



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



**EFEITOS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS
LIOFILIZADOS DA CASCA DO FRUTO DE *Spondias
mombin* Linn. E *Spondias tuberosa* Arruda EM MODELO DE
SENESCÊNCIA INDUZIDA POR D-GALACTOSE EM
CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS
ISOLADAS DA ARTÉRIA AORTA DE RATOS**

JAVANYR FREDERICO DE SOUZA JÚNIOR

JOÃO PESSOA

2023

JAVANYR FREDERICO DE SOUZA JÚNIOR

**EFEITOS DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS
LIOFILIZADOS DA CASCA DO FRUTO DE *Spondias*
mombin Linn. E *Spondias tuberosa* Arruda EM MODELO DE
SENESCÊNCIA INDUZIDA POR D-GALACTOSE EM
CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS
ISOLADAS DA ARTÉRIA AORTA DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em produtos naturais e sintéticos bioativos.
Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros

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

João Pessoa

2023



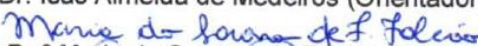
PgPNSB

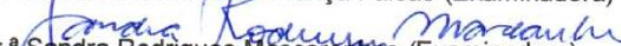
Pós Graduação em Produtos Naturais
e Sintéticos Bioativos

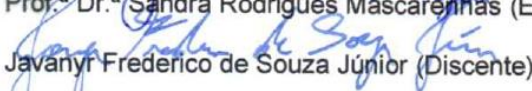
Ata da 480ª (quadringentésima octogésima) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Javanyr Frederico de Souza Júnior**, candidato(a) ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

Às nove horas (09h00) do dia vinte e oito de agosto do ano de dois mil e vinte e três (28/08/2023), no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Javanyr Frederico de Souza Júnior**, candidato(a) ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Maria do Socorro de França Falcão, Ph.D em Farmacologia, Sandra Rodrigues Mascarenhas, Ph.D em Fisiologia, e Isac Almeida de Medeiros, Ph.D em Farmacologia dos Medicamentos Cardiovasculares. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Isac Almeida de Medeiros, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Javanyr Frederico de Souza Júnior**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "Efeitos dos extratos hidroalcoólicos liofilizados da casca do fruto de *Spondias mombin* Linn e *Spondias tuberosa* Arruda em modelo de senescência induzida por D-Galactose em cultura primária de células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Javanyr Frederico de Souza Júnior** legalmente habilitado(a) a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.


Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros (Orientador)


Prof.^a Dr.^a Maria do Socorro de França Falcão (Examinadora)


Prof.^a Dr.^a Sandra Rodrigues Mascarenhas (Examinadora)


Javanyr Frederico de Souza Júnior (Discente)



Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S729e Souza Junior, Javanyr Frederico de.

Efeitos dos extratos hidroalcoólicos liofilizados da casca do fruto de *Spondias mombin* Linn. E *Spondias tuberosa* Arruda em modelo de senescência induzida por D-Galactose em cultura primária de células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos / Javanyr Frederico de Souza Junior. - João Pessoa, 2023.
100 f. : il.

Orientação: Isac Almeida de Medeiros.

Coorientação: Islania Giselia Albuquerque Gonçalves.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais - Atividade antioxidante. 2. Senescência. 3. Célula endotelial. 4. Estresse oxidativo - Disfunção endotelial. 5. D-Galactose. I. Medeiros, Isac Almeida de. II. Gonçalves, Islania Giselia Albuquerque. III. Título.

Dedicatória

***Aos meus pais, Javanyr Souza e Severina Souza,
por toda doação e exemplo e a minha irmã,
Myrella Flávia, por estar presente na minha vida.***

***Dedico também este trabalho à todos os
sonhadores que, de alguma forma, desejam alçar
grandes voos na vida e, ao menos, tentar mudar
o mundo e deixar sua marca nele através da
pesquisa científica; vivam intensamente seus
ideais e que nada vos abale.***

Agradecimentos

AGADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por todas as bênçãos alcançadas, por me dar forças e coragem para lutar pelo que eu acredito, por me permitir viver meus sonhos todos os dias e à Bem-Aventurada Virgem Maria, por me cobrir espiritualmente com seu manto sacratíssimo, principalmente nos dias de noite escura e aridez.

Aos meus pais, Javanyr Souza e Severina Souza e à minha irmã, Myrella Flávia, por sempre estarem ao meu lado, nos momentos felizes e atribulados. Por fazerem de tudo por mim, a fim de que eu sempre tomasse as escolhas certas na minha vida. Sem dúvida alguma sou muito abençoado por ter vocês na minha vida.

À minha família, pela torcida e admiração, por serem meus exemplos de dignidade e luta, por ser o reflexo do amor de Deus na minha casa, pelo incentivo em minhas escolhas, pela compreensão nos momentos que eu precisei estar ausente e seu infinito amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Isac Almeida de Medeiros, pelos ensinamentos acadêmicos, por ter me concedido a oportunidade de compartilhar de seus valiosos conhecimentos; por ser um exemplo de profissional.

À minha ex-professora, Dr^a. Thais Porto Ribeiro, que conheci durante a graduação e que levou ao encontro da pesquisa científica; sem dúvida um exemplo de pessoa e de pesquisadora, que levarei pro resto da vida. Minha gratidão será eterna.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Islania Giselia Albuquerque Gonçalves, por me instruir no método da pesquisa científica e por estar disposta à discussão dos resultados; sem dúvidas me fez um pesquisador melhor.

Ao professor Dr. Bruno Raniere Lins de Albuquerque Meireles na pessoa da professora Dr^a Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro do Laboratório de Combustíveis e Materiais da UFPB (LACOMUFPB) pela parceria firmada e ajuda nos ensaios de cromatografia.

À Dr^a Juliana de Medeiros Gomes na pessoa do professor Dr. Josean Fachine Tavares do Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise da UFPB (LMCAUFPB) pela parceria firmada e ajuda nos ensaios de fenólicos totais.

À minha parceira de laboratório e amiga, Ma. Ana Caroline Meneses Ferreira Veras, pela ajuda nos ensaios de DPPH• e também pelas conversas incentivadoras em momentos pontuais de minha vida acadêmica e pessoal.

À Roberta e seu Assis, por cederem o material para desenvolvimento do estudo, bem como às alunas de iniciação científica, Nayana, Mylenna e Marianna, pela ajuda na obtenção e preparação dos extratos.

À Dr^a. Bárbara Cabral na pessoa da professora Dr^a. Silvana Maria Zucolotto Langassner da do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela parceria no processo de liofilização das amostras.

Ao professor Dr. Yuri Manguiera do Nascimento do PgPNSB/UFPB sempre disposto em ajudar nos esclarecimentos referentes aos estudos fitoquímicos e à nossa queridíssima pós-doutora, Dr^a Fátima Azevedo, pelos momentos vividos no laboratório de farmacologia cardiovascular, pela ajuda no projeto e pelas conversas e incentivos durante esta caminhada.

Ao professor Prof. Dr. Robson Cavalcate Veras, pela disposição em sempre ajudar, pelos conselhos para o aperfeiçoamento da pesquisa e do amadurecimento acadêmico e profissional.

Aos meus amigos de laboratório, Arthur Pontes, Larisse Virgolino e Mathania Rezende por me ajudarem sempre que necessário na construção do saber científico e pelos momentos de descontração em infindáveis experimentos.

À Larisse, minha parceira de mestrado e de laboratório, por estar comigo desde o início, pelas discussões nas disciplinas, pelos conselhos nos momentos de crise existencial e a Arthur por sempre estar disposto a me ajudar nos protocolos e nas dúvidas sem fim sobre técnicas e protocolos; sem dúvidas meus dias no laboratório se tornaram mais leves com vocês. Gratidão eterna.

A todos os integrantes que estão ou passaram pelo laboratório de Farmacologia Cardiovascular: Arthur Pontes, Larisse Virgolino, Fátima Azevedo, Mathania Rezende, Júlio César, Tays Amanda, Alinne Vilar, Ana Caroline Meneses, Viviane Lima, Evyllen Myllena, Adhonias Correia, Hayaly Felinto e Guilherme Marques, Nayana, Mylenna, Marinna, Itamar, Maria Eduarda, Amanda, Kawan, Heraldo, Shara, Natan, Isiara, Thais Trajano, por estarem sempre dispostos à ajudar e tirar dúvidas e pelos momentos de descontração vivenciados dentro e fora do laboratório. Aos colegas da minha turma de mestrado do PgPNSB, pelos momentos compartilhados.

Aos professores do PgPNSB, com os quais tive a oportunidade de aprender, agradeço os conhecimentos compartilhados.

À Caroline Manguiera e Nilmar Nincia, secretárias do programa de PgPNSB, pelo auxílio e por sempre estarem dispostas a nos receber, agradeço pela paciência e dedicação na condução do trabalho.

À Mônica Rodrigues da Silva, pela disponibilidade e dedicação em nos ajudar sempre que necessário, desempenhando sua função de forma excelente, mantendo a limpeza e organização do nosso local de trabalho.

A José Crispim Duarte e à Roberta Nunes Parentoni, pela condução da Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM.

Às professoras Sandra Mascarenhas e Maria do Socorro, por terem aceitado participar da banca examinadora e contribuir com este trabalho. Agradeço também aos professores Robson Veras e Thyago Queiroz, por terem aceitado compor a banca como membros suplentes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

À Universidade Federal da Paraíba, pelo apoio institucional.

A todos que, direta ou indiretamente contribuíram nessa caminhada para a realização deste trabalho como base para conquista desse sonho.

Muito obrigado!

Javanyr Frederico de Souza Júnior

“Lembre-se da sua decisão como uma segunda Raquel: não perca de vista seu ponto de partida, conserve o que você tem, faça o que está fazendo e não o deixe, mas, em rápida corrida, com passo ligeiro e pé seguro, de modo que seus passos nem recolham a poeira, confiante e alegre, avance com cuidado pelo caminho da bem-aventurança. Não confie em ninguém, não consinta com nada que queira afastá-la desse propósito, que seja tropeço no caminho, para não cumprir seus votos ao Altíssimo na perfeição em que o Espírito do Senhor a chamou.”

(2CtIn 11-14)

Resumo

JÚNIOR, J. F. S. **Efeitos dos extratos hidroalcoólicos liofilizados da casca do fruto de *Spondias mombin* Linn e *Spondias tuberosa* Arruda em modelo de senescência induzida por D-Galactose em cultura primária de células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos.** 2023. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). PgPNSB/CCS/UFPB. 2023.

RESUMO

O envelhecimento é um processo natural e de causa multifatorial. Com o avançar da idade, as células entram num estado conhecido como senescência e estas aumentam em número no organismo. No endotélio vascular isso ocorre de igual forma, e um dos reguladores-chave nesse processo é o estresse oxidativo, que acarreta em disfunção endotelial e o surgimento de doenças cardiovasculares relacionadas à idade. Produtos naturais com atividade antioxidante têm demonstrado ação benéfica sobre o sistema cardiovascular. Portanto, a busca por compostos com atividade antioxidante e antisenescente nesse campo devem ser exploradas. A literatura evidencia que árvores frutíferas como *Spondias mombin* Linn (cajazeira) e *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro) possuem boa quantidade de compostos fenólicos de caráter antioxidante. Nenhum estudo foi elaborado para investigação da capacidade antisenescente envolvendo estas plantas. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos dos extratos hidroalcoólicos liofilizados da casca dos frutos de *Spondias mombin* Linn (EHLMS) e *Spondias tuberosa* Arruda (EHLST) em modelo de senescência induzida por D-Galactose em cultura primária de células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos (RAECs). Foram realizados os ensaios de determinação do conteúdo fenólicos totais, atividade sequestradora de radicais DPPH• e identificação e quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência. As RAECs cultivadas foram divididas em dois grupos: Basal (tratado apenas com os extratos EHLMS ou EHLST nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL) e D-Galactose (desafiado com D-gal 20 mg/mL e tratadas com os extratos EHLMS ou EHLST nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL) por 48 horas para avaliação da viabilidade celular, senescência celular e produção de ânions superóxido. O EHLMS e EHLST apresentaram um alto conteúdo de fenólicos totais, capacidade sequestradora de radicais DPPH•, sendo encontrados e quantificados vários compostos fenólicos. No ensaio de viabilidade celular do grupo Basal, o tratamento com EHLMS (1,0 µg/mL) e com EHLST (0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) reduziram viabilidade quando comparados ao controle ($p < 0,05$). No grupo D-Galactose, D-gal reduziu viabilidade celular quando comparado ao controle, o tratamento com EHLMS (0,5 µg/mL) e EHLST (0,5 e 1,0 µg/mL) reduziram a viabilidade quando comparados ao D-gal ($p < 0,05$). No ensaio de SA-β-gal do grupo Basal, nenhum dos extratos foi capaz de alterar a senescência. No grupo D-Galactose, D-gal aumentou o percentual de células senescentes quando comparado ao controle, EHLMS (0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) e EHLST (0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) diminuíram o percentual de células senescentes quando comparados ao D-gal ($p < 0,05$). No ensaio de produção de ânions superóxido do grupo Basal, EHLMS (0,5 e 1,0 µg/mL) e EHLST (0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) aumentaram a produção de ânions superóxido quando comparados ao controle ($p < 0,05$). No grupo D-galactose, D-gal aumentou a produção de ânions superóxido quando comparado ao controle, EHLMS (0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) e EHLST (0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 µg/mL) diminuíram a produção de ânions superóxido quando comparados ao D-gal ($p < 0,05$). Esses resultados demonstram que os extratos EHLMS e EHLST possuem atividade antisenescente em RAECs desafiadas com D-gal, e que esta atividade pode estar relacionada, pelo menos em parte, com a capacidade antioxidante dos extratos.

Palavras-chave: Senescência. Célula endotelial. Estresse oxidativo. D-Galactose. *Spondias spp.*

Abstract

JÚNIOR, J. F. S. **Effects of lyophilized hydroalcoholic extracts of the fruit peel of *Spondias mombin* Linn and *Spondias tuberosa* Arruda in model of senescence induced by D-Galactose in primary culture of endothelial cells isolated from the aorta artery of rats.** 2023. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). PgPNSB/CCS/UFPB. 2023.

ABSTRACT

Aging is a natural process with multifactorial causes. As we age, cells to enter a state known as senescence and it increases in number in the body. This occurs in the same way in the vascular endothelium, and one of the regulators in this process is oxidative stress, which leads to endothelial dysfunction and the appearance of age-related cardiovascular diseases. Natural products with antioxidant activity have demonstrated beneficial effects on the cardiovascular system. Therefore, the search for compounds with antioxidant and antisenescent activity in this field should be explored. The literature shows that fruit trees such as *Spondias mombin* Linn (cajazeira) and *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro) have a good amount of phenolic compounds with antioxidant character. No study has been designed to investigate the antisenescent capacity involving these plants. The objective of this work was to evaluate the effects of lyophilized hydroalcoholic extracts from the fruit peels of *Spondias mombin* Linn (EHLMS) and *Spondias tuberosa* Arruda (EHLST) in a model of senescence induced by D-Galactose in a primary culture of endothelial cells isolated from the aorta artery of rats (RAECs). Tests were carried out to determine the total phenolic content, DPPH• radical scavenging activity and identification and quantification of phenolic compounds by high performance liquid chromatography. The cultivated RAECs were divided in two groups: Basal (treated only with EHLMS or EHLST extracts at concentrations 0.01; 0.05; 0.1; 0.5 to 1.0 µg/mL) and D-Galactose (challenged with D-gal 20 mg/mL and treated with EHLMS or EHLST extracts at concentrations 0.01; 0.05; 0.1; 0.5 to 1.0 µg/mL) for 48 hours to assess viability cells, cellular senescence and production of superoxide anions. EHLMS and EHLST showed a high content of total phenolics, scavenging capacity of DPPH• radicals, and several phenolic compounds were found and quantified. In the Basal group to cell viability assay, the treatment with EHLMS (1.0 µg/mL) and EHLST (0.1, 0.5 and 1.0 µg/mL) reduced viability when compared to the control ($p < 0.05$). In the D-Galactose group, D-gal reduced cell viability when compared to control, the treatment with EHLMS (0.5 µg/mL) and EHLST (0.5 and 1.0 µg/mL) reduced viability when compared to D-gal ($p < 0.05$). In the SA-β-gal assay of Basal group, no one of the extracts was able to alter senescence. In the D-Galactose group, D-gal increased the percentage of senescent cells when compared to the control, EHLMS (0.1, 0.5 and 1.0 µg/mL) and EHLST (0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 µg/mL) decreased the percentage of senescent cells when compared to D-gal ($p < 0.05$). In the Basal group to superoxide anion production assay, EHLMS (0.5 and 1.0 µg/mL) and EHLST (0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 µg/mL) increased the production of superoxide anions when compared to the control ($p < 0.05$). In the D-galactose group, D-gal increased the production of superoxide anions when compared to the control, EHLMS (0.1, 0.5 and 1.0 µg/mL) and EHLST (0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 µg/mL) decreased the production of superoxide anions when compared to D-gal ($p < 0.05$). These results demonstrate that EHLMS and EHLST extracts have antisenescent activity in RAECs challenged with D-gal, and that this activity may be related, at least in part, to the antioxidant capacity of the extracts.

