potencial de uso terapêutico.

O estudo objetivou avaliar os possíveis efeitos de um composto natural (o monoterpene carvacrol) no combate ao envelhecimento cardiovascular, através de uma pesquisa pré-clínica, frente à necessidade de se explorar novas tecnologias em saúde no cuidado a pessoa idosa acometida com doenças cardiovasculares.

Inicialmente, por meio da pesquisa por nós realizada, demonstramos que após oito semanas de tratamento com D-galactose na dose de 250mg/kg, efeitos significativos em nível de sistema cardiovascular, tais como o aumento do estresse oxidativo, disfunção endotelial (em artéria mesentérica superior de ratos) e hipertensão arterial em ratos *Wistar* confirmaram a eficácia do modelo escolhido para induzir os efeitos do envelhecimento.

O tratamento por oito semanas com Carvacrol, produto-teste deste trabalho, nas doses de 50mg/kg e 100mg/kg, foi capaz de diminuir a produção de ânions superóxidos nos animais envelhecidos através da injeção de D-galactose. Dessa forma, ficou clara a sua capacidade de prevenir o aparecimento do processo de estresse oxidativo, grande responsável pelo desenvolvimento de doenças cardiovasculares no envelhecimento, além de promover diminuição dos valores da pressão arterial sistólica desses animais, em modelo de envelhecimento induzido por D-galactose.

Em conjunto, estes resultados corroboram com a criação de um produto-teste, caracterizado como sendo uma emulsão à base de carvacrol, que contém propriedades cardioprotetoras em estudo pré-clínico frente ao modelo de envelhecimento induzido por D-galactose.

O produto à base de carvacrol poderá servir de base para mais estudos, principalmente aqueles relacionados às pesquisas clínicas de desenvolvimento de um medicamento, podendo

ser possível, futuramente, a realização de testes diretamente em idosos com doenças cardiovasculares.

Posteriormente, pode ser utilizado para o desenvolvimento de um possível medicamento a ser incluído nas políticas públicas de saúde visando o cuidado para as pessoas idosas que possuam esses tipos de enfermidades, contribuindo para diminuição da mortalidade relacionada a essas doenças nessa camada da população, além da diminuição dos custos em saúde que elas geram.

Ainda como perspectiva, deverá ser equacionado um desenvolvimento previsional a este estudo, passando pelo envolvimento de empresas (públicas e/ou privadas), e que poderá ser uma excelente forma de promover a pesquisa aplicada, visando, essencialmente, a inovação de produto, visto que se trata de possibilidade de alternativas terapêuticas para combater as consequências do envelhecimento.

Ressalta-se a contribuição deste trabalho para a ciência e o público em geral, visto que os estudos ainda são inéditos, e existem limitações na literatura quanto às informações relacionadas a temática, em particular, no campo da Gerontologia.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A. *et al.* A Review on Phytoconstituents and Biological activities of *Cuscuta* species. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 772-795, 2017.
- ALMEIDA, A. J. P. O.; RIBEIRO, T. P. R.; MEDEIROS, I. A. Review Article Aging: Molecular Pathways and Implications on the Cardiovascular System. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, Article ID 7941563, 19 pages, 2017.
- ALTURA, B. M.; ALTURA, B. T. Differential effects of substrate depletion on drug-induced contractions of rabbit aorta. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 219, n. 6, p. 1698-1705, 1970.
- ARAMILLO, I. P. *et al.* Transcriptomic alterations during ageing reflect the shift from cancer to degenerative diseases in the elderly. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2018.
- AZMAN, K. F.; ZAKARIA, R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. **Biogerontology**, v. 20, n. 6, p. 763-782, 2019.
- BAO, Y. *et al.* In vitro and in vivo antioxidant activities of the flowers and leaves from *Paeonia rockii* and identification of their antioxidant constituents by UHPLC-ESI-HRMSn via pre-column DPPH reaction. **Molecules**, v. 23, n. 2, p. 392, 2018.
- BRASIL. **Guia para a condução de estudos pré-clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. ANVISA. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Brasília, 2013.
- CALCINOTTO, A., ALIMONTI, A. Aging tumour cells to cure cancer: “pro-senescence” therapy for cancer. **Swiss medical weekly**, v. 147, n. 0304, 2017.
- CALCINOTTO, A. *et al.* Cellular senescence: aging, cancer, and injury. **Physiological reviews**, v. 99, n. 2, p. 1047-1078, 2019.
- CANNATÁ, A. *et al.* Role of circulating factors in cardiac aging. **Journal of thoracic disease**, v. 9, n. Suppl 1, p. S17, 2017.
- CEBE, T. *et al.* Oxidation scrutiny in persuaded aging and chronological aging at systemic redox homeostasis level. **Exp Gerontol**. Vol 57, p 132–140, 2014.
- CHANG, Y. M. *et al.* Inhibition of cardiac hypertrophy effects in D-galactose-induced senescent hearts by *alpinate oxyphyllae fructus* treatment. **Evid Based Complement Alternat Med**. Vol 2017, p 2624384, 2017.
- CHANG, Y. M. *et al.* Anti-apoptotic and pro-survival effect of *alpinate oxyphyllae fructus* (AOF) in a D-galactose-induced aging heart. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 4, p. 466, 2016.