Keywords: Senescence. Endothelial cell. Oxidative stress. D-Galactose. *Spondias* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Potencial redox como regulador da síntese e degradação das espécies reativas de oxigênio em células de indivíduos jovens e idosos.....	31
Figura 2 – Alterações estruturais e funcionais vasculares durante o envelhecimento	33
Figura 3 - Cajazeira e umbuzeiro com seus respectivos frutos	37
Figura 4 - Evolução do cultivo celular de RAECs	50
Figura 5 - Categorização dos grupos experimentais utilizados para a investigação dos efeitos dos extratos EHLSM ou EHLST sobre RAECs na ausência ou presença de D-Galactose	52
Figura 6 - Medida da capacidade sequestradora de radical livre DPPH• dos extratos EHLSM e EHLST	58
Figura 7 - Viabilidade celular de RAECs tratadas com os extratos EHLSM ou EHLST no grupo Basal utilizando o ensaio de MTT	60
Figura 8 - Viabilidade celular de RAECs desafiadas com D-galactose e tratadas com os extratos EHLSM ou EHLST utilizando o ensaio de MTT	61
Figura 9 - Senescência celular de RAECs tratadas com o extrato EHLSM utilizando o ensaio de SA-β-gal no grupo Basal.....	62
Figura 10 - Senescência celular de RAECs tratadas com o extrato EHLST utilizando o ensaio de SA-β-gal no grupo Basal.....	63
Figura 11 - Senescência celular de RAECs desafiadas com D-galactose e tratadas com o extrato EHLSM utilizando o ensaio de SA-β-gal.....	64
Figura 12 - Senescência celular de RAECs desafiadas com D-galactose e tratadas com o extrato EHLST utilizando o ensaio de SA-β-gal.....	65
Figura 13 - Produção de ânions superóxido em RAECs tratadas com o extrato EHLSM no grupo Basal utilizando o ensaio de DHE.....	66
Figura 14 - Produção de ânions superóxido em RAECs tratadas com o extrato EHLST no grupo Basal utilizando o ensaio de DHE.....	67
Figura 15 - Produção de ânions superóxido em RAECs desafiadas com D-galactose e tratadas com o extrato EHLSM utilizando o ensaio de DHE	68
Figura 16 - Produção de ânions superóxido em RAECs desafiadas com D-galactose e tratadas com o extrato EHLST utilizando o ensaio de DHE	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução de PBS	43
Tabela 2 - Composição da solução de X-gal.....	43
Tabela 3 - Compostos fenólicos encontrados e quantificados no EHLSM por cromatografia líquida de alta eficiência	59
Tabela 4 - Compostos fenólicos encontrados e quantificados no EHLST por cromatografia líquida de alta eficiência	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AA	% de atividade antioxidante
AGEs	Produtos finais de glicação avançada
Akt	Proteína cinase B
AMPK	Proteína cinase ativada por 5'-monofosfato de adenosina
AngII	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora 1
Bcl-2	Linfoma de células B ₂
CAT	Catalase
CDKN2A	Cinase dependente de ciclina 2A
CE ₅₀	Concentração efetiva 50%
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMLVs	Células musculares lisas vasculares
COX	Ciclooxigenase
Ctl	Controle
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
D-gal	D-galactose
DHE	di-hidroetídio
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
EHL _{SM}	Extrato hidroalcoólico liofilizado da casca do fruto de <i>Spondias mombin</i> Linn.
EHL _{ST}	Extrato hidroalcoólico liofilizado da casca do fruto de <i>Spondias tuberosa</i> Arruda
eNOS	Sintase de óxido nítrico endotelial
EPM	Erro padrão da média
ER	Retículo endoplasmático

ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina-1
FC	Folin-Ciocalteu
FOXO	<i>Forkhead Box O</i>
IL	Interleucina
iNOS	Sintase de óxido nítrico induzível
IpeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
LOX	Lipoxigenase
MDA	Malonaldeído
miRNAs	Micro RNAs
MMPs	Metaloproteinases de matriz extracelular
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOX	NADPH-Oxidase
Nrf2	Fator nuclear relacionado ao eritróide 2
p16	Proteína p16
p21	Proteína p21
p38MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno p38
p53	Proteína p53
PAI-1	Inibidor 1 do ativador do plasminogênio
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Proteína C reativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase
POT1	Proteção do telômero 1
PPAR-γ	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma gama
pRb	Proteína de retinoblastoma
PUFA	Ácido graxo poli-insaturado
RAECs	Células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos
RAP1	Proteína repressora/ativadora 1
SASP	Fenótipo secretório associado à senescência

SA- β -gal	β -galactosidase associada à senescência
SFB	Soro fetal bovino
SIRT	Sirtuína
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SOD	Superóxido dismutase
TIN2	Fator nuclear 2 de interação com TERF1
Tn α	Fator de necrose tumoral alfa
TPP1	Homólogo da Proteína da Displasia Adrenocortical
TRF1	Fator de ligação à repetição telomérica 1
TRF2	Fator de ligação à repetição telomérica 2
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
Ulk1	Cinase ativadora de autofagia 1
UPA	Unidade de Produção Animal
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	28
2.1 ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO DE SENESCÊNCIA CELULAR.....	28
2.2 SENESCÊNCIA E ESTRESSE OXIDATIVO	29
2.3 SENESCÊNCIA ENDOTELIAL VASCULAR.....	32
2.4 MODELO DE INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA CELULAR POR D- GALACTOSE.....	34
2.5 SENOTERAPÊUTICA.....	35
2.6 <i>Spondias mombin</i> Linn e <i>Spondias tuberosa</i> Arruda	36
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 GERAL.....	40
3.2 ESPECÍFICOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 TIPO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	42
4.2 ANIMAIS	42
4.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	42
4.4 SOLUÇÕES	43
4.5 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS LIOFILIZADOS DAS CASCAS DOS FRUTOS DE <i>Spondias mombin</i> Linn E <i>Spondias tuberosa</i> Arruda	44
4.6 ENSAIOS QUÍMICOS	45
4.6.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos EHLST e EHLST	45
4.6.2 Determinação da atividade sequestradora de radicais DPPH• dos extratos EHLST e EHLST	46
4.6.3 Identificação e quantificação de compostos fenólicos totais dos extratos EHLST e EHLST por cromatografia líquida de alta eficiência	47
4.7 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	49
4.7.1 Isolamento e cultivo de células endoteliais da artéria aorta de ratos ...	49

4.7.2	Indução da senescência em RAECs isoladas com D-Galactose e preparo dos extratos para incubação	51
4.7.3	Protocolos experimentais do EHLSM e do EHLST em modelo de senescência induzida por D-Galactose in vitro	51
4.7.3.1	<i>Categorização dos grupos experimentais</i>	51
4.7.3.1.1	<i>Avaliação da viabilidade celular</i>	53
4.7.3.1.2	<i>Análise da senescência através do ensaio de SA-β-gal</i>	53
4.7.3.1.3	<i>Avaliação da quantificação de EROs intracelular por microscopia de fluorescência</i>	54
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5.	RESULTADOS.....	57
5.1	ESTUDOS QUÍMICOS.....	57
5.1.1	Determinação do conteúdo de fenólicos totais dos extratos EHLSM e EHLST	57
5.1.2	Determinação da atividade sequestradora de radicais DPPH• dos extratos EHLSM e EHLST	57
5.1.3	Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência.....	58
5.2	ESTUDOS FARMACOLÓGICOS <i>IN VITRO</i>	60
5.2.1	Avaliação dos efeitos dos extratos EHLSM e EHLST sobre a viabilidade celular em cultivo primário de RAECs	60
5.2.2	Avaliação dos efeitos dos extratos EHLSM e EHLST sobre a senescência celular em cultivo primário de RAECs	61
5.2.3	Avaliação dos efeitos dos extratos EHLSM e EHLST sobre a produção de ânions superóxido em cultivo primário de RAECs	66
5.	DISCUSSÃO	71
6.	CONCLUSÕES.....	80
	REFERÊNCIAS.....	82
	ANEXOS	100

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é tido como um processo de causa multifatorial, sendo caracterizado por um declínio das funções fisiológicas a nível molecular, celular e tecidual (HODGSON *et al.*, 2020). Segundo a Organização Mundial da Saúde (2022), entende-se por idoso o indivíduo com idade igual ou superior aos 60 anos e dados desta mesma entidade afirmam que até o ano de 2025 haja mais de 800 milhões de pessoas ao redor do mundo com mais de 65 anos e que em 2050 o quantitativo deste grupo de indivíduos terá ultrapassado o de jovens. Projeções feitas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2015) apontam que em 2030 o número de idosos ultrapassará o de crianças e adolescentes e que em 2050 esta faixa da população representará cerca de 30% dos cidadãos brasileiros.

É de conhecimento que indivíduos idosos têm uma predisposição natural ao desenvolvimento de doenças relacionadas à idade, como câncer, diabetes, osteoporose, doença de Parkinson, doença de Alzheimer (HODGSON *et al.*, 2020; JAUL; BARRON, 2017). E um dos sistemas que mais é afetado nesta condição é o cardiovascular, uma vez que as doenças cardiovasculares são causa de grande mortalidade nesta camada da sociedade (CONSTANTINO; PANENI; COSENTINO, 2016; PANENI *et al.*, 2017). Distúrbios como hipertensão, acidente vascular cerebral, doença arterial coronariana, angina de peito, insuficiência cardíaca congestiva, juntamente com as suas comorbidades associadas (diabetes e o próprio envelhecimento) fazem parte do arsenal de patologias que idosos acabam por desenvolver (ABDELLATIF *et al.*, 2023; CHILDS; DEURSEN, 2018; DAIBER *et al.*, 2017).

Na busca de melhor esclarecimento sobre a relação entre a fragilidade observada no organismo de um indivíduo idoso e o surgimento de processos fisiopatológicos instalados nesta condição, estudos *in vitro* foram realizados por Hayflick e Moorhead (1961) mostrando que as células entram num estado que ficou conhecido como senescência (sendo este o envelhecimento a nível celular) e que as células senescentes aumentam em número com o avançar da idade, onde se observaria que existe uma associação entre a senescência celular e doenças relacionadas à idade (CHILDS *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2022).

Sendo assim, estudos com cultivo de células se fazem presentes no arcabouço da pesquisa experimental para melhor compreensão das vias que levam à senescência celular e os métodos de uma possível intervenção farmacológica nas mesmas (SHAKERI *et al.*, 2018). Um dos processos celulares envolvidos na senescência e bastante estudado em células isoladas é o do estresse oxidativo, observado pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) (ALMEIDA *et al.*, 2022; DU *et al.*, 2019). A mimetização da senescência celular pode ser alcançada em cultura de células endoteliais através do desafio com o açúcar D-Galactose sendo, portanto, considerado um bom modelo de estudo para a relação entre senescência e estresse oxidativo (LEE *et al.*, 2020), visto que os processos de senescência vascular tem sua gênese em células endoteliais (HAN; KIM, 2023).

Em se tratando de senescência cardiovascular, os processos celulares envolvidos ainda não estão completamente estabelecidos, sendo necessários mais estudos aprofundados nesta área (HEMANTHAKUMAR *et al.*, 2021; OWENS *et al.*, 2021). Pesquisas estão sendo feitas com o intuito de encontrar compostos que possam ser extraídos de plantas, animais ou até mesmo sintetizados em laboratório, que demonstrem efetiva ação biológica devidamente comprovada no combate às desordens fisiológicas associadas (BORGHESAN *et al.*, 2020 KUMAR; BANO; EHNINGER, 2020).

Nessa busca de compostos, estudos demonstram que substâncias presentes em alimentos, tais como frutas e leguminosas, beneficiam a saúde geral do organismo humano (CHEN *et al.*, 2022; WOO *et al.*, 2022) e um dos sistemas que mais é favorecido é o cardiovascular, principalmente pela ação antioxidante e de combate ao envelhecimento que esses produtos parecem ter (ARAUNA *et al.*, 2019; NASIRIAN; MENICHETTI, 2023). A partir do desenvolvimento dessas pesquisas, fora visto que plantas que apresentam frutos são ricas em compostos denominados polifenóis (tais como ácidos fenólicos, flavonoides e taninos), com ação predominantemente antioxidante (HAMINIUK *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2014).

Dentre essas, árvores frutíferas endêmicas da região Nordeste do Brasil do gênero *Spondias spp.* – em particular a *Spondias mombin* ou *Spondias lutea* Linn (cajazeira) e *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro) – se destacam nesse aspecto por apresentarem em sua composição (principalmente na casca, mas também na

polpa destes frutos e em suas folhas) carotenoides, flavonoides, taninos e terpenoides, demonstrando atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antidiabética e antifúngica (BARBOSA *et al.*, 2018; CABRAL *et al.*, 2016; GREGORIS *et al.*, 2013; GUEDES *et al.*, 2020). Estudos na linha de desenvolvimento de extratos dessas espécies estão sendo explorados para análise dos efeitos biológicos que os mesmos podem ter (CRISTOFOLI *et al.*, 2018; UCHÔA *et al.*, 2015).

Todavia até o presente momento, nenhum estudo fora desenvolvido com o intuito de avaliar se extratos das cascas dos frutos dessas espécies seriam capazes de modular a senescência celular por meio da via do estresse oxidativo em cultivo primário de células endoteliais.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos dos extratos hidroalcoólicos liofilizados da casca do fruto de *Spondias mombin* Linn (cajá) e *Spondias tuberosa* Arruda (umbu) em modelo de senescência induzida por D-Galactose em cultura de células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos (RAECs).

Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DO PROCESSO DE SENESCÊNCIA CELULAR

A senescência celular consiste num processo endógeno de caráter indelével e natural que ocorre em todos os sistemas biológicos dos seres vivos (ARRANHO, 2017). Estes desarranjos são caracterizados por processos intracelulares como: parada replicativa do ciclo celular, alterações metabólicas, oxidação ácida, aumento de EROs com geração de estresse oxidativo, formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs), encurtamento dos telômeros causando danos ao material genético (DNA), resistência a apoptose e secreção de um fenótipo secretório associado à senescência (SASP). Todos estes processos em conjunto ao longo da vida celular e de forma gradativa desencadeiam o estado de senescência (GUO *et al.*, 2022; KIRKLAND; TCHKONIA, 2017).

Tais processos devem ser entendidos para uma melhor compreensão das redes mecanísticas que estão envolvidas por trás da mudança de estado de uma célula saudável para senescente. A expressão de SASP pelas células senescentes implica em secreção de citocinas e quimiocinas que atraem células do sistema imunológico, micro RNAs (miRNAs), padrões moleculares associados ao dano de proteínas (DAMPs), proteases que danificam a matriz extracelular como as metaloproteinases (MMPs) bem como indução de fatores hemostáticos como o inibidor 1 do ativador do plasminogênio (PAI-1). Isto ocorre devido à resposta a mutações oncogênicas, insultos metabólicos e sinalizações celulares de danos ocorridos na senescência e podem levar a um acúmulo tecidual de células senescentes e auxiliar no processo de doenças relacionadas à idade (HAN *et al.*, 2016; KIRKLAND; TCHKONIA, 2017).

Uma das ocorrências durante a senescência é a capacidade antiploriferativa celular, pois as mesmas interrompem o ciclo celular na fase G1 através da expressão de proteínas de supressão como a p53/p21 e p16 levando a ativação de suas vias e regulando o mecanismo da proteína de retinoblastoma (pRb) também envolvida na inibição da divisão celular. Transcorrida esta sinalização, não haverá passagem de fase replicativa; todavia a célula ainda permanece metabolicamente ativa (DODIG; CEPELAK; PAVIC, 2019; HE; SHARPLESS, 2017).

Ocorre de igual forma a ativação das vias para detecção de erros, como por exemplo, as vias da proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38MAPK) e do fator nuclear kappa B (NF- κ B), levando a síntese de transcritos associados à senescência e estimulação de processos pró-inflamatórios. A indução da cinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) pelos receptores ativados por proliferador de peroxissoma γ (PPAR- γ) pode levar também a uma maior expressão e aumento da atividade da enzima lisossômica β -galactosidase (HE; SHARPLES, 2017; ZHOU; BORSA; SIMON, 2021). Essa enzima é mantida ativa constitutivamente nos lisossomos das células em pH 4,0; todavia, essas enzimas se acumulam e permanecem ativas nos lisossomos de células senescentes em pH 6,0, culminando no aumento da SA- β -gal (β -galactosidase associada à senescência) responsável por ser o principal biomarcador do envelhecimento (DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2009; VALIEVA *et al.*, 2022).

Além destes acontecimentos, ocorre também o que se chama de encurtamento ou danos aos telômeros. Estes são sequências repetitivas de bases de DNA (5'-TTAGGG-3') não codificantes que se localizam nas extremidades dos cromossomos a fim de proteger o material genético de possíveis injúrias. (ARRANHO, 2017). Uma enzima chamada telomerase adiciona estas bases para recompor os telômeros. Com o passar das divisões celulares e com o advento da senescência, estas sequências vão se encurtando e a enzima vai perdendo sua função, levando a danos ao reparo do DNA por desestabilizar o complexo protetor dos telômeros chamado de shelterina ou telossomo, composto por seis proteínas: TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 e POT1 (BIRCH; BARNES; PASSOS, 2018). Este postulado inclusive foi o primeiro a ser levantado pelos estudos de Hayflick e Moorhead (1961) formulando o conceito de senescência replicativa.

2.2 SENESCÊNCIA E ESTRESSE OXIDATIVO

A sinalização redox medeia uma série de processos celulares em condições fisiológicas, tais como proliferação, sobrevivência, diferenciação, inflamação, metabolismo e angiogênese (SIES *et al.*, 2022). Em concentrações adequadas e sob certo tempo de exposição, EROs e ERNs desempenham papéis que controlam o destino celular (SHIELDS; TRAA; VAN RAAMSDONK, 2021). A produção e

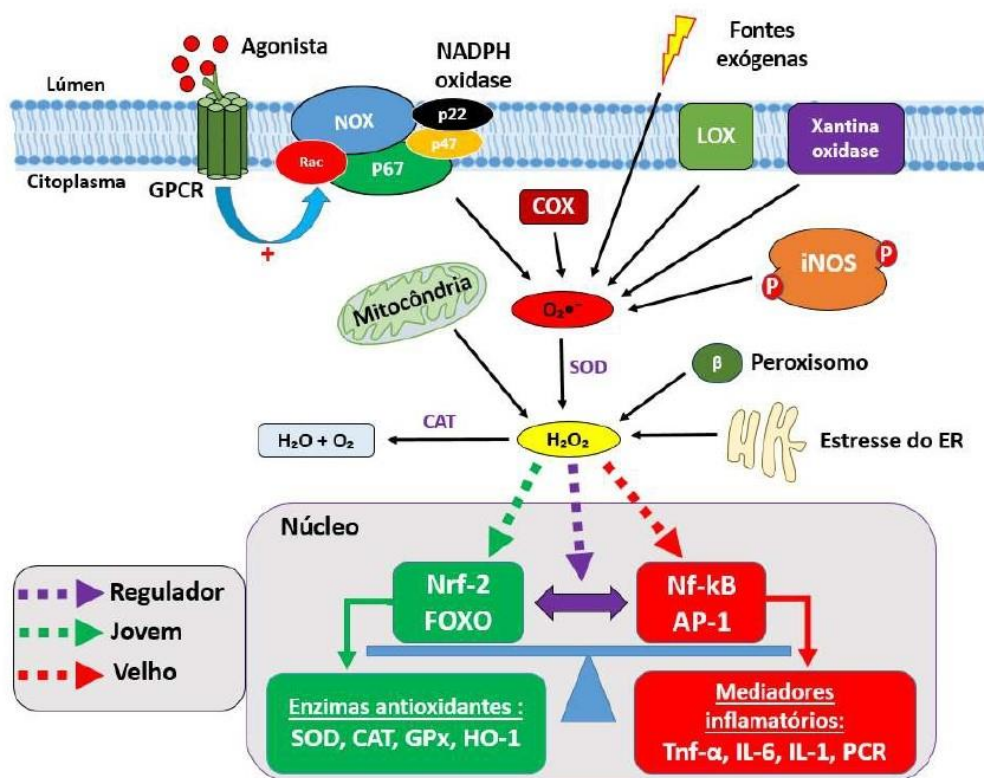
exposição excessiva a estes agentes geram o estresse oxidativo, e o déficit de sua ação (através de uma potente atividade antioxidante abundante) e síntese também se torna prejudicial. Portanto, as espécies radicalares apresentam efeito dual na homeostase celular (RAY; HUANG; TSUJI, 2012).