CHEN, J. *et al.* Involvement of exogenous H₂S in recovery of cardioprotection from ischemic post-conditioning via increase of autophagy in the aged hearts. **International journal of cardiology**, v. 220, p. 681-692, 2016.

CHEN, W-K. *et al.* Exercise training augments Sirt1-sig- naling and attenuates cardiac inflammation in D-galactose induced-aging rats. **Aging**, v. 10, p. 4166, 2018.

CHEN, L-K. Population Aging and Health Care Services: What Governments Should Do. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 92, p. 104296-104296, 2020.

CHUNG, E. Sexuality in ageing male: review of pathophysiology and treatment strategies for various male sexual dysfunctions. **Medical Sciences**, v. 7, n. 10, p. 98, 2019.

COSTA, M. F. *et al.* Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: A systematic review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 141-155, 2019.

DAI, J. *et al.* Sulfur dioxide improves endothelial dysfunction by downregulating the angiotensin II/AT1R pathway in D-galactose-induced aging rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 19, n. 2, p. 1470320318778898, 2018.

DE ANDRADE, T. U. *et al.* Cardiovascular Activity of the Chemical Constituents of Essential Oils. **Molecules**, v. 22, n. 9, 1539, p. 2-18, 2017.

DE, A., GHOSH, C. Basics of aging theories and disease related aging- an overview. **PharmaTutor**, v. 5, n. 2, p. 16-23, 2017.

DEHGHANI, A. *et al.* Resveratrol and 1, 25-dihydroxyvitamin D co-administration protects the heart against D-galactose-induced aging in rats: evaluation of serum and cardiac levels of klotho. **Aging clinical and experimental research**, v. 31, n. 9, p. 1195-1205, 2018.

DONG, Y. *et al.* Reactive oxygen species related noncoding RNAs as regulators of cardiovascular diseases. **International journal of biological sciences**, v. 15, n. 3, p. 680, 2019.

DONNAPEE, S. *et al.* Cuscuta chinensis Lam.: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional herbal medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 157, p. 292-308, 2014.

FACHINI-QUEIROZ, F. C. *et al.* Effects of thymol and carvacrol, constituents of Thymus vulgaris L. essential oil, on the inflammatory response. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

FARÍAS, J. G. *et al.* Antioxidant therapeutic strategies for cardiovascular conditions associated with oxidative stress. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 966, 2017.

FAVERO, G. *et al.* Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: Life style intervention. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

FLATT, T.; PARTRIDGE, L. Horizons in the evolution of aging. **BMC biology**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2018.

FLEMMING, K. The knowledge base for evidence-based nursing: a role for mixed methods research?. **Advances in Nursing Science**, v. 30, n. 1, p. 41-51, 2007.

FRITZ, M., RINALDI, G. Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 58, n. 3, p. 215-221, Nov-Dec 2008. DOI: 10.1016/j.vascn.2008.08.002.

FORRESTER, S. J. *et al.* Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. **Circulation research**, v. 122, n. 6, p. 877-902, 2018.

GHORANI, V. *et al.* Safety and tolerability of carvacrol in healthy subjects: a phase I clinical study. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 2, p. 177-189, 2021

GREGERSEN, I. *et al.* A focus on inflammation as a major risk factor for atherosclerotic cardiovascular diseases. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 14, n. 3, p. 391-403, 2016.

GUDE, N. A. *et al.* Cardiac ageing: extrinsic and intrinsic factors in cellular renewal and senescence. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 9, p. 523-542, 2018.

GUEVARA-BALCAZAR, G. *et al.* Participation of COX-1 and COX-2 in the contractile effect of phenylephrine in prepubescent and old rats. **Korean Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 21, n.4, p 407-413, 2017.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental cell research**, v. 25, n. 3, p. 585-621, 1961.

HERRANZ, N.; GIL, J. Mechanisms and functions of cellular senescence. **The Journal of clinical investigation**, v. 128, n. 4, p. 1238-1246, 2018.

HO, S.-C. *et al.* Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. **Biogerontology**, v. 4, n. 1, p. 15-18, 2003.

BO-HTAY, C. *et al.* Effects of D-galactose-induced ageing on the heart and its potential interventions. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1392-1410, 2018.

HUMPHREY, J. D.; MILEWICZ, D. M. Aging, Smooth Muscle Vitality, and Aortic Integrity. **Circulation Research**; v. 120, n. 12, p. 1849-1851, 9 Jun. 2017. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311075. PMID: 28596165; PMCID: PMC5508728.

INCALZA, M. A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular pharmacology**, v. 100, p. 1-19, 2018.

KONG, S.-Z. *et al.* Anti-Aging Effect of Chitosan Oligosaccharide on d-Galactose-Induced Subacute Aging in Mice. **Marine Drugs**, v. 16, n. 6, p. 181, 2018.

- KRYLATOV, A. V. *et al.* Reactive oxygen species as intracellular signaling molecules in the cardiovascular system. **Current cardiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 290-300, 2018.
- LACERDA, R. A. *et al.* Evidence-based practices published in Brazil: identification and analysis studies about human health prevention. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 46, n. 5, p. 1237-1247, 2012.
- LAINA, A., STELLOS, K., STAMATELOPOULOS, K. Vascular age- ing: underlying mechanisms and clinical implications. **Experimental Gerontology**, v. 109, p. 16-30, 2018.
- LEBARON, T. W. *et al.* A new approach for the prevention and treatment of cardiovascular disorders. Molecular hydrogen significantly reduces the effects of oxidative stress. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2076, 2019.
- LEE, G. H. *et al.* Anthocyanins attenuate endothelial dysfunction through regulation of uncoupling of nitric oxide synthase in aged rats. **Aging cell**, v. 19, n. 12, p. e13279, 2020.
- LI, C. *et al.* Antioxidant effects of Apocynum venetum tea extracts on d-galactose-induced aging model in mice. **Antioxidants**, v. 8, n. 9, p. 381, 2019.
- LI, S. G. *et al.* Effects of ginsenoside Rg1 on the senescence of vascular smooth muscle cells. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 3, 2016.
- LI, X. *et al.* New insight into the mechanisms of ginkgo biloba extract in vascular aging prevention. **Current vascular pharmacology**, v. 18, n. 4, p. 334-345, 2020.
- LIM, I.; CHESS-WILLIAMS, R.; SELLERS, D. A porcine model of ureteral contractile activity: Influences of age, tissue orientation, region, urothelium, COX and NO. **Journal of pharmacological and toxicological methods**, v. 102, p. 106661, 2020.
- LIU, H. *et al.* Astaxanthin attenuates d-galactose-induced brain aging in rats by ameliorating oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and regulating metabolic markers. **Food & function**, v. 11, n. 5, p. 4103-4113, 2020.
- LIU, J. *et al.* Ginkgo biloba extract EGB761 protects against aging-associated diastolic dysfunction in cardiomyocytes of D-galactose-induced aging rat. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012.
- LIU, Q.; QIAO, K.; ZHANG, S. Potential of a small molecule carvacrol in management of vegetable diseases. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1932, 2019.
- LOFFREDO, F. S. *et al.* Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 828-839, 2013.
- MARCHESE, A. *et al.* The natural plant compound carvacrol as an antimicrobial and anti-biofilm agent: mechanisms, synergies and bio-inspired anti-infective materials. **Biofouling**, v. 34, n. 6, p. 630-656, 2018.