A formação de EROs e ERNs ocorre de maneira exógena (radiação ultravioleta, tabagismo, poluentes etc) e endógena (organelas citoplasmáticas como a mitocôndria, peroxissomos e retículo endoplasmático (ER), enzimas como a ciclooxigenase (COX), lipoxigenase (LOX), sintase de óxido nítrico induzível (iNOS)). Outra fonte endógena de formação das espécies radicalares é o complexo enzimático ligado à membrana da família das fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidase (NADPH Oxidase) nas isoformas NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 e Xantina Oxidase (XO) que convertem o oxigênio molecular em espécies radicalares e altamente reativas e instáveis, como peroxinitrito (ONOO^-), ânions superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 1). Estas espécies são uma forma que a célula utiliza no combate a patógenos e cursam também em sinalizações celulares específicas sendo essenciais para estas (ALMEIDA *et al.*, 2022; ARANDA-RIVERA *et al.*, 2022). Numa condição de estresse, EROs e ERNs causam danos celulares e injúrias ao DNA presente no núcleo e na mitocôndria, podendo levar a ativação de vias pró-inflamatórias mediadas pela ativação do NF- κ B e da proteína ativadora 1 (AP-1) ocasionando em síntese e liberação de interleucinas (ILs) do tipo 1 e 6, proteína C reativa (PCR) e do fator de necrose tumoral alfa ($\text{Tnf}\alpha$) (LIGUORI *et al.*, 2018; POLE; DIMRI; DIMRI, 2016).

O resultado do estresse oxidativo acarreta a parada do ciclo celular e sua consecutiva morte, pois as EROs e ERNs tem como alvo a oxidação de proteínas e perda reversível ou irreversível de suas funções. Existem proteínas e enzimas antioxidantes que regulam as atividades dos radicais livres – como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) etc – moduladas por fatores de transcrição como os da família *Forkhead box O* (FOXO) e o fator nuclear relacionado ao eritróide 2 (Nrf2). Ocorre então uma desregulação e os agentes antioxidantes endógenos parecem não ser sintetizados em grande escala, prevalecendo o estresse oxidativo que culmina em apoptose celular – majoritariamente pela via mitocondrial intrínseca – por indução das espécies radicalares (Figura 1), inibição da proteína cinase ativada por 5'-monofosfato de adenosina (AMPK), dentre outras alterações (DAVALI

et al., 2016; HAN et al., 2016; PAPACONSTATINOU, 2019). Sabe-se que o estresse oxidativo está intimamente ligado ao processo de senescência, regulando também outras vias desta condição (ALMEIDA *et al.*, 2022).

Figura 1 - Potencial redox como regulador da síntese e degradação das espécies reativas de oxigênio em células de indivíduos jovens e idosos



Fonte: ALMEIDA; RIBEIRO; MEDEIROS, 2017.

Esse estresse oxidativo leva a uma metilação do DNA mitocondrial e nuclear, expressão de oncogenes, perda de genes supressores de tumor e indução de micro RNAs (miR-210 e miR-494) acarretando no desregulamento do processo de indução e inibição da autofagia (PANTELIS *et al.*, 2023)). A autofagia é conceituada como sendo um processo de degradação intracelular lisossomal de metabólitos desnecessários. É regulada pela complexa rede macanística da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), cinases ativadoras de autofagia 1 (Ulk1) e proteínas da família das *B-cell lymphoma 2* (Bcl2) (LUO *et al.*, 2011). Como a autofagia está inibida (por uma superexpressão de mTOR e inibição de Ulk1, juntamente com outros fatores somados), há um acúmulo de detritos orgânicos intracelulares (proteínas oxidadas, produtos de glicação

avançada) desfavorecendo a atividade das sirtuínas (SIRTs) que regulam, dentre outros eventos, a longevidade celular relacionadas diretamente com a senescência (PAN *et al.*, 2022; SINGH *et al.*, 2018).

Dentro dos processos intracelulares ocasionados pelo estresse oxidativo, a peroxidação lipídica é um mecanismo bem estabelecido de lesão celular em plantas e animais e é usado como um indicador de estresse oxidativo em células e tecidos. Os peróxidos lipídicos, derivados de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), são instáveis e se decompõem para formar uma série complexa de compostos, que incluem compostos carbonílicos reativos, como o malonaldeído (MDA), leva à oxidação nas bases nitrogenadas do DNA e danos proteicos permanentes (LIZARDO *et al.*, 2017; JUAN *et al.*, 2021).

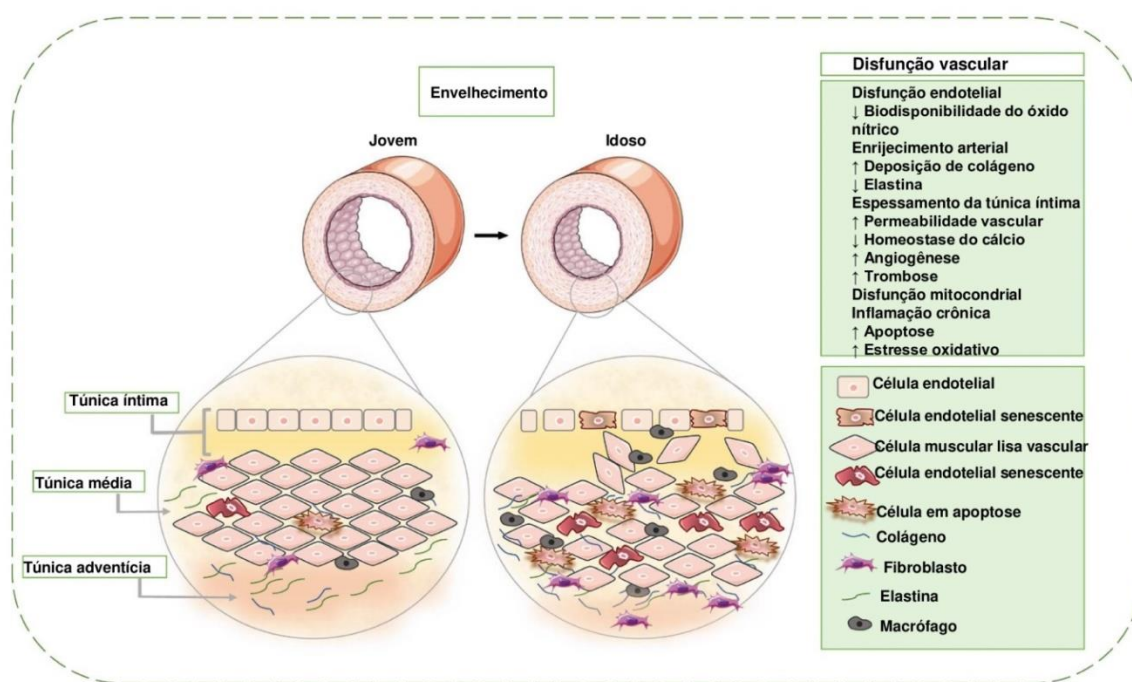
2.3 SENESCÊNCIA ENDOTELIAL VASCULAR

A senescência vascular é tida como uma degeneração progressiva dependente da idade que torna os vasos sanguíneos vulneráveis, contribuindo para o surgimento de distúrbios relacionados (OLIVEIRA *et al.*, 2022). A senescência compromete o papel essencial que o endotélio desempenha na manutenção da homeostase vascular, promovendo assim a disfunção endotelial e o desenvolvimento de doenças vasculares relacionadas à idade (JIA *et al.*, 2019). A relação entre senescência e disfunção endotelial tem sido bastante estudada, todavia distinguir o que é senescência endotelial continua sendo uma barreira a ser superada para uma abordagem terapêutica eficaz (BLOOM *et al.*, 2022; HAN; KIM, 2023; HWANG *et al.*, 2022).

Esta é caracterizada por todos os desarranjos que acontecem numa célula em estado de senescência, e relacionado a isto características mais específicas a nível molecular, como o desacoplamento da enzima sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS) presente nas células endoteliais dos vasos, remodelamento vascular e angiogênese, síntese citocinas pró-inflamatórias, desbalanço do processo de contração e relaxamento vascular em células musculares lisas vasculares (CMLVs), estresse oxidativo etc (GROOTAERT *et al.*, 2018; RAJ *et al.*, 2021). O dano vascular causado pela senescência no envelhecimento é nítido, pois esse processo gera disfunção endotelial (por diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico na

camada íntima dos vasos, composta de células endoteliais), enrijecimento arterial com espessamento da túnica média (composta de células musculares lisas vasculares), perda da elasticidade dos vasos através do aumento de colágeno e diminuição de elastina na túnica adventícia, além do processo de inflamação crônica (também chamado de *inflammaging*). Compreender estes mecanismos se faz necessário para se pensar na melhor maneira de atenuar doenças cardiovasculares relacionadas à idade (ALMEIDA *et al.*, 2020) (Figura 2).

Figura 2 – Alterações estruturais e funcionais vasculares durante o envelhecimento



Fonte: ALMEIDA *et al.*, 2020.

A eNOS é a principal enzima responsável pela síntese do mediador vasorrelaxante mais conhecido e mais importante: o óxido nítrico (NO). Este gás solúvel é produzido nas células endoteliais presentes no lúmen dos vasos sanguíneos e age diretamente nas células musculares lisas vasculares (CMLVs) promovendo dilatação (DAIBER *et al.*, 2017). Um evento chamado de desacoplamento da eNOS é responsável pela formação de EROs e ERNs (como O_2^- , H_2O_2 , $ONOO^-$) a partir da rota bioquímica do NO (KATUSIC; D'USCIO; NATH, 2009). Sendo assim, uma maior quantidade de agentes vasoconstritores – como a angiotensina II (AngII) e a endotelina 1 (ET1) – agirão nas CMLVs, desbalanceando os processos de contração e relaxamento dos vasos sanguíneos. (KATSUUMI *et al.*, 2018).

Partindo deste princípio, grupos de pesquisa tem se empenhado em estudar a senescência vascular a partir do cultivo de células endoteliais por vários métodos, na tentativa de buscar melhor entender as vias de sinalização incorridas neste processo (CHALA *et al.*, 2021; KHAN *et al.*, 2017) e como intervir nos mesmos, sendo considerados estudos-modelo na gênese da pesquisa experimental no campo da farmacologia cardiovascular (HONDA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2014).

2.4 MODELO DE INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA CELULAR POR D-GALACTOSE

Dentre os mais diversos modelos de indução de senescência, um destes se destaca para os estudos *in vitro*, a partir da D-Galactose. O modelo acelerado de envelhecimento induzido por D-galactose é amplamente aceito; baseia-se na teoria metabólica e apresenta muitos aspectos semelhantes ao processo natural de envelhecimento (ELZI; SONG; SHIIO, 2016; WU *et al.*, 2017). Tal modelo pode ser utilizado em estudos com células endoteliais isoladas por induzir senescência prematura e também administrado de forma intraperitoneal em animais para acelerar o envelhecimento (LEE *et al.*, 2020; MISTRIOTIS; ANDREADIS, 2017; REZENDE *et al.*, 2021; TRINIDAD *et al.*, 2021).

A literatura corrobora com estudos que mostram que a administração crônica de D-Galactose ainda pode causar o enfraquecimento do sistema imunológico, deficiência de hormônios sexuais, aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e apoptose celular diminuição da capacidade antioxidante total, promovendo estresse oxidativo (XU *et al.*, 2020; VARESI *et al.*, 2022). Todos esses efeitos, principalmente o desequilíbrio da produção de EROs e a diminuição da defesa antioxidante, afetam as estruturas e funções de tecidos e órgãos que favorecem o desenvolvimento de doenças (LEE *et al.*, 2020).

Estudos também demonstram que este monossacarídeo além de acelerar *in vivo* os processos de envelhecimento no animal, também induz senescência celular na concentração de 20mg/mL por 48 horas em células cultivadas para os mais diversos estudos (HOU *et al.*, 2019; QIAO *et al.*, 2020; YE *et al.*, 2016). Tais desordens que levam à esta indução ainda não são totalmente compreendidas, mas sabe-se que este modelo de indução nas células leva a uma desordem metabólica capaz de aumentar a produção de EROs e ERNs, levando ao estresse oxidativo

com consequente diminuição da expressão de enzimas antioxidantes (LEE *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2022). O estresse oxidativo é, então, uma das causas factuais, um dos pontos-chave capazes de influenciar e regular outros processos celulares envolvidos na senescência (ALMEIDA *et al.*, 2022).

A galactose é um açúcar monossacarídeo redutor e, embora tenha duas formas (D- e L-), o corpo pode metabolizar apenas a forma D- da galactose. Existem muitos alimentos enriquecidos com d -galactose, incluindo leite, chocolate, amendoim, mel, queijo, iogurte, cereja, kiwi e aipo e está presente em quantidades muito pequenas em organismos. Quando as concentrações de D-galactose atingem valores superiores aos ideais, ela é oxidada pela galactose oxidase e reduzida pela aldose redutase. Além disso, a D-galactose reage com as aminas para formar um composto instável (ACOSTA; GROSS, 1995; MORAVA, 2014; WU *et al.*, 2017).

Estudos *in vitro* demonstram que a indução de senescência prematura com D-galactose é capaz de aumentar também a atividade lisossomal da SA- β -gal, expressão de genes associados à parada do ciclo celular em senescência (como a vida p53/p21), além de regular positivamente a expressão e síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, Tnf- α) e aumentar os níveis de AGEs, o que contribui ainda mais para o processo de senescência celular e o surgimento de doenças relacionadas à idade (CAO *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2019; RAHIMI; ASKARI; MOUSAVI, 2018; SHEN *et al.*, 2014).

2.5 SENOTERAPÊUTICA

Com o intuito de se alcançar êxito nas pesquisas, a comunidade científica tem demonstrado cada vez mais particular interesse em desenvolver técnicas que possam atenuar estes processos de senescência celular promovendo uma melhoria na qualidade de vida dos idosos, diminuindo, assim, o risco de desenvolvimento de doenças relacionadas à idade (ANGEL *et al.*, 2022). Já é possível, portanto, serem encontrados na literatura trabalhos descrevendo alguns fármacos que estão sendo capazes de agir nestas vias da senescência em geral e cardiovascular (sendo eles sintetizados em laboratório e já utilizados na terapêutica com outros propósitos e produtos isolados de plantas e microrganismos) (AREFIN *et al.*, 2020; KAUR; FARR, 2020).

Com relação aos fármacos advindos de produtos naturais, existem cinco bons candidatos: a quercertina e o resveratrol (um flavonóide e um polifenol, respectivamente, encontrado e isolado de frutas e outros alimentos), a berberina e a piperlongumina (considerados potentes alcaloides isolados de plantas como a pimenta e a berberis) e a rapamicina (uma lactona macrocíclica produzida e isolada de microrganismos da espécie *Streptomyces hygroscopicus*) (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022; KAUR; FARR, 2020; LI et al., 2019).

Já em se tratando de fármacos sintetizados em laboratório, há pelo menos quatro bons candidatos: a metformina (um hipoglicemiante oral da classe das biguanidas), o desatinibe (fármaco antineoplásico da classe dos inibidores da tirosina cinase) e STR1720 e SRT2104 (análogos moduladores das SIRTs) (CHAIB; TCHKONIA; KIRKLAND, 2022; HEISS; SPYRIDOPOULOS; HAENDELER, 2018; KANE; SINCLAIR, 2018).

Na obstinada corrida para se encontrar novos fármacos com efeito particular anti-senescente e antioxidante, estudos elaborados nessa perspectiva começam a ganhar cada vez mais força, sendo considerados pioneiros em suas linhas de pesquisa e que cada vez mais vem chamado a atenção da população e da própria comunidade científica, além de órgãos de fomento à pesquisa com investimento local (LAGOUMTZI; CHONDROGIANNI, 2021; PARK; SHIN, 2022; WANG *et al.*, 2021).

2.6 *Spondias mombin* Linn e *Spondias tuberosa* Arruda

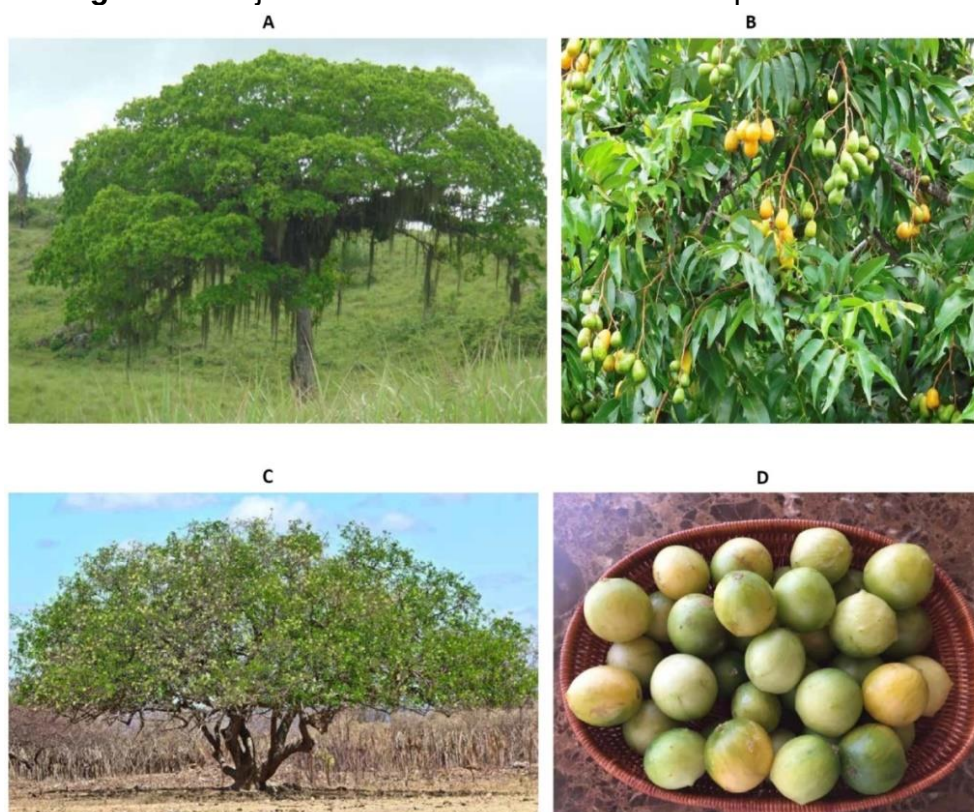
Nessa perspectiva, produtos naturais que demonstrem atividade biológica têm sido considerados uma verdadeira fonte no campo do descobrimento de novas drogas, visto que a riqueza de compostos encontrados é praticamente infindável e com excelentes resultados descritos nas diversas áreas de conhecimento da farmacologia (ATANASOV *et al.*, 2021; VEERESHAM, 2012) e, dentro deste contexto, o Brasil apresenta a maior biodiversidade do mundo, com mais de 50.000 espécies de plantas superiores. No entanto, poucos produtos inovadores foram desenvolvidos no Brasil a partir de constituintes ativos derivados da biodiversidade brasileira. Uma das regiões com maior número de espécies a ser estudada é a região Nordeste e, sem dúvidas um dos maiores táxons para estudo é o gênero

Spondias spp., cujos expoentes são a cajazeira e o umbuzeiro (CALIXTO, 2019; SAMEH *et al.*, 2018).