- MELUSOVA, M. *et al.* Carvacrol and rosemary essential oil manifest cytotoxic, DNA-protective and pro-apoptotic effect having no effect on DNA repair. **Neoplasma**, v. 61, n. 6, p. 690-699, 2014.
- MESCHIARI, C. A., ERRO, O. K., PAN, H., FINKEL, T. & LINDSEY, M. L. . The impact of aging on cardiac extracellular matrix. **Geroscience**, v. 39, n. 1, p. 7-18, 2017.
- MINCIULLO, P. L. *et al.* Inflammaging and anti- inflammaging: the role of cytokines in extreme longevity. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 64, n. 2, p. 111-126, 2016.
- NAKAMURA DE VASCONCELOS, S. S. *et al.* Carvacrol activity & morphological changes in Mycobacterium tuberculosis. **Future microbiology**, v. 13, n. 8, p. 877-888, 2018.
- OBAS, V.; VASAN, R. S. The aging heart. **Clinical Science**, v. 132, n. 13, p. 1367-1382, 2018.
- PAPACONSTANTINO, J. The role of signaling pathways of inflammation and oxidative stress in development of senescence and aging phenotypes in cardiovascular disease. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1383, 2019.
- PENNDORF, D.; WITTE, O.W.; KRETZ, A. DNA plasticity and damage in amyotrophic lateral sclerosis. **Neural regeneration research**, v. 13, n. 2, p. 173, 2018.
- PIGNATELLI, P. *et al.* Oxidative stress and cardiovascular disease: new insights. **Kardiologia i Pol**, v. 76, n. 4, p. 713-722, 2018.
- REN, J.; ZHANG, Y. Targeting autophagy in aging and aging-related cardiovascular diseases. **Trends in pharmacological sciences**, v. 39, n. 12, p. 1064-1076, 2018.
- RIBEIRO, T. P. *et al.* Cardiovascular effects induced by northeastern Brazilian red wine: role of nitric oxide and redox sensitive pathways. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 82-92, 2016.
- RITCHIE, R. H. *et al.* The opposing roles of NO and oxidative stress in cardiovascular disease. **Pharmacological research**, v. 116, p. 57-69, 2017.
- RIZZONI, D. *et al.* Vascular aging and disease of the small vessels. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention**, v. 26, n. 3, p. 183-189, 2019.
- ROCHA, D. Agência UFPB de Inovação Tecnológica – Manual do Inventor. Disponível em: >> <https://www.ufpb.br/inova/colecoes/manual-do-inventor><<. Último acesso em: 03/04/2022.
- RUSU, M. E. *et al.* Antioxidant Effects of Walnut (*Juglans regia* L.) Kernel and Walnut Septum Extract in a D-Galactose-Induced Aging Model and in Naturally Aged Rats. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 424, 2020.

SAMARGHANDIAN, S. *et al.* Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. **Biochemistry research international**, v. 2016, p. 2645237, 2016.

SANTULLI, G.; IACCARINO, G. Adrenergic signaling in heart failure and cardiovascular aging. **Maturitas**, v. 93, p. 65-72, 2016.

SENONER, T.; DICHTL, W. Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target?. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2090, 2019.

SHARIFI-RAD, M. *et al.* Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675-1687, 2018.

SILVA, A. S., ZANESCO, A. Exercício físico, receptores β -adrenérgicos e resposta vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 9, n. 2, 2010.

SILVA, E. R. *et al.* Pharmacological effects of carvacrol in in Vitro studies: a review. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 29, p. 3454-3465, 2018.