A cajazeira (*Spondias mombin* ou *Spondias lutea* Linn) e o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) pertencem à família Anacardiaceae e ao gênero *Spondias spp.* que é composto de dez a quinze espécies que ocorrem de forma espontânea ou subespontânea no Nordeste do Brasil. São árvores frutíferas endêmicas da Caatinga que apresentam diversos benefícios para o ecossistema e para a população local, servindo tanto como alimento para polinizadores e dispersores quanto para ruminantes domésticos (SILVA *et al.*, 2012; SIQUEIRA *et al.*, 2016; REY-BLANES *et al.*, 2020).

Apesar de seus benefícios, estas árvores enfrentam várias ameaças naturais e antrópicas que podem levar a sua extinção. O fruto da cajazeira é popularmente denominado “cajá” e o do umbuzeiro denominado “umbu” e se tornaram uma importante fonte de renda para moradores da região (Figura 3) (MACHADO; CARVALHO; VAN DEN BERG, 2015; SILVA *et al.*, 2012).

Figura 3 - Cajazeira e umbuzeiro com seus respectivos frutos



Cajazeira e umbuzeiro com seus respectivos frutos. **A.** Árvore de *Spondias mombin* Linn (cajazeira). **B.** Frutos de *Spondias mombin* Linn (cajá). **C.** Árvore de *Spondias tuberosa* Arruda (umbuzeiro). **D.** Frutos de *Spondias tuberosa* Arruda (umbu). Fonte: adaptado de Coradin; Camillo; Pareyn, 2018.

Estudos demonstram que os extratos obtidos a partir das folhas e da casca do caule da cajazeira e do umbuzeiro apresentam algumas propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória, antiviral, antidiabética e antimicrobiana, além de demonstrarem grande potencial antioxidante (BARBOSA *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 2020; NWORU *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2020; SIQUEIRA *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2020). Todavia, ao passo de que estudos são necessários quanto à toxicidade, outros são evocados para observação de possíveis ações, e estudos com árvores frutíferas como a cajazeira (*Spondias mombin* Linn) e o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) se tornam interessantes.

Entretanto, a literatura apresenta uma escassez em dados científicos no que concerne ao potencial antioxidante de seus frutos de forma mais completa e benefícios destas no manejo dos processos de senescência celular, aliado aos dados que mostram que o consumo de frutas e hortaliças tem sido associado à melhoria na qualidade de vida justamente por serem espécies com alto teor de compostos antioxidantes (ARIAS; FEIJOO; MOREIRA, 2022; BARBOSA *et al.*, 2018; CABRAL *et al.*, 2016; KAUR; KAPOOR, 2001).

Apesar de dados na literatura convergirem para diferentes atividades biológicas dos extratos obtidos a partir das folhas e da casca do caule da cajazeira e do umbuzeiro, pouco se estuda sobre a atividade biológica de extratos provenientes dos frutos dessas espécies, em particular sobre os processos de senescência em células endoteliais. Portanto, se faz necessária a investigação da ação farmacológica desse tipo de extrato no campo da senescência celular, agregando valor não só aos frutos nativos da região, mas também demonstrando o potencial farmacêutico que pode ser obtido através desse tipo de extrato.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar os efeitos dos extratos hidroalcóolicos liofilizados da casca dos frutos de *Spondias mombin* Linn (cajá) e *Spondias tuberosa* Arruda (umbu) em modelo de senescência induzida por D-Galactose em cultura primária de células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos (RAECs).

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o conteúdo de fenólicos totais dos extratos.
- Avaliar a atividade sequestradora de radicais DPPH• dos extratos.
- Identificar e quantificar os compostos fenólicos dos extratos através da cromatografia líquida de alta eficiência.
- Investigar os efeitos dos extratos em cultura de células endoteliais em modelo experimental de senescência induzida por D-Galactose sobre:
 1. Viabilidade celular.
 2. Atividade da β –galactosidase associada à senescência.
 3. Produção de ânions superóxido.

Material e métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia Cardiovascular localizado no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus I, João Pessoa-PB. Tratou-se de um estudo experimental com ensaios farmacológicos e moleculares utilizando técnicas *in vitro* a partir do cultivo primário de células endoteliais. Para execução da referida pesquisa, o projeto foi submetido à análise e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPB sob protocolo nº 9236061222 (Anexo I).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar com 8 semanas de idade. Os animais foram provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba e mantidos na Unidade de Produção Animal (UPA) do IPeFarM/UFPB. Os animais permaneceram sob condições controladas de temperatura (21 ± 1 °C), em ciclo claro-escuro de 12 horas, e umidade relativa, além de livre acesso à água e ração (ração tipo “pallets” Irradiada, Quintia®).

4.3 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

Para a realização de todos os protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes substâncias: soro fetal bovino (SFB), HEPES, L-glutamina, estreptomicina, reagente Folin-Ciocalteu, ácido gálico, etanol, acetonitrila, tripsina, 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal), di-hidroetídio (DHE), formaldeído, glutaraldeído, dimetilsulfóxido (DMSO), MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), heparina e D-Galactose obtidos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo-SP, Brasil). Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio (MgCl_2), fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e fosfato de sódio bibásico

(Na₂HPO₄) adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda (São Paulo – SP, Brasil). O ferrocianeto de potássio (C₆N₆FeK₄) e ferricianeto de potássio (C₆N₆FeK₃) adquiridos da Neon Comercial Ltda. Cloridrato de xilazina e cloridrato de cetamina adquiridos da Syntec, Santana de Parnaíba – SP, Brasil.

4.4 SOLUÇÕES

As tabelas a seguir mostram as concentrações da solução tampão fosfato-salino (PBS) (Tabela 1) e solução de X-gal (Tabela 2), que foram utilizadas durante os protocolos experimentais de limpeza celular e coloração de células senescentes, respectivamente.

Tabela 1 - Composição da solução de PBS

Composição	Concentração (mM)
NaCl	161,0
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	1,8
Na ₂ HPO ₄	15,8

Fonte: FOLDVARI *et al.*, 1998.

Tabela 2 - Composição da solução de X-gal

Composição	Concentração (mM)
Tampão citrato-fosfato (pH 6,0)	40 mM
NaCl	150 mM
MgCl ₂	2 mM
C ₆ N ₆ FeK ₄	5 mM
C ₆ N ₆ FeK ₃	5 mM
X-gal	1 mg/mL

Fonte: DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2009.

4.5 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS LIOFILIZADOS DAS CASCAS DOS FRUTOS DE *Spondias mombin* Linn E *Spondias tuberosa* Arruda

Os frutos da cajazeira (*Spondias mombin* Linn) foram coletados em um sítio do município de Conde–Paraíba, Brasil (7° 16' 54.977" S 34° 52' 39.778" O) e os do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) coletados em um sítio do município de Olivedos–Paraíba, Brasil (6° 56' 081" S 36° 16' 50.6" O). Foi concedido o atestado de regularidade de acesso para *S. mombin* Linn. (nº A3C0A3F) (Anexo II) e para *S. tuberosa* Arruda (nº A0BD05B) (Anexo III) pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).

Os frutos passaram por um processo de seleção onde foram descartadas as que apresentaram danos físicos, presença visível de sujidades e doenças e foram selecionadas as que se apresentavam no mesmo grau de maturação. Após esta seleção foram submetidos a um processo de lavagem e sanitização, de acordo com a legislação (BRASIL, 2004). Em seguida, as cascas das frutas do cajá e do umbu foram removidas e acondicionadas em depósito de vidro, devidamente protegido da luz, e conservadas em freezer -20°C. As sementes e as polpas foram descartadas e as cascas processadas. Após a remoção das cascas, elas foram previamente congeladas em temperatura -80°C (Freezer Thermo Fisher Scientific, Asheville, LLC, modelo ULT1386-3-D42) por no mínimo 24 horas. Em seguida, foram submetidas ao processo de secagem por desidratação em estufa a uma temperatura de 45°C por 48 horas (MARCHI, 2014; MENESES *et al.*, 2018).

As cascas secas, obtidas após a desidratação, foram trituradas utilizando um “mixer” comercial, seguido de trituração em gral de porcelana com posterior homogeneização das partículas através da tamisação com tamis de 45 Mesh (equivalente a 0,35mm do tamanho da malha). Os pós homogeneizados foram levados à extração, usando como solvente uma mistura de etanol (P.A) e água (50:50); a proporção dos pós secos em relação ao volume de solvente foi de 5% (m:v), em seguida, as amostras foram levadas a um ultrassom com frequência de 42kHz por 16 minutos (SHI *et al.*, 2003; CARRERA *et al.*, 2012). Após o período de extração, as amostras foram filtradas a vácuo (porosidade 3 µm) para retirada do

material particulado restando os extratos solubilizados (de forma individual) no solvente extrator.

Para a obtenção dos extratos secos, as soluções extrativas foram levadas ao rotaevaporador para a retirada do etanol a 45°C até que o volume fosse reduzido à metade do volume inicial da mistura de extração. Os extratos livres de etanol foram levados ao congelamento numa temperatura de -80°C por, no mínimo, 24 horas. Em seguida, foram submetidos ao processo de liofilização sob pressão de vácuo de 0,024 mBar (liofilizador Free Zone® Liter Benchtop Freeze Dry Systems, LABCONCO®) por 48 horas (DE TORRES *et al.*, 2010) obtendo-se dois extratos secos distintos, denominados extrato hidroalcólico liofilizado da casca do fruto da *Spondias mombin* Linn (EHLST) e extrato hidroalcólico liofilizado da casca do fruto da *Spondias tuberosa* Arruda (EHLST) conservados em freezer -20°C até a utilização no dia dos experimentos, sendo solubilizados e diluídos apenas momentos antes dos ensaios (solubilização em água destilada ou metanol nos ensaios químicos e em PBS seguida de diluição em meio de cultura nos ensaios farmacológicos).

4.6 ENSAIOS QUÍMICOS

4.6.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos EHLST e EHLST

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, que é um dos testes mais utilizados para este tipo de análise. É um método simples e se baseia na interação de substâncias redutoras (como compostos fenólicos) presentes em extratos e outras substâncias. O reagente de Folin-Ciocalteu é uma mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico (de cor amarelada) que, ao reagirem com os compostos fenólicos presentes nas amostras em pH alcalino, adquire uma coloração azulada por reduzirem o complexo do reagente FC e é facilmente detectável por técnicas espectrofotométricas (ARYAL *et al.*, 2019; PIRES *et al.*, 2017).

Para este teste, o ácido gálico foi utilizado como composto padrão, conforme descrito por Montreau (1972), com modificações. 0,5 mL de reagente FC 10% foi

adicionado a 120 µL das amostras separadamente (concentração dos extratos = 1mg/mL, solubilizados em água Milli-Q com posterior sonicação (Lavadora Ultrassônica, Q13/37A, Ultronique) por 10 minutos). A reação foi mantida em repouso por 5 minutos e então 400 µL de carbonato de sódio (7,5%) foram adicionados para neutralizar a mistura. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 120 minutos, e então foram transferidas para placas de 96 poços e a absorbância foi medida a 765 nm em espectrômetro UV-Visível (UV-2550, Shimadzu) (GOMES *et al.*, 2021).

Os experimentos foram feitos em triplicata e o conteúdo fenólico foi determinado por equação de regressão linear a partir da curva de calibração construída com ácido gálico (12,5 µg/mL, 25,0 µg/mL, 50,0 µg/mL, 75,0 µg/mL, 100,0 µg/mL, 150 µg/mL em metanol), onde os dados foram adquiridos pelo software leitor de microplacas multidetector Synergy™ HTX - BioTek. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por 100 gramas de extrato (mgEAG/100g).

4.6.2 Determinação da atividade sequestradora de radicais DPPH• dos extratos EHLST e EHLST

O método DPPH• (2,2-difenil-2-picrilhidrazilo) é um dos métodos mais populares e frequentemente empregados entre os ensaios antioxidantes. O DPPH• é um radical livre, instável que possui uma cor púrpura e uma forte absorção na extensão de 517nm. Os compostos antioxidantes presentes no meio convertem o radical DPPH• em um produto molecular mais estável, através da doação de um elétron ou um hidrogênio. A mudança de cor púrpura (radical DPPH•) para amarelo pálido (DPPH reduzido) permite a determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante (AKAR; KÜÇÜK; DOĞAN, 2017; BALIYAN *et al.*, 2022).

Para realização deste ensaio foi empregado o método de microdiluição em placas de 96 poços, adaptado de Garcez e colaboradores (2009). A solução de DPPH• foi preparada a 0,3 mM (diluída em 100 mL de metanol (MeOH)). Como padrão utilizou-se o ácido ascórbico em 8 concentrações (1,5 µg/mL, 3,0 µg/mL, 4,5 µg/mL, 6,0 µg/mL, 7,5 µg/mL, 9,0 µg/mL, 10,5 µg/mL, 12,0 µg/mL). Os extratos foram utilizados nas concentrações de 1,0 µg/mL, 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 8,0 µg/mL, 16,0 µg/mL, 32,0 µg/mL, 64,0 µg/mL, 128,0 µg/mL, 256,0 µg/mL para o EHLST e 2,0

µg/mL, 4,0 µg/mL, 8,0 µg/mL, 16,0 µg/mL, 32,0 µg/mL, 64,0 µg/mL, 128,0 µg/mL, 256,0 µg/mL, 512,0 µg/mL para o EHLST, todos diluídos em MeOH. Todas as concentrações foram transferidas para a placa. Após a diluição todas as amostras foram sonicadas (Lavadora Ultrassônica, Q13/37A, Ultronique) por 10 minutos e filtradas (filtro para seringa membrana PES 30 mm 0,22 µm estéril). Em seguida, foi feita a transferência dos extratos ou ácido ascórbico (100 µL), foi adicionado o DPPH• (0,3 mM). O metanol foi utilizado como controle negativo e o branco a amostra diluída em metanol. Todo o procedimento realizou-se em triplicata.

Após a incubação do DPPH•, a reação foi esperada por 30 minutos em temperatura ambiente e ausência de luz. Em seguida realizou-se a leitura da absorbância a 517nm em espectrofotômetro (leitor de microplacas multidetector Synergy™ HTX - BioTek). Com isso, obteve-se a avaliação do decréscimo da concentração do radical DPPH•.

A capacidade de sequestro do radical DPPH•, ou seja, o percentual da atividade antioxidante (%AA) foi calculado para os extratos EHLSM e EHLST a partir da equação:

$$\%AA = \frac{[ABS \text{ controle negativo} - (ABS \text{ amostra} - ABS \text{ branco})] \times 100}{ABS \text{ controle negativo}}$$

Onde:

Abs_{controle negativo} = absorbância do controle negativo (DPPH incubado apenas com metanol); Abs_{amostra} = absorbância da substância-teste (extrato EHLSM ou EHLST incubado com DPPH).

Os resultados obtidos foram expressos através da concentração efetiva para sequestrar 50% dos radicais livres (CE₅₀), que foi determinada de acordo com o método de regressão linear.

4.6.3 Identificação e quantificação de compostos fenólicos totais dos extratos EHLSM e EHLST por cromatografia líquida de alta eficiência

Para a confirmação do perfil de compostos fenólicos recorre-se habitualmente a metodologias cromatográficas. Dentre estas técnicas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das mais relevantes, sendo uma técnica de separação e quantificação mais utilizada para a determinação de compostos bioativos. Neste processo ocorre uma retenção seletiva dos componentes da amostra que resulta em

migrações diferenciadas dos compostos de interesse, o que permite a identificação destes (BIRD, 1989; YUNARTO *et al.*, 2023).

Para a análise dos compostos fenólicos presentes no EHLSM e no EHLST foi utilizada a CLAE de fase móvel conforme descrito por Prasad *et al.*, 2009. As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta performance Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com um injetor automático Rheodyne 7125ie um detector UV/VIS. As colunas utilizadas foram uma Coluna Shimadzu LC-18 (25 cm × 4,6 mm, tamanho de partícula de 5 µm de Supelco, Bellefonte, PA) e uma pré-coluna C-18 ODS Shimadzu.

Para a identificação dos compostos fenólicos, as amostras dos extratos EHLSM e EHLST (5 mg/mL) e os padrões foram eluídos com um sistema de gradiente que consiste em solvente A (ácido acético a 2%, v/v) e solvente B (acetonitrila/metanol, 2:1, v/v), utilizado como fase móvel, com vazão de 1 mL/min. Os extratos foram diluídos em água destilada e sonicados (Lavadora Ultrassônica, Q13/37A, Ultronique) por 10 minutos e a posteriori filtrados (filtro para seringa membrana PES 30 mm 0,22 µm estéril). A temperatura da coluna foi mantida a 25°C e o volume de injeção foi de 20 µL. A corrida cromatográfica total durou 50 minutos e os picos dos compostos fenólicos foram monitorados a 280 nm (MEIRELES *et al.*, 2021).

Os padrões utilizados na curva de calibração para este estudo foram diluídos em diferentes concentrações (0,05 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1,0 mg/mL). Foram pesquisados nos extratos EHLSM e EHLST os seguintes padrões disponíveis na biblioteca do ensaio: ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido p-cumárico, ácido salicílico, ácido sinápico, ácido siríngico, ácido trans-cinâmico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido elágico, ácido caféico, rutina, miricetina, catequina e quercetina.

O software Lab Solutions v5.6 (Shimadzu) foi usado para o registro do cromatograma e processamento de dados calculados a partir da equação obtida da respectiva curva de calibração. As análises de cada extrato foram realizadas em duplicata.

4.7 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

4.7.1 Isolamento e cultivo de células endoteliais da artéria aorta de ratos

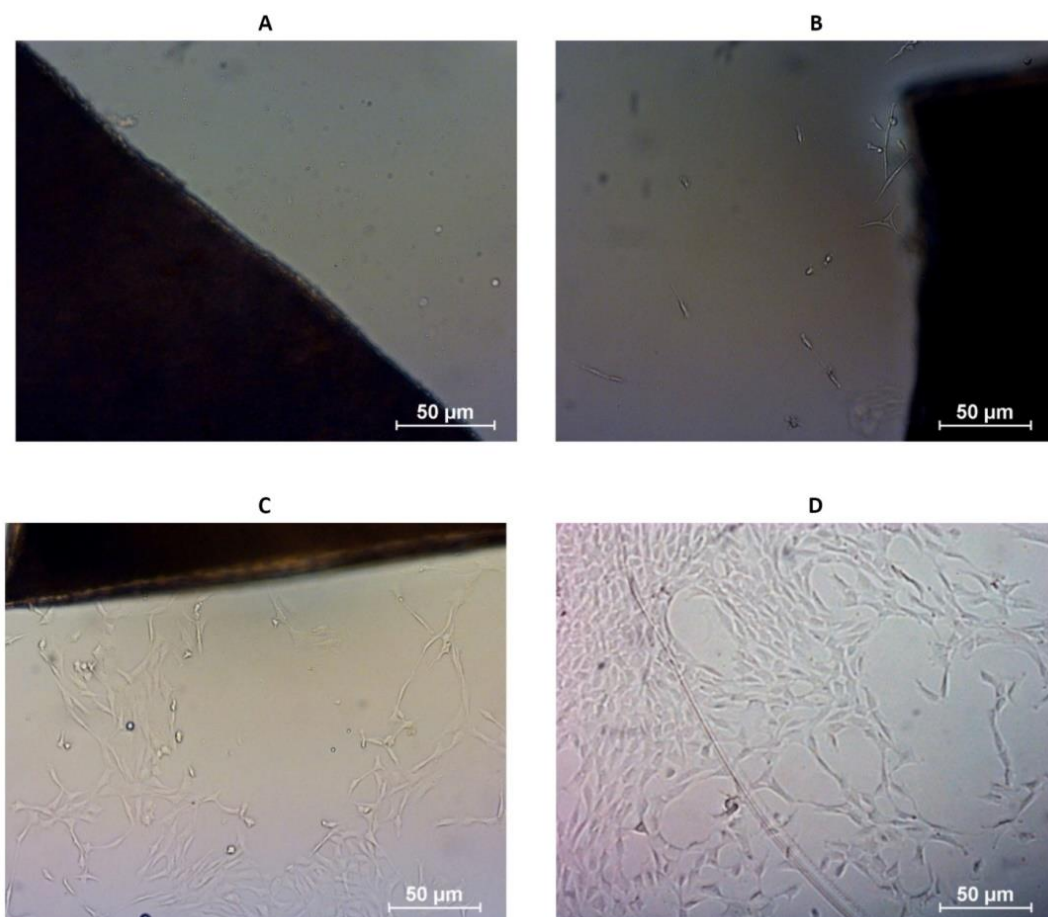
Inicialmente, os animais foram eutanasiados utilizando o método de sobredosagem da mistura anestésica de cetamina e xilazina. Após a eutanásia, os animais foram colocados em decúbito dorsal e na região do tórax e abdominal foi pulverizado uma solução de iodopovidona (PVPI) e álcool 70% para a assepsia. O abdômen foi então incisado na linha média para expor a aorta abdominal e a cavidade torácica para expor o coração e pulmões. A aorta abdominal fora incisada transversalmente para liberar o sangue e o ventrículo esquerdo submetido a uma injeção contendo uma solução de PBS com 1000 UI/mL de heparina (Hepamax-s®), para perfundir a aorta (WANG; CHEN; ZHANG, 2016; ZHU *et al.*, 2019).

Em seguida, a aorta torácica fora exposta rapidamente removida e colocada em um recipiente de PBS esterilizado gelado, e imediatamente transportado para uma capela de fluxo de ar laminar. Na capela de fluxo laminar, a aorta foi suavemente perfundida com PBS gelado para remover o sangue residual e dissecada para remover tecido adiposo e pequenos vasos laterais. Os tecidos aórticos foram então dissecados em anéis de 2 a 5 mm de comprimento para obter aproximadamente 5 a 8 aneis por animal. Cada anel aórtico foi aberto usando um par de tesoura de microdissecção e imediatamente colocada com o lado do lúmen para baixo em garrafas para cultivo celular contendo meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) baixa glicose suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina e estreptomicina, 25 mM de HEPES e 4mM de L-glutamina, com três a cinco segmentos aórticos próximos um do outro (WANG; CHEN; ZHANG, 2016; ZHU *et al.*, 2019).

Esses explantes aórticos foram cultivados nas garrafas em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C, com inspeção diária do nível médio e adição de meio de cultura, se necessário, para manter os segmentos úmidos. Após o aparecimento de células brotando do segmento aórtico e o crescimento celular atingir 80% de confluência, conforme inspecionado sob um microscópio invertido em luz branca (*Advanced inverted fluorescent microscope*: NIKON Eclipse Ti-E 200-S,

NIKON®, Japão), os segmentos aórticos eram removidos suavemente sem interrupção ou toque nas células endoteliais em crescimento (Figura 4).

Figura 4 - Evolução do cultivo celular de RAECs



Crescimento de células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos (RAECs) visualizada em diferentes dias de cultivo. **A.** Dia 0 após montagem do explante da artéria aorta em garrafa de cultivo celular (objetiva de 10x). **B.** Dia 5 após a montagem do explante da artéria aorta em garrafa de cultivo celular: observação da migração das primeiras células endoteliais cultivadas (objetiva de 10x). **C.** Dia 7 após a montagem do explante da artéria aorta em garrafa de cultivo celular: observação da migração de mais células endoteliais cultivadas (objetiva de 10x). **D.** Dia 10 após a montagem do explante da artéria aorta em garrafa de cultivo celular: retirada do explante e observação do tapete de células endoteliais abaixo do explante (objetiva de 10x).

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Em seguida, as células eram submetidas a uma tripsinização (0,05%) por 4 minutos, centrifugadas a 1.500 g por 5 minutos a 4°C e ressuspensas para passagem e cultivo em novas garrafas. O meio de cultura (suplementado com 10% de SFB) era trocado a cada 2 dias, e quando as células chegassem a 80% de confluência, seria realizado um novo repique de células. As passagens P3 a P5

foram utilizadas para a realização dos protocolos experimentais. Para cada experimento, as células foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 células/mL e o percentual de SFB contido no meio DMEM era reduzido de 10% para 2% durante o momento da incubação.

4.7.2 Indução da senescência em RAECs isoladas com D-Galactose e preparo dos extratos para incubação

Para a indução da senescência, as RAECs cultivadas foram incubadas com o açúcar indutor da senescência (D-Galactose) na concentração de 20 mg/mL por 48 horas, pois esta é a concentração ideal em tempo adequado para se alcançar tal indução (LEE *et al.*, 2020; QIAO *et al.*, 2020). Os extratos EHLSM e EHLST foram diluídos e incubados separadamente (nas concentrações de 0,01 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL) por 48 horas em placas de 48 poços mantidas em estufa de atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C (todos diluídos em meio DMEM com 2% de SFB). Após esse período, as células foram lavadas com solução de PBS para início dos protocolos experimentais de viabilidade celular, SA-β-gal e produção de ânions superóxido.

Para se alcançar as concentrações finais dos extratos EHLSM e EHLST, cada solução-mãe foi solubilizada em PBS e a partir delas foram feitas as diluições seriadas em meio DMEM com 2% de SFB na ausência ou presença de D-Galactose.

4.7.3 Protocolos experimentais do EHLSM e do EHLST em modelo de senescência induzida por D-Galactose in vitro

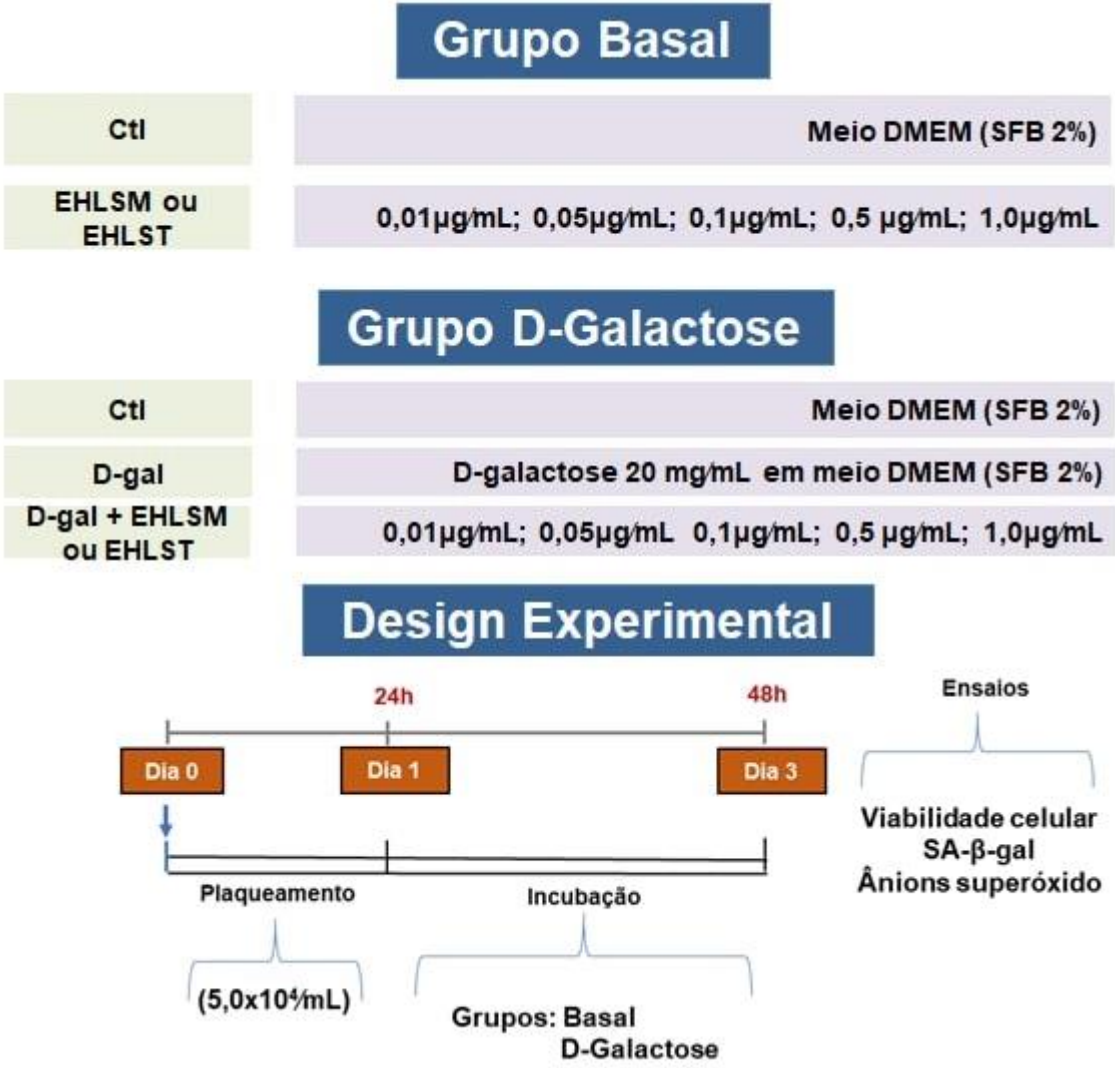
4.7.3.1 Categorização dos grupos experimentais

Para execução dos protocolos, foram propostos dois grupos experimentais: o grupo Basal e o grupo D-Galactose. O grupo Basal consiste de RAECs cultivadas e tratadas com veículo (meio DMEM suplementado com 2% de SFB) (Ctl) e os tratamentos com os extratos EHLSM ou EHLST em diferentes concentrações (0,01 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL) na ausência da substância indutora da senescência por 48 horas. Já o grupo D-Galactose consiste de RAECs

cultivadas e tratadas apenas com o veículo (Ctl), ou desafiadas com D-Galactose 20 mg/mL (D-gal), ou desafiadas com D-Galactose 20 mg/mL e submetidas ao tratamento concomitante com os extratos EHLSM ou EHLST em diferentes concentrações (0,01 µg/mL, 0,05 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL) por 48 horas (Figura 5). As RAECs foram utilizadas nas passagens de P3 a P5 para execução dos experimentos, pois possibilita o estudo geral de fatores estimulantes e vias de sinalização que coordenam o desenvolvimento celular (DIGHE *et al.*, 2013).

Alcançadas as passagens celulares adequadas aos experimentos, estas eram plaqueadas e com 24 horas após este período seguia-se a incubação dos extratos EHLSM e EHST na ausência ou presença de D-Galactose por 48 horas. Passado este tempo, iniciavam-se os protocolos experimentais. (Figura 5).

Figura 5 - Categorização dos grupos experimentais utilizados para a investigação dos efeitos dos extratos EHLSM ou EHLST sobre RAECs na ausência ou presença de D-Galactose



4.7.3.1.1 Avaliação da viabilidade celular

Para detecção da viabilidade celular foi utilizado o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). Este é um método colorimétrico que mede indiretamente a viabilidade celular. O MTT é um sal tetrazólico de cor amarelada que é convertido por células viáveis metabolicamente ativas em um cristal de formazan de cor púrpura por enzimas mitocondriais e citosólicas. O produto se acumula dentro das células como um precipitado insolúvel, além de se depositar próximo à superfície celular. Quando as células se encontram inviáveis, a capacidade de converter o MTT em formazan é perdida, sendo um marcador conveniente apenas em células viáveis, tendo sua leitura feita validada pela espectrofotometria (SALLA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020).

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (5×10^4 células/mL) e incubadas na ausência e presença de D-galactose e dos extratos EHLSML ou EHLST nas suas respectivas concentrações por 48 horas. Após este período, foi adicionado em cada poço 10 μ L de 5 mg/mL do MTT seguido de uma nova incubação das placas a 37°C por 3 horas. Em seguida o MTT foi removido cuidadosamente e adicionou-se 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para solubilização dos cristais de formazan, aguardando por uma hora a reação colorimétrica estabilizar ao abrigo da luz. Após este momento a placa foi levada ao espectrofotômetro (iMark™ *Microplate Absorbance Reader*, Heiwajima, Ota-ku, TO, Japão) para leitura numa absorbância de 595nm. Os experimentos foram feitos em triplicata e a viabilidade das células foi calculada de todos os grupos por comparação com o grupo Ctl com resultados de quatro experimentos (4n) independentes.

4.7.3.1.2 Análise da senescência através do ensaio de SA- β -gal

A detecção da atividade lisossômica de SA- β -gal requer a incubação de células fixadas com o substrato cromogênico da β -galactosidase (X-gal) em um tampão de pH 6,0. Uma cor azulada se desenvolve em células senescentes que podem ser observadas por campo claro ou microscopia de contraste de fase (DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2009).

Para detecção da senescência celular através deste ensaio, as células foram plaqueadas em placas de 48 poços (5×10^4 células/mL) e incubadas na ausência ou presença de D-galactose e dos extratos EHLSM ou EHLST nas suas respectivas concentrações por 48 horas. Após este período, o meio foi retirado e as células fixadas com uma solução de formaldeído 2% e glutaraldeído 0,2% por 1 minuto, seguido de lavagem com PBS. Após isto, as células foram incubadas com solução de X-gal por 18 horas e em seguida embebidas em glicerol 20% para preservação das células. A leitura foi realizada pela técnica de microscopia invertida em luz comum (*Advanced inverted fluorescent microscope*: NIKON Eclipse Ti-E 200-S, NIKON®, Japão) e as imagens adquiridas foram analisadas utilizando o software ImageJ® versão 1.53t.

A positividade para o ensaio é confirmada mediante a visualização de coloração azulada das células, na qual o percentual de células senescentes é calculado pelo número de células positivas para o ensaio sobre um total de 300 células contadas por poço de cada grupo. Os experimentos foram feitos em triplicata com resultados de três experimentos (3n) independentes.

4.7.3.1.3 Avaliação da quantificação de EROs intracelular por microscopia de fluorescência

A sonda DHE é amplamente utilizada para detecção do ânion superóxido presente no citosol devido à sua capacidade de difusão passiva para o interior das células e alta reatividade. No interior da célula, o DHE é oxidado pelo ânion superóxido, formando um produto intermediário, o 2-hidroxietídio (2-OHET⁺) que intercala com o DNA, levando à exibição de uma fluorescência vermelha. O 2-hidroxietídio é excitado em 500 nm e tem um espectro de emissão a 580 nm (WANG; ZOU, 2018; WOJTALA *et al.*, 2014).

Para detecção das espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular, as células foram plaqueadas em placas de 48 poços (5×10^4 células/mL) e incubadas na ausência ou presença de D-galactose e dos extratos EHLSM ou EHLST nas suas respectivas concentrações por 48 horas. Após este período, o meio foi retirado e adicionou-se o composto fluorescente DHE 5µM em cada poço da placa que fora levada à estufa por 40 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Passado este tempo, as

células foram lavadas com PBS e a leitura foi realizada pela técnica de microscopia de fluorescência (*Advanced inverted fluorescent microscope*: NIKON Eclipse Ti-E 200-S, NIKON®, Japão) para análise.

As imagens adquiridas foram analisadas utilizando o software ImageJ® versão 1.53t, quantificando a intensidade de fluorescência obtida pela emissão da sonda DHE. Todos os experimentos foram feitos em triplicata e os dados foram expressos pela intensidade de fluorescência normalizados pelo grupo Ctl com resultados de três experimentos (3n) independentes.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. (erro padrão da média) ou $\pm$ d.p. (desvio padrão). As análises estatísticas para comparação entre grupos foram feitas usando a análise de variância (ANOVA) “one-way” seguido do pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises realizadas foram calculadas pelo programa estatístico Graph Pad Prism versão 8.0®.

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 ESTUDOS QUÍMICOS

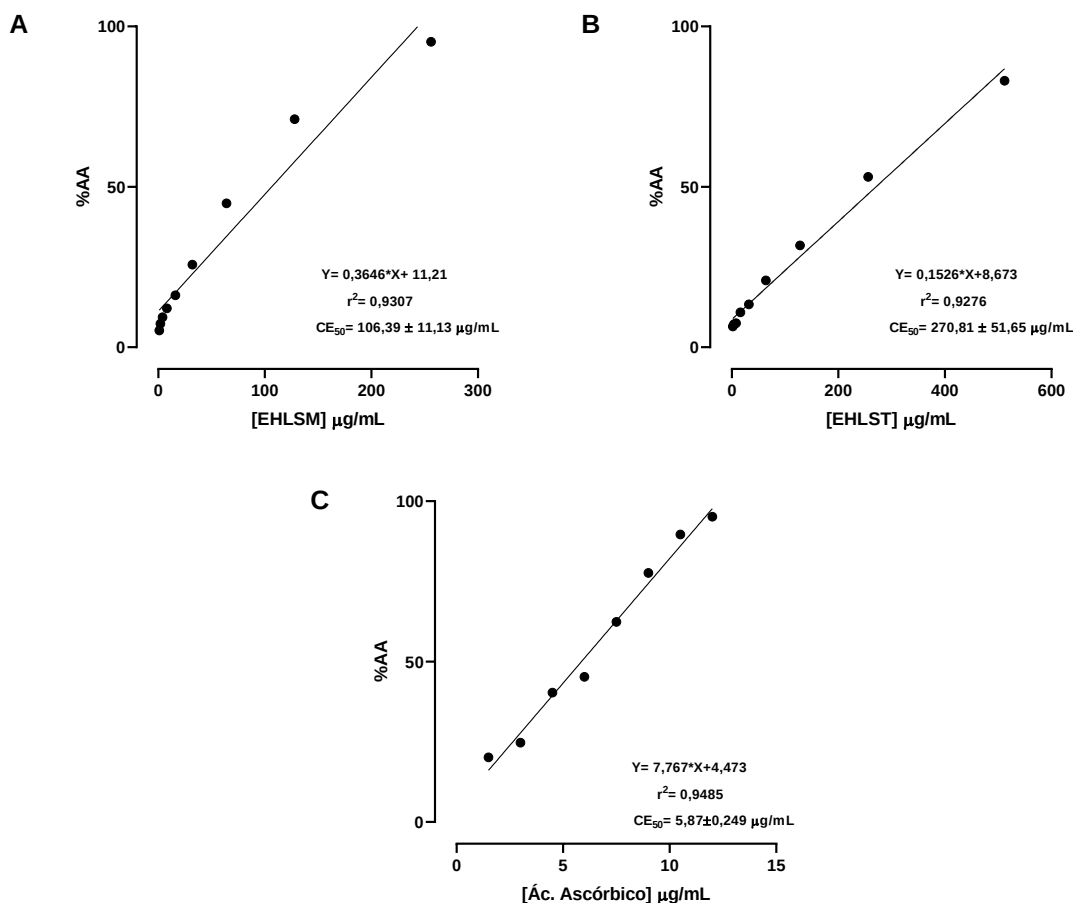
5.1.1 Determinação do conteúdo de fenólicos totais dos extratos EHLSM e EHLST

A curva de calibração obtida com diferentes concentrações de ácido gálico utilizando o reagente de FC apresentou a equação $y = 0,0068x - 0,0733$ com $R^2 = 0,9993$. De acordo com o método de FC, o conteúdo de fenólicos totais encontrado nas amostras em estudo foi de $1.485,6 \pm 0,51$ mg de EAG/100 g de extrato para o EHLSM e $2.810,6 \pm 0,80$ mg de EAG/100 g de extrato para o EHLST. Os dados foram expressos como média $\pm$ e. p. m. de experimentos realizados em triplicata.

5.1.2 Determinação da atividade sequestradora de radicais DPPH• dos extratos EHLSM e EHLST

A determinação da capacidade de sequestro do radical DPPH• (demonstrada como %AA) ocorreu de maneira dependente da concentração. O EHLSM apresentou uma $CE_{50} = 106,39 \pm 11,13$ $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6 A) e o EHLST apresentou uma $CE_{50} = 270,81 \pm 51,65$ $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6 B). O composto-padrão analisado (ácido ascórbico) teve sua $CE_{50} = 5,87 \pm 0,249$ $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6 C).

Figura 6 - Medida da capacidade sequestradora de radical livre DPPH• dos extratos EHLSM e EHLST



Curvas concentração-resposta da atividade de sequestro do radical DPPH• (% atividade antioxidante, %AA) para diferentes compostos. **A.** Extrato EHLSM (1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0 e 256,0 µg/mL). **B.** Extrato EHLST (2,0; 4,0; 8,0; 16,0; 32,0; 64,0; 128,0; 256,0 e 512,0 µg/mL). **C.** Ácido ascórbico (1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0; 10,5 e 12,0 µg/mL). Os resultados estão expressos como $CE_{50} \pm \text{d.p.}$ calculados de acordo com o método de regressão linear.

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

5.1.3 Análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência

A análise cromatográfica identificou e quantificou onze diferentes compostos fenólicos no EHLSM (Tabela 3) e doze diferentes compostos fenólicos no EHLST (Tabela 4) de acordo com a biblioteca de compostos padrões empregadas na metodologia. Os compostos fenólicos encontrados em maior quantidade no EHLSM foram a rutina (57,2 mg/g), o ácido salicílico (8,8 mg/g) e a quercetina (8,0 mg/g EHLSM) (Tabela 3) e no EHLST foram o ácido cafeico (4,2 mg/g), o ácido salicílico

(4,2 mg/g), o ácido 3,4-dihidroxibenzóico (3,2 mg/g) e a miricetina (3,2 mg/g) (Tabela 4).

Tabela 3 - Compostos fenólicos encontrados e quantificados no EHLSM por cromatografia líquida de alta eficiência

Composto fenólico	[mg do composto fenólico/g de extrato]
Rutina	57,2
Ácido salicílico	8,8
Quercetina	8,0
Ácido p-cumárico	3,8
Miricetina	2,8
Ácido 4-hidroxibenzóico	2,6
Ácido trans-cinâmico	2,4
Ácido sinápico	2,2
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	2,0
Catequina	1,8
Ácido siríngico	1,2

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Tabela 4 - Compostos fenólicos encontrados e quantificados no EHLST por cromatografia líquida de alta eficiência

Composto fenólico	[mg do composto fenólico/g de extrato]
Ácido cafeico	4,2
Ácido salicílico	4,2
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	3,2
Miricetina	3,2
Ácido vanílico	2,4
Catequina	1,2
Ácido 4-hidroxibenzóico	0,8
Ácido elágico	0,8
Ácido ferúlico	0,6
Ácido sinápico	0,6
Ácido p-cumárico	0,2
Ácido trans-cinâmico	0,2

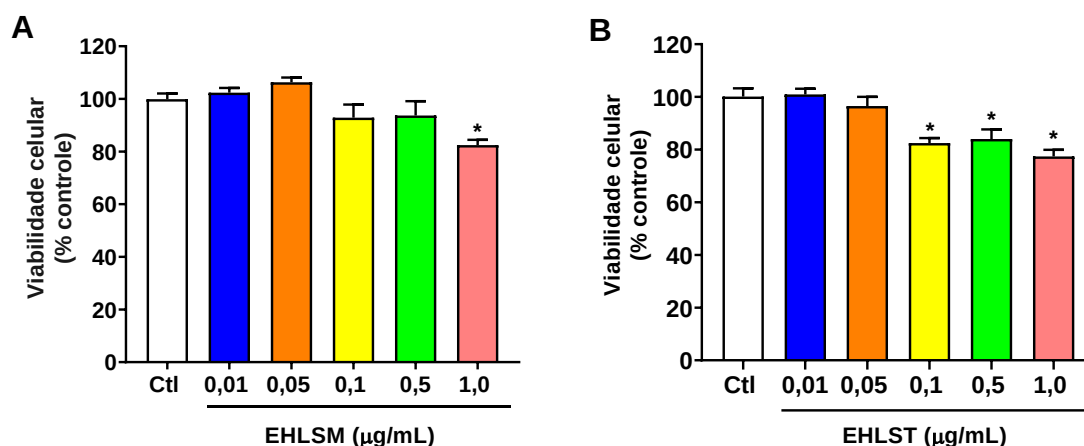
Fonte: Elaboração Própria, 2023.

5.2 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS *IN VITRO*

5.2.1 Avaliação dos efeitos dos extratos EHLSM e EHLST sobre a viabilidade celular em cultivo primário de RAECs

As RAECs foram incubadas por 48 horas com diferentes concentrações dos extratos EHLSM ou EHLST para determinar seus efeitos sobre a viabilidade celular. No grupo Basal tratado com EHLSM, apenas a concentração de 1,0 µg/mL reduziu a viabilidade celular ($82,45 \pm 1,98\%$; $p < 0,05$) em comparação ao seu Ctl ($99,88 \pm 2,18\%$) ($n=4$) (Figura 7 A). No grupo Basal tratado com EHLST, as concentrações de 0,1 µg/mL ($82,48 \pm 1,88\%$; $p < 0,05$), 0,5 µg/mL ($84,01 \pm 3,65\%$; $p < 0,05$) e 1,0 µg/mL ($77,41 \pm 2,47\%$; $p < 0,05$) mostraram reduzir a viabilidade celular quando comparadas ao Ctl ($100,10 \pm 3,15\%$) ($n=4$) (Figura 7 B).

Figura 7 - Viabilidade celular de RAECs tratadas com os extratos EHLSM ou EHLST no grupo Basal utilizando o ensaio de MTT



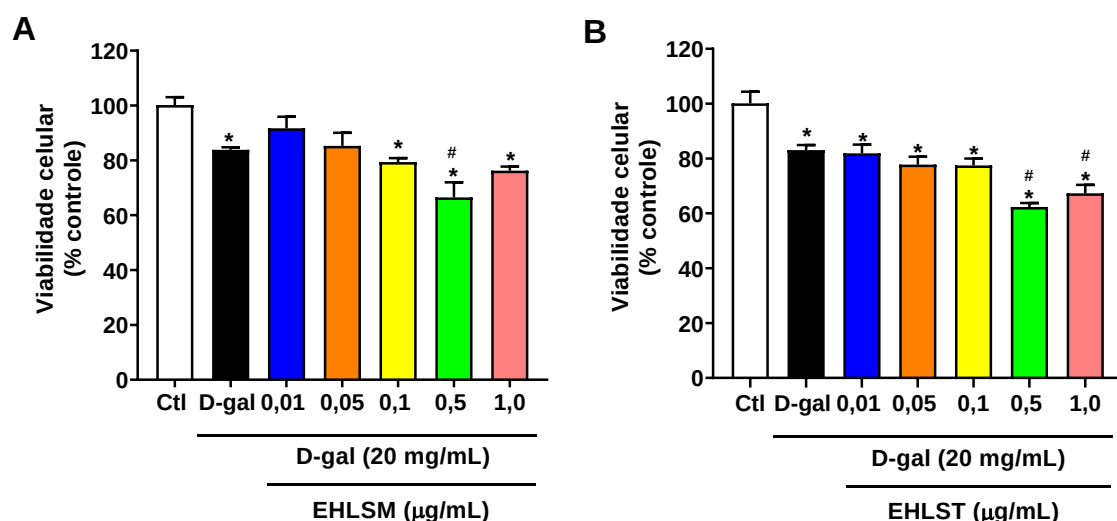
Viabilidade celular de RAECs tratadas com os extratos EHLSM ou EHLST em diferentes concentrações. **A.** Tratamento com o extrato EHLSM nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL. **B.** Tratamento com o extrato EHLST nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata com resultados de quatro experimentos independentes ($n=4$) e foram normalizados pelo grupo controle. Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. O teste ANOVA “one way” foi utilizado para análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ctl.

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Já no grupo D-Galactose tratado com EHLSM, o D-gal mostrou reduzir a viabilidade celular ($83,82 \pm 0,96\%$; $p < 0,05$) em comparação ao Ctl ($100,17 \pm$

2,84 %) (n=4) (Figura 8 A). Apenas na concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($66,49 \pm 5,48$ %; $p < 0,05$) houve redução da viabilidade celular quando comparado ao D-gal ($83,82 \pm 0,96$ %) (n=4) (Figura 8 A). No grupo D-Galactose tratado com EHLST, o D-gal também mostrou reduzir a viabilidade celular ($83,04 \pm 1,89$ %; $p < 0,05$) em comparação ao Ctl ($100,09 \pm 4,29$ %) (n=4) (Figura 8 B). Apenas as concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($62,35 \pm 1,41$ %; $p < 0,05$) e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ ($67,33 \pm 3,03$ %; $p < 0,05$) mostraram redução na viabilidade celular em comparação ao D-gal ($83,04 \pm 1,89$ %) (n=4) (Figura 8 B).

Figura 8 - Viabilidade celular de RAECs desafiadas com D-galactose e tratadas com os extratos EHLSM ou EHLST utilizando o ensaio de MTT



Viabilidade celular de RAECs desafiadas com D-galactose (20mg/mL) e tratadas com os extratos EHLSM ou EHLST em diferentes concentrações. **A.** Tratamento com o extrato EHLSM nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$. **B.** Tratamento com o extrato EHLST nas concentrações de 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$. Os ensaios foram realizados em triplicata com resultados de quatro experimentos independentes (n=4) e foram normalizados pelo grupo controle. Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. O teste ANOVA “one way” foi utilizado para análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ctl; # $p < 0,05$ vs. D-gal.

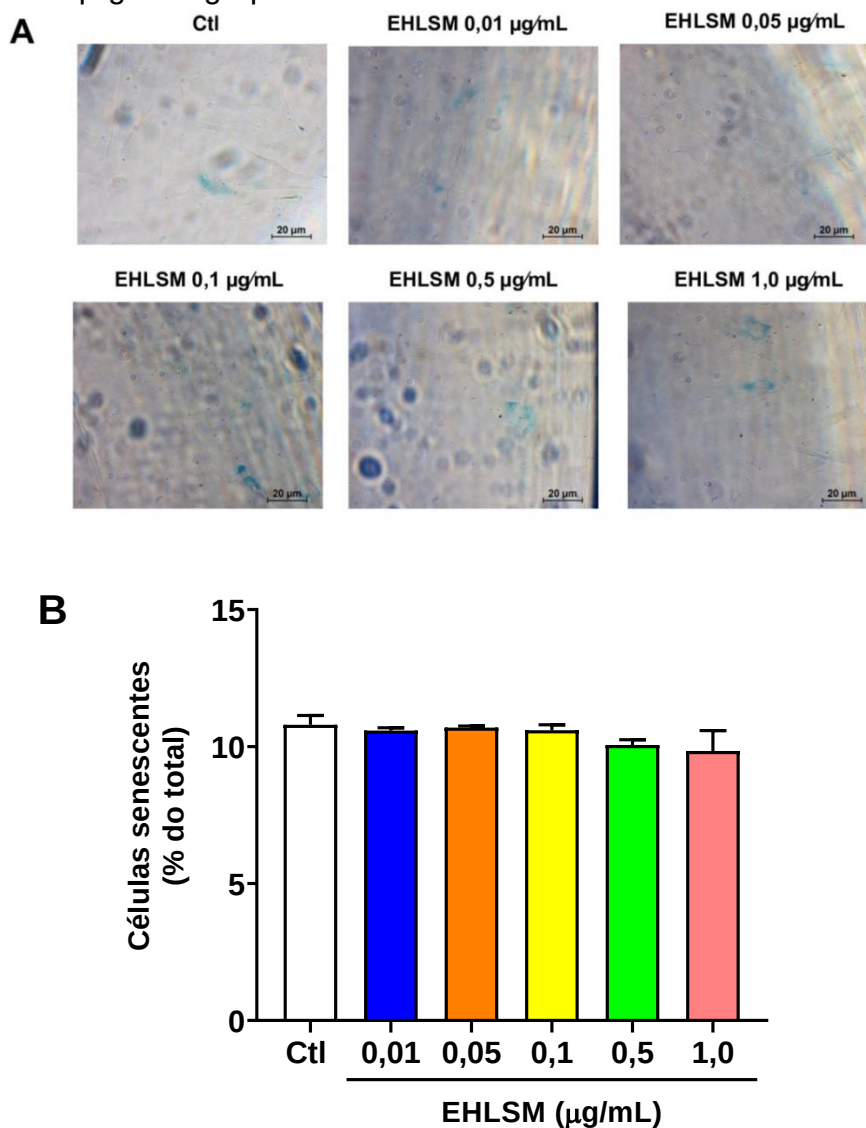
Fonte: Elaboração Própria, 2023.

5.2.2 Avaliação dos efeitos dos extratos EHLSM e EHLST sobre a senescência celular em cultivo primário de RAECs

As RAECs foram incubadas por 48 horas com diferentes concentrações dos extratos EHLSM ou EHLST para determinar seus efeitos sobre a senescência celular. No grupo Basal, nenhum dos extratos foi capaz de alterar o estado

senescente das células indicado pela atividade lisossomal da SA- β -gal ($p>0,05$) ($n=3$) (Figura 9 A-B) (Figura 10 A-B).

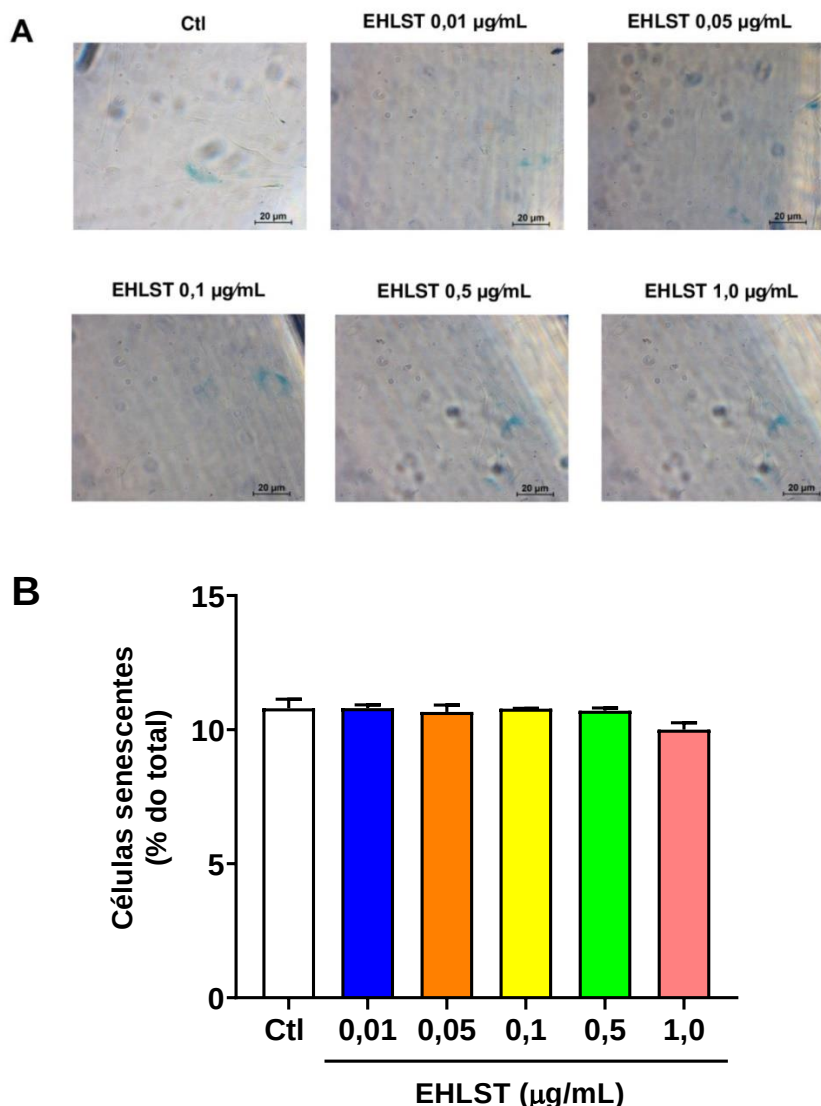
Figura 9 - Senescência celular de RAECs tratadas com o extrato EHLSM utilizando o ensaio de SA- β -gal no grupo Basal



Efeito da incubação das diferentes concentrações do extrato EHLSM (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) sobre a atividade da β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) em RAECs. **A.** Imagens representativas da coloração de SA- β -gal em RAECs em função do tratamento com o extrato EHLSM (objetiva de 20x). **B.** Percentual de células senescentes em função do tratamento com o extrato EHLSM. Os ensaios foram realizados em triplicata com resultados de três experimentos independentes ($n=3$). Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. O teste ANOVA “one way” foi utilizado para análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey.

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Figura 10 - Senescência celular de RAECs tratadas com o extrato EHLST utilizando o ensaio de SA- β -gal no grupo Basal



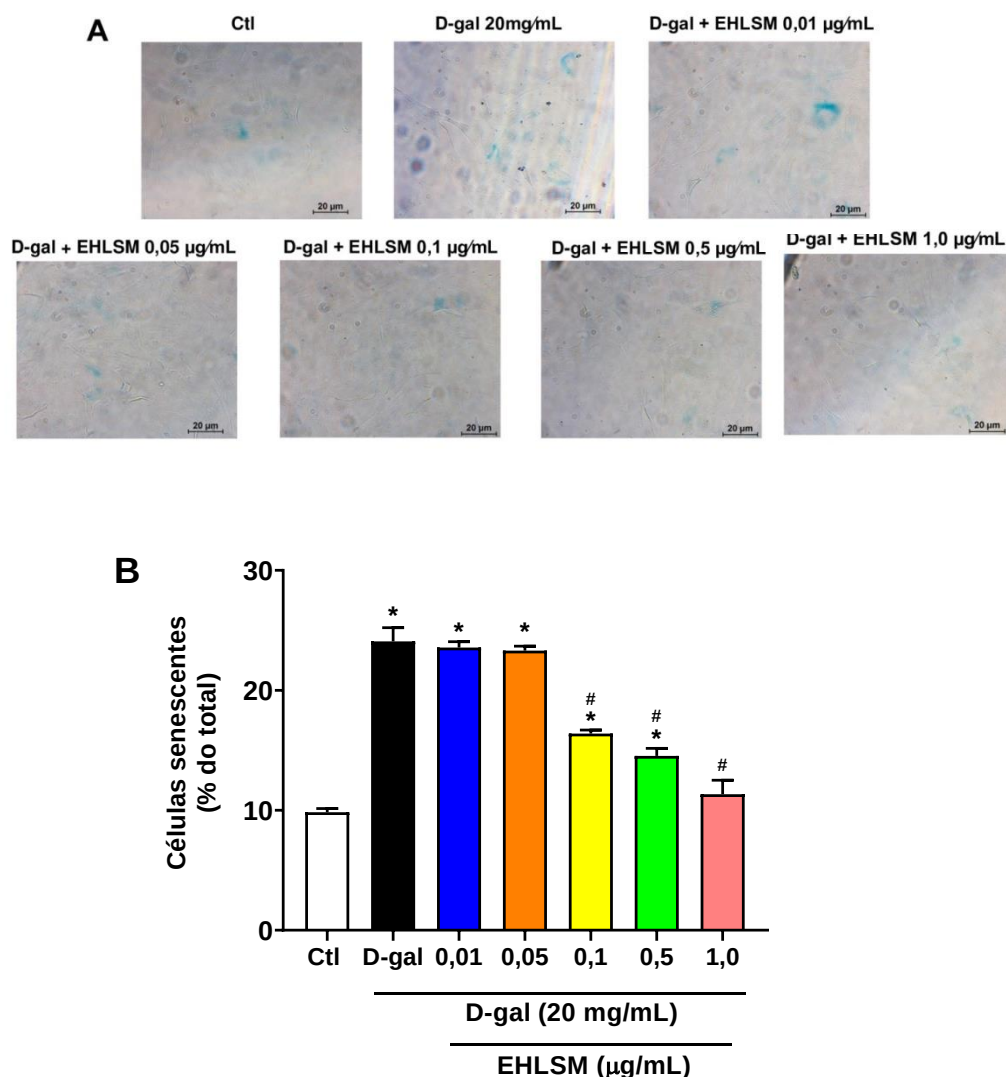
Efeito da incubação das diferentes concentrações do extrato EHLST (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL) sobre a atividade da β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) em RAECs. **A.** Imagens representativas da coloração de SA- β -gal em RAECs em função do tratamento com o extrato EHLST (objetiva de 20x). **B.** Percentual de células senescentes em função do tratamento com o extrato EHLST. Os ensaios foram realizados em triplicata com resultados de três experimentos independentes (n=3). Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. O teste ANOVA “one way” foi utilizado para análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey.

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Já no grupo D-Galactose tratado com extrato EHLST, o D-gal aumentou o percentual de células senescentes ($24,07 \pm 1,14$ %; $p < 0,05$) em comparação ao Ctl ($9,83 \pm 0,31$ %) (n=3) (Figura 11 A-B). As concentrações de 0,1 µg/mL ($16,39 \pm$

0,29 %; $p < 0,05$), 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($14,52 \pm 0,63$ %; $p < 0,05$) e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ ($11,33 \pm 1,16$ %; $p < 0,05$) diminuíram o percentual de células senescentes quando comparadas ao D-gal ($24,07 \pm 1,14$) ($n=3$) (Figura 11 A-B).

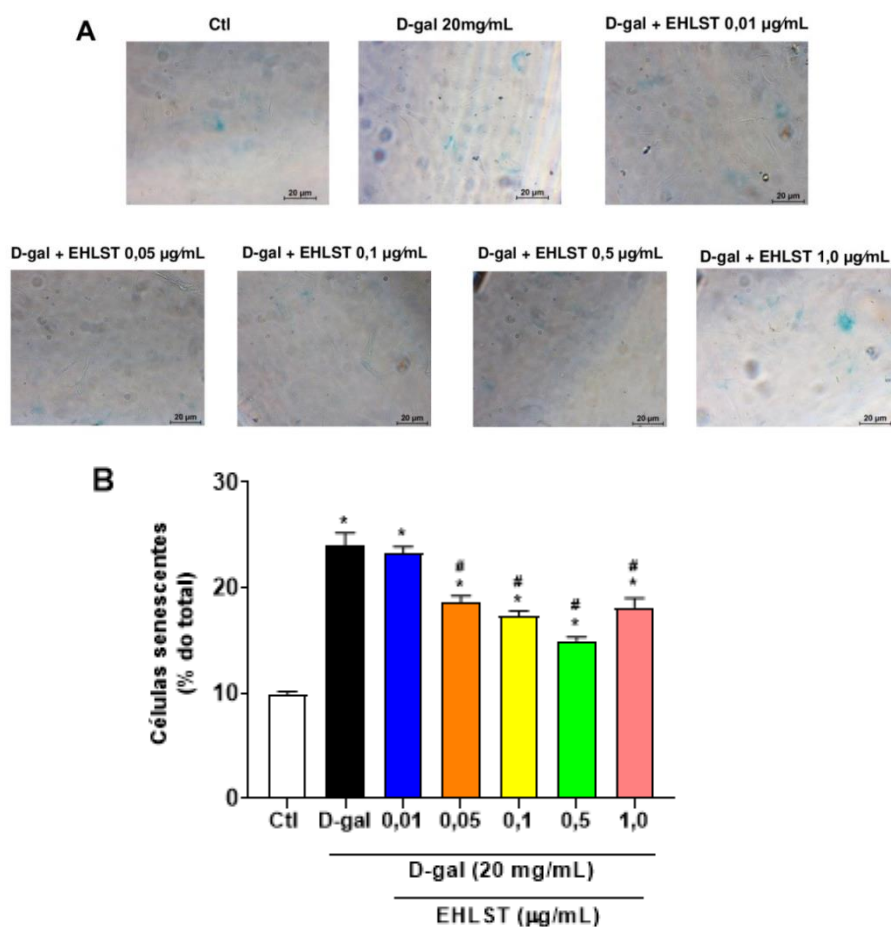
Figura 11 - Senescência celular de RAECs desafiadas com D-galactose e tratadas com o extrato EHLSM utilizando o ensaio de SA- β -gal



Efeito da incubação das diferentes concentrações do extrato EHLSM (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) sobre a atividade da β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) em RAECs desafiadas com D-galactose 20 mg/mL . **A.** Imagens representativas da coloração de SA- β -gal em RAECs em função do tratamento com o extrato EHLSM (objetiva de 20x). **B.** Percentual de células senescentes em função do tratamento com o extrato EHLSM. Os ensaios foram realizados em triplicata com resultados de três experimentos independentes ($n=3$). Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. O teste ANOVA “one way” foi utilizado para análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ctl; # $p < 0,05$ vs. D-gal. Fonte: Elaboração Própria, 2023.

No grupo D-Galactose tratado com o extrato EHLST, o D-gal também mostrou aumentar o percentual de células senescentes ($24,07 \pm 1,14$ %; $p < 0,05$) em comparação ao Ctl ($9,83 \pm 0,31$ %) ($n=3$) (Figura 12 A-B). No entanto, as concentrações de $0,05 \mu\text{g/mL}$ ($18,64 \pm 0,60$ %; $p < 0,05$), $0,1 \mu\text{g/mL}$ ($17,33 \pm 0,44$ %; $p < 0,05$), $0,5 \mu\text{g/mL}$ ($14,97 \pm 0,34$ %; $p < 0,05$) e $1,0 \mu\text{g/mL}$ ($18,14 \pm 0,86$ %; $p < 0,05$) diminuíram o percentual de células senescentes em comparação ao D-gal ($24,07 \pm 1,14$ %) ($n=3$) (Figura 12 A-B).

Figura 12 - Senescência celular de RAECs desafiadas com D-galactose e tratadas com o extrato EHLST utilizando o ensaio de SA- β -gal



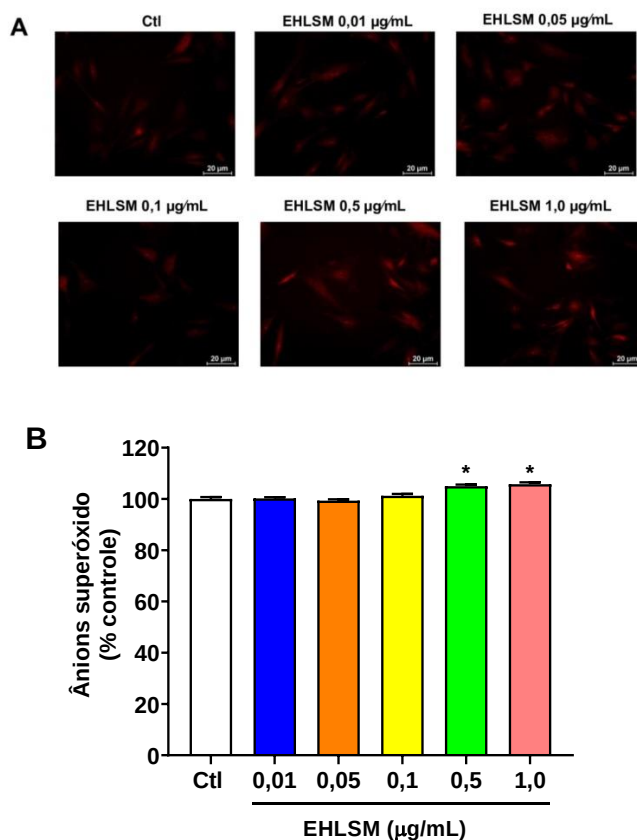
Efeito da incubação das diferentes concentrações do extrato EHLST (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) sobre a atividade da β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) em RAECs desafiadas com D-galactose 20 mg/mL. **A.** Imagens representativas da coloração de SA- β -gal em RAECs em função do tratamento com o extrato EHLST (objetiva de 20x). **B.** Percentual de células senescentes em função do tratamento com o extrato EHLST. Os ensaios foram realizados em triplicata com resultados de três experimentos independentes ($n=3$). Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. O teste ANOVA "one way" foi utilizado para análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ctl; # $p < 0,05$ vs. D-gal.

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

5.2.3 Avaliação dos efeitos dos extratos EHLSM e EHLST sobre a produção de ânions superóxido em cultivo primário de RAECs

As RAECs foram incubadas por 48 horas com diferentes concentrações dos extratos EHLSM ou EHLST para determinar seus efeitos sobre a produção de ânions superóxido pela detecção da fluorescência da sonda DHE por microscopia de fluorescência. No grupo Basal tratado com EHLSM, as concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($104,97 \pm 0,64 \%$; $p < 0,05$) e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ ($105,76 \pm 0,71 \%$; $p < 0,05$) aumentaram a produção de ânions superóxido em comparação ao Ctl ($100,00 \pm 0,70 \%$) ($n=3$) (Figura 13 A-B).

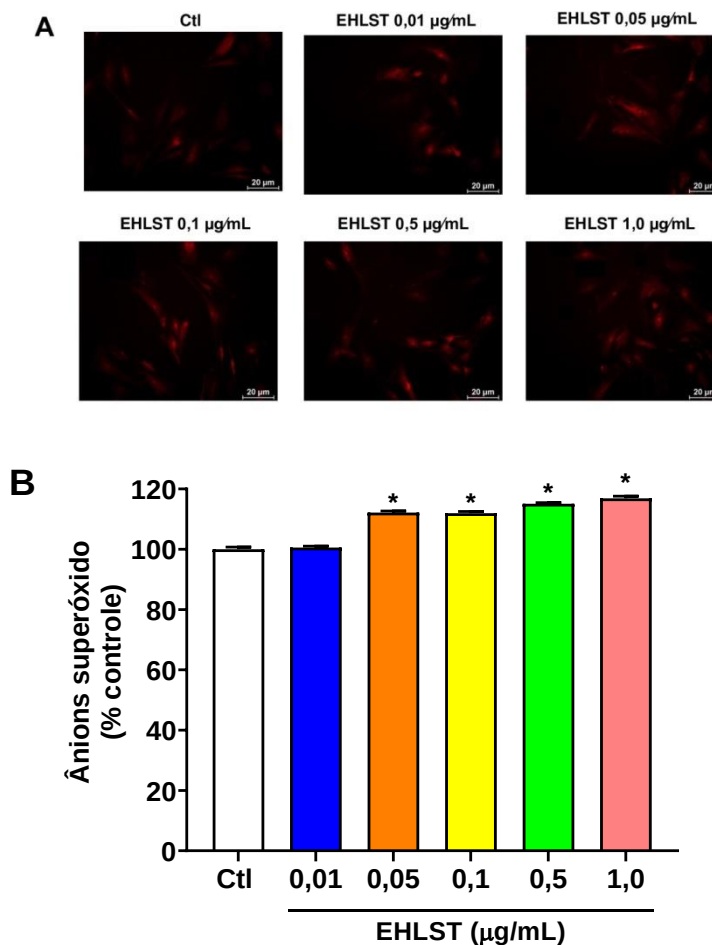
Figura 13 - Produção de ânions superóxido em RAECs tratadas com o extrato EHLSM no grupo Basal utilizando o ensaio de DHE



Efeito da incubação das diferentes concentrações do extrato EHLSM (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) sobre a intensidade de fluorescência emitida pelo DHE em RAECs. **A.** Imagens representativas da fluorescência emitida pelo DHE em função do tratamento com o extrato EHLSM em RAECs (objetiva de 20x). **B.** Quantificação da intensidade de fluorescência emitida pelo DHE em função do tratamento com o extrato EHLSM normalizado pelo controle. Os ensaios foram realizados em triplicata com resultados de três experimentos independentes ($n=3$). Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. O teste ANOVA "one way" foi utilizado para análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ctl. Fonte: Elaboração Própria, 2023.

No grupo Basal tratado com EHLST, as concentrações de 0,05 $\mu\text{g/mL}$ ($112,16 \pm 0,51 \%$; $p < 0,05$), 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ($111,96 \pm 0,55 \%$; $p < 0,05$), 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($115,10 \pm 0,33 \%$; $p < 0,05$) e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ ($116,87 \pm 0,72 \%$; $p < 0,05$) aumentaram a produção de ânions superóxido em comparação ao Ctl ($100,00 \pm 0,70 \%$) ($n=3$) (Figura 14 A-B).

Figura 14 - Produção de ânions superóxido em RAECs tratadas com o extrato EHLST no grupo Basal utilizando o ensaio de DHE

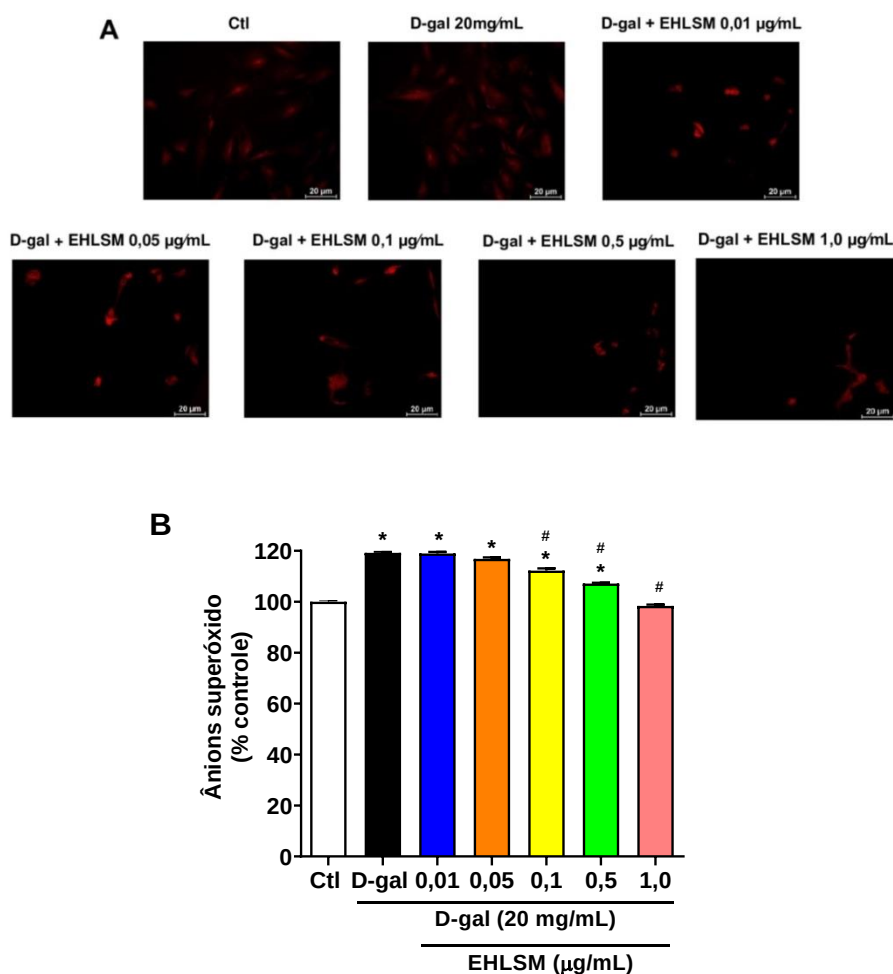


Efeito da incubação das diferentes concentrações do extrato EHLST (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) sobre a intensidade de fluorescência emitida pelo DHE em RAECs. **A.** Imagens representativas da fluorescência emitida pelo DHE em função do tratamento com o extrato EHLST em RAECs (objetiva de 20x). **B.** Quantificação da intensidade de fluorescência emitida pelo DHE em função do tratamento com o extrato EHLST normalizado pelo controle. Os ensaios foram realizados em triplicata com resultados de três experimentos independentes ($n=3$). Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. O teste ANOVA "one way" foi utilizado para análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ctl.

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Já no grupo D-Galactose tratado com EHLSM, o D-gal aumentou a produção de ânions superóxido ($119,18 \pm 0,46$ %; $p < 0,05$) em comparação ao Ctl ($100,00 \pm 0,34$ %) ($n=3$) (Figura 15 A-B). As concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ ($112,20 \pm 0,87$ %; $p < 0,05$), 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($107,15 \pm 0,29$ %; $p < 0,05$) e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ ($98,35 \pm 0,52$ %; $p < 0,05$) diminuíram a produção dos níveis de ânions superóxido nas células quando comparadas ao D-gal ($119,18 \pm 0,46$ %) ($n=3$) (Figura 15 A-B).

Figura 15 - Produção de ânions superóxido em RAECs desafiadas com D-galactose e tratadas com o extrato EHLSM utilizando o ensaio de DHE

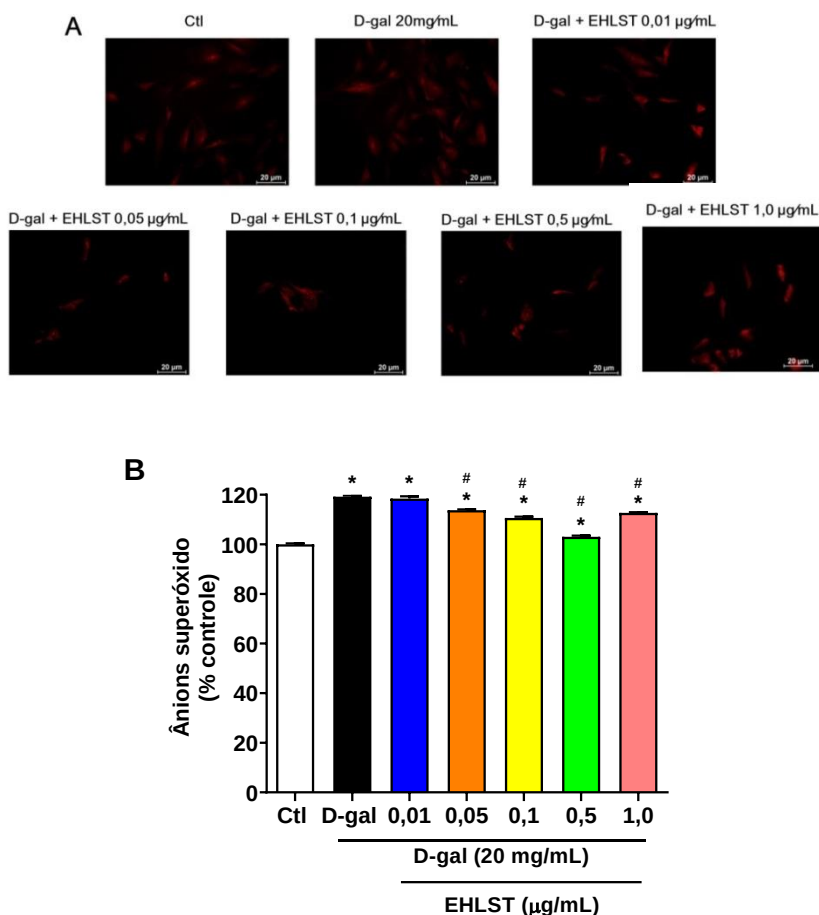


Efeito da incubação das diferentes concentrações do extrato EHLSM (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) sobre a intensidade de fluorescência emitida pelo DHE em RAECs desafiadas com D-galactose 20 mg/mL . **A.** Imagens representativas da fluorescência emitida pelo DHE em função do tratamento com o extrato EHLSM em RAECs (objetiva de 20x). **B.** Quantificação da intensidade de fluorescência emitida pelo DHE em função do tratamento com o extrato EHLSM normalizado pelo controle. Os ensaios foram realizados em triplicata com resultados de três experimentos independentes ($n=3$). Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. O teste ANOVA “one way” foi utilizado para análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ctl; # $p < 0,05$ vs. D-gal.

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

No grupo D-Galactose tratado com EHLST, o D-gal também mostrou aumentar a produção dos níveis de ânions superóxido ($119,18 \pm 0,46$ %; $p < 0,05$) em comparação ao Ctl ($100,00 \pm 0,34$ %) ($n=3$) (Figura 16 A-B). As concentrações de $0,05 \mu\text{g/mL}$ ($113,77 \pm 0,28$ %; $p < 0,05$), $0,1 \mu\text{g/mL}$ ($110,61 \pm 0,55$ %; $p < 0,05$), $0,5 \mu\text{g/mL}$ ($103,02 \pm 0,48$ %; $p < 0,05$) e $1,0 \mu\text{g/mL}$ ($112,69 \pm 0,23$ %; $p < 0,05$) reduziram a produção dos níveis de ânions superóxido em comparação ao D-gal ($119,18 \pm 0,46$ %) ($n=3$) (Figura 16 A-B).

Figura 16 - Produção de ânions superóxido em RAECs desafiadas com D-galactose e tratadas com o extrato EHLST utilizando o ensaio de DHE



Efeito da incubação das diferentes concentrações do extrato EHLST (0,01; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) sobre a intensidade de fluorescência emitida pelo DHE em RAECs desafiadas com D-galactose 20 mg/mL . **A.** Imagens representativas da fluorescência emitida pelo DHE em função do tratamento com o extrato EHLST em RAECs (objetiva de 20x). **B.** Quantificação da intensidade de fluorescência emitida pelo DHE em função do tratamento com o extrato EHLST normalizado pelo controle. Os ensaios foram realizados em triplicata com resultados de três experimentos independentes ($n=3$). Os dados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. O teste ANOVA “one way” foi utilizado para análise estatística, seguido do pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. Ctl; # $p < 0,05$ vs. D-gal.

Fonte: Elaboração Própria, 2023.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar os efeitos dos extratos hidroalcoólicos liofilizados da casca dos frutos de *Spondias mombin* Linn (cajá) (EHLSM) e *Spondias tuberosa* Arruda (umbu) (EHLST) em modelo de senescência induzida por D-Galactose em cultura primária de células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos (RAECs). O desenvolvimento deste estudo revelou que os extratos demonstram atividade antirradicalar e que o tratamento com os mesmos em RAECs foi capaz de diminuir o estado senescente das células bem como reduzir a produção de ânions superóxido, com redução de viabilidade nas maiores concentrações.

A senescência é uma condição na qual a célula para de se dividir, acumula danos intracelulares e resiste a apoptose; contudo, estas células ainda permanecem metabolicamente ativas. Em cultura de células é observável o aumento do tamanho do núcleo, de nucléolos, número de células multinucleadas, aparelho de Golgi proeminentes, número de vacúolos no retículo endoplasmático e citoplasma, número de microfilamentos citoplasmáticos e grande quantidade de lisossomos. Vários são os biomarcadores para detecção e identificação de células senescentes, dentre eles a atividade da β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) e o estresse oxidativo, mediante o aumento exacerbado das espécies reativas de oxigênio (BECK; HORIKAWA; HARRIS, 2020; OGRODNIK, 2021).

A busca por substâncias capazes de agir nas vias da senescência (em particular por diminuir o estresse oxidativo) vem se tornando cada vez mais frequentes, e a utilização de extratos de plantas também se demonstra eficaz e promissora, pois uma diversidade de moléculas contidas nesses extratos já possui atividade antioxidante e reguladora da senescência descritas na literatura quando testadas de forma isolada (MOADDEL *et al.*, 2022; SHEN *et al.*, 2022).

Nesse contexto de investigação científica, o Brasil como sendo um dos países de maior biodiversidade do mundo, e a região Nordeste como tendo um dos biomas de maior contingente de flora do país, vários são os trabalhos descrevendo o perfil fitoquímico e atividade biológica das mais variadas partes das plantas, incluindo neste rol o gênero *Spondias spp.* (BICAS *et al.*, 2011; GREGORIS *et al.*, 2013). Este gênero, todavia, ainda carece de estudos relacionados a outras atividades

biológicas, principalmente do que concerne ao escopo de investigação feito pelo nosso trabalho.

Sabe-se que compostos fenólicos são um conjunto de moléculas antioxidantes não-enzimáticas capazes de combater os radicais livres, que, por sua vez, em excesso, geram o processo denominado de estresse oxidativo. Estão largamente presentes em alimentos naturais, tais como frutos e folhas das mais variadas espécies de plantas (ZEB, 2020). Nos vegetais, estes compostos são metabólitos secundários provenientes das vias pentoses fosfato, chiquimato e fenilpropanóides, podendo ser encontrados na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Estes constituintes fenólicos fazem parte dos grupos de fitoquímicos de maior ocorrência, abrangendo desde moléculas simples até outras de alto grau de polimerização. Possuem considerável importância fisiológica e morfológica, desempenhando um importante papel no crescimento e reprodução, além de prover proteção contra patógenos e predadores. Nas frutas e legumes, estes compostos são responsáveis por características sensoriais como cor, sabor (adstringência) e aroma (BERNAL *et al.*, 2011; SOARES, 2002).

Como parte dos objetivos deste trabalho, foram realizados ensaios químicos para os dois extratos a fim de determinarmos o conteúdo de fenólicos totais, a atividade sequestradora de radicais livres e a identificação e quantificação destes compostos fenólicos. O conteúdo de fenólicos totais para o extrato EHLST (de $1.485,6 \pm 0,51$ mg EAG/100 g) foi alto quando comparado a outros estudos que utilizaram as folhas de *S. mombin* Linn. para extração por outros métodos, como extração com soxhlet, assistida por ultrassom, fluido supercrítico e até mesmo liofilização, tendo álcoois (etanol, metanol) como co-solventes em diferentes proporções (CABRAL *et al.*, 2016; CRISTOFOLI *et al.*, 2019).

Interessantemente um estudo feito por Pereira (2017) quantificou o conteúdo de fenólicos totais no extrato da casca de *S. mombin* Linn. em quantidade equivalente a 1.900 mg EAG/100 g. Já o conteúdo de fenólicos totais para o extrato EHLST (de $2.810,6 \pm 0,80$ mg EAG/100 g) também foi alto em comparação a outros estudos que utilizaram as folhas de *S. tuberosa* Arruda para extração por outros métodos (CORDEIRO *et al.*, 2018; UCHÔA *et al.*, 2015). Um estudo desenvolvido por Ribeiro e colaboradores (2019) cita o conteúdo de fenólicos totais em valores de

1.775 mg EAG/100g em extrato obtido da casca deste fruto. Sendo assim, nossos resultados obtidos neste ensaio se equiparam aos encontrados na literatura.

Após a avaliação de conteúdo de fenólicos totais, fomos analisar a capacidade sequestradora de radicais DPPH• para os extratos EHLSM e EHLST, que apresentaram uma CE₅₀ de 106,39 ± 11,13 µg/mL e 270,81 ± 51,65 µg/mL, respectivamente, e o ácido ascórbico, composto padrão-ouro em análises de atividade antioxidante, teve sua CE₅₀ = 5,87 ± 0,249 µg/mL. Os valores descritos na literatura para os extratos obtidos de *S. mombin* Linn. e *S. tuberosa* Arruda são bastante variáveis conforme o método de extração (aquoso, hidroalcoólico, hexânico), parte da planta utilizada (folhas, casca, polpa dos frutos) e até mesmo emprego da metodologia de análise e composto-padrão utilizado (COELHO, 2015; CRISTOFOLI *et al.*, 2019; OMENA *et al.*, 2012; PEREIRA, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2019; RUFINO *et al.*, 2010). Todavia nossos resultados demonstram que os extratos apresentam boa capacidade antirradicalar a partir da metodologia empregada.

Analizados o conteúdo de fenólicos totais e a capacidade sequestradora de radicais DPPH• dos extratos EHLSM e EHLST, fomos em busca de identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes nas amostras de acordo com a literatura que indica a presença de vários compostos fenólicos em extratos obtidos de *S. mombin* Linn. e *S. tuberosa* Arruda em várias partes das plantas (GUEDES *et al.*, 2020; REY-BLANES *et al.*, 2020; SIQUEIRA *et al.*, 2016) através da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência. Para o extrato EHLSM, a rutina (57,2 mg/g), o ácido salicílico (8,8 mg/g) e a quercetina (8,0 mg/g) foram os compostos fenólicos encontrados em maior quantidade. Obtivemos um resultado quantitativo de compostos fenólicos de valor não tão expressivo para o extrato EHLST, sendo os compostos ácido cafeico (4,2 mg/g), ácido salicílico (4,2 mg/g), ácido 3,4-dihidroxibenzóico (3,2 mg/g) e miricetina (3,2 mg/g) encontrados e quantificados em maior quantidade.

Destacamos que devem existir outros compostos fenólicos que não foram pesquisados entre os padrões disponíveis no momento da execução dos ensaios. Os compostos fenólicos encontrados em nosso estudo são também descritos em análises cromatográficas de outros trabalhos que fizeram esta pesquisa (GUEDES *et al.*, 2020; REY-BLANES *et al.*, 2020; RUFINO *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2016), corroborando com o método aplicado. Além do mais, os compostos fenólicos

encontrados em nossos extratos estão descritos na literatura não somente pelo potencial antioxidante que os mesmos apresentam, mas também por demonstrarem atividade antisenescente em cultura de células e *anti-aging* em modelo animal em estudos variados.

Compostos como rutina (LIU *et al.*, 2023; SAAFAN *et al.*, 2023), quercetina (EL-FAR *et al.*, 2020; LU *et al.*, 2006), ácido 3,4-dihidroxibenzóico (também conhecido como ácido protocatecuico) (KRZYSZTOFORSKA *et al.*, 2019), ácido caféico (KHOSHDEL *et al.*, 2022; SAENNO *et al.*, 2022), ácido elágico (RAHIMI; ASKARI; MOUSAVI, 2018, 2019) e ácido p-cumárico (DAROI; DHAGE; JUVEKAR, 2022; HUANG *et al.*, 2020) quando testados de forma isolada demonstraram atividade sobre a senescência celular e em animais envelhecidos através da utilização de D-galactose em diferentes escopos de publicação, o que valida ainda mais esse modelo, bem como a utilização de polifenóis para atenuar esses processos relacionados.

Outros compostos como catequina (LEE *et al.*, 2020; TANIGAWA *et al.*, 2014), miricetina (CHEN *et al.*, 2023; XIE *et al.*, 2023), ácido salicílico (CHEN *et al.*, 1995; MERINVILLE *et al.*, 2010), ácido trans-cinâmico (HSEU *et al.*, 2018), ácido sinápico (HUANG *et al.*, 2020), ácido siríngico (RYU; NA, 2018), ácido vanílico (OSORIO-PAZ *et al.*, 2023) e ácido ferúlico (HAHN *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2021) também demonstraram isoladamente atividade sobre a senescência celular por outros métodos de indução (como radiação ultravioleta ou incubação com H₂O₂) e em animais envelhecidos para estudos relacionados principalmente com o fotoenvelhecimento e envelhecimento cutâneo, geroprotetor e ortopédico por causar, dentre outros eventos, estresse oxidativo.

Outro composto encontrado em nossa análise cromatográfica foi o ácido 4-hidroxibenzóico. Estudos ainda seguem em andamento para entender melhor a atividade biológica deste componente, bem como de seus derivados. Todavia a literatura já relata que esse polifenol é capaz de agir como um antioxidante mitocondrial e como modulador da senescência celular em cultivo de fibroblastos, tendo seus estudos baseados em fotoenvelhecimento e envelhecimento cutâneo (por indução de estresse oxidativo via H₂O₂ e senescência replicativa), testatos de forma isolada ou presente em considerável quantidade em extratos de plantas (FERNANDES *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2018; WOO *et al.*, 2022). Esses dados

em conjunto oferecem subsídios para fundamentarmos que essas substâncias (que estão presentes em nossos extratos) agem em sinergismo, resultado nos dados obtidos em nossos experimentos com cultivo primário de RAECs sobre viabilidade celular, SA- β -gal e produção de ânions superóxido.

Uma das possíveis explicações para nossos resultados químicos obtidos deve-se aos processos empregados para extração dos constituintes: extração hidroalcoólica (etanol:água) seguida de liofilização. Tais processos são largamente empregados em estudos com frutos e cascas de frutos (MARQUES, 2008; SILVA, 2021). A técnica de extração hidroalcoólica é a mais empregada dos processos de extração sólido:líquido, utilizando-se da água como solvente universal e um álcool (podendo ser etanol, metanol etc) sob partições variadas para se extrair compostos fenólicos de interesse (NEVES *et al.*, 2020).

A liofilização é um processo no qual a água é sublimada pela passagem direta do estado sólido (gelo) para o vapor, omitindo assim o estado líquido, formando uma camada seca. É amplamente utilizado para a estabilização de alimentos de alta qualidade, materiais biológicos e produtos farmacêuticos, como proteínas, vacinas, bactérias e células de mamíferos. No processo, a qualidade do produto seco (propriedades biológicas, nutricionais e organolépticas) é mantida isso se deve ao fato de que o congelamento da água no material antes da liofilização inibe processos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Portanto, o sabor, o cheiro e o conteúdo de vários nutrientes não mudam (NOWAK; JAKUBCZYK, 2020).

Visto que os extratos EHLSM e EHLST demonstram positividade para compostos fenólicos e devido ao efeito antirradicalar observado, fomos investigar se os mesmos tinham influência na viabilidade celular, conseguiriam reduzir o estado de senescência celular em cultivo primário de RAECs (que tiveram a indução da senescência através da incubação com D-galactose) por reduzirem a exacerbação de produção de EROs.

Evidências têm demonstrado que o estresse oxidativo é um regulador chave da senescência celular, consequentemente levando ao envelhecimento (PORSH; SIMAS; GRANZOTI, 2019). Um modelo que vem sendo bastante estudado é o da incubação com D-galactose em cultura de células e a concentração efetiva estudada para se alcançar um estado de senescência em células endoteliais por aumento dos

níveis de EROs é de 20 mg/mL por um período de 48 horas (LEE *et al.*, 2020; QIAO *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2020).

Nossos ensaios com RAECs isoladas se basearam na divisão de dois grupos, onde o grupo Basal era tratado com os extratos EHLSM ou EHLST na ausência de D-gal e o grupo D-Galactose, no qual as células eram desafiadas com o açúcar e tratamento com os extratos EHLSM ou EHLST em diferentes concentrações. Dados corroboram com nossos experimentos, que mostram que a incubação de células com D-gal é capaz de reduzir a viabilidade celular (LEE *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2020). Xu e colaboradores (2021) mostraram que, ao analisar a viabilidade celular do extrato da semente de uva em células controle e senescentes por citometria de fluxo, 90% das células encontrava-se viável no grupo controle e 19% no grupo das células senescentes tratado com o extrato. Em nossos resultados observamos que tanto no grupo Basal quanto no grupo D-Galactose, os extratos EHLSM e EHLST reduziram a viabilidade celular apenas nas maiores concentrações estudadas. Todavia nas maiores concentrações dos extratos também obtivemos redução da senescência celular e de produção de ânions superóxido, sobretudo no grupo D-Galactose.

Fatores intrínsecos ao ensaio do MTT podem também estar relacionados, como a concentração de células no meio, osmolaridade, soro fetal bovino etc (RISS *et al.*, 2016). Além disso, se observa também que uma alta concentração de compostos fenólicos e tempo de exposição relativo pode induzir apoptose e isto pode ser indicativo de citotoxicidade (BARIZÃO *et al.*, 2021; MENG *et al.*, 2022). Estudos mais robustos como os de proliferação celular (ki-67), e de marcação dupla de viabilidade e apoptose (anexina V + iodeto de propídio) por citometria de fluxo ou o ensaio do MTT em diferentes tempos fazem parte do arcabouço experimental de estudos complementares nessa área (CHEN; ZHAO; YU, 2016; GHASEMI *et al.*, 2021; MEI *et al.*, 2019).

A