SILVA, F. H. *et al.* Sympathetic Hyperactivity, Increased Tyrosine Hydroxylase and Exaggerated Corpus Cavernosum Relaxations Associated with Oxidative Stress Plays a Major Role in the Penis Dysfunction in Townes Sickle Cell Mouse. **Plos one**, v. 11, n. 12, p. e0166291-e0166291, 2016.

SUN, S. L. *et al.* Anti-apoptosis effect of polysaccharide isolated from the seeds of *Cuscuta chinensis* Lam on cardiomyocytes in aging rats. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 9, p. 6117-6124, 2014.

TOYOKUNI, S. Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 595, p. 46-49, 2016.

VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, v. 3, p. 200-1, 2012.

VENDROV, A. E. *et al.* NOX4 NADPH oxidase-dependent mitochondrial oxidative stress in aging-associated cardiovascular disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 23, n. 18, p. 1389-1409, 2015.

VICENTE, R. *et al.* Cellular senescence impact on immune cell fate and function. **Aging Cell**, v. 15, n. 3, p. 400-406, 2016.

WANG, X., KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinases, vascular remodeling, and vascular disease. **Advances in pharmacology**, v. 81, p. 241-330, 2018.

WANG, Y. *et al.* Active Peptide KF-8 from Rice Bran Attenuates Oxidative Stress in a Mouse Model of Aging Induced by d-Galactose. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 44, p. 12271-12283, 2020.

WILDE, E. *et al.* Tail-cuff technique and its influence on central blood pressure in the mouse. **Journal of the American Heart Association**, v. 6, n. 6, p. e005204, 2017.

WILLIAMS, B. *et al.* ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. **European Heart Journal**, v. 39, p. 3021-3104, 2018. doi: 10.1093/eurheartj/ehy339.

WU, W. *et al.* H₂S donor NaHS changes the production of endogenous H₂S and NO in D-galactose-induced accelerated ageing. *Oxidative Med Cell Longev*. 2017. doi: 10.1155/2017/5707830.

XU, D. *et al.* Anthocyanins from black chokeberry delayed ageing-related degenerative changes in the heart. **Indian J Pharm Educ**, v. 53, p. 112-116, 2019a.

XU, K. *et al.* Aging biomarkers and novel targets for anti-aging interventions. **Reviews on Biomarker Studies in Aging and Anti-Aging Research**, p. 39-56, 2019b.

YANAR, K. *et al.* Protein and DNA oxidation in different anatomic regions of rat brain in a mimetic ageing model. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 109, p 423-433, 2011.

YANG, B.; CHEN, Yu; SHI, J. Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. **Chemical reviews**, v. 119, n. 8, p. 4881-4985, 2019.

ZHANG, L., WANG, Y. M. Expression and function of lncRNA ANRIL in a mouse model of acute myocardial infarction combined with type 2 diabetes mellitus. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 82, n. 9, p. 685-692, Sep. 2019.

ANEXO



Universidade
Federal da
Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do carvacrol sobre o sistema cardiovascular de ratos envelhecidos por D-galactose", protocolada sob o CEUA nº 3183120919 (ID 000787), sob a responsabilidade de **Islandia Gisella Albuquerque Gonçalves e equipe; Sabine Helena Dantas** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 13/09/2019.

We certify that the proposal "Cardiovascular effects induced by carvacrol on d-galactose aged rats", utilizing 80 Heterogenics rats (80 males), protocol number CEUA 3183120919 (ID 000787), under the responsibility of **Islandia Gisella Albuquerque Gonçalves and team; Sabine Helena Dantas** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 09/13/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **07/2019** a **12/2020**

Área: **Ciências Farmacêuticas**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFarM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **7 a 8 semanas**

N: **80**

Linhagem: **Rattus Norvegicus - Wistar**

Peso: **160 a 260 g**

Local do experimento: **Laboratório de Farmacologia Cardiovascular do IPeFarM/UFPB**

João Pessoa, 06 de junho de 2021

Profa. Dra. Jailane de Souza Aquino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Carlos Augusto Alanis Clemente
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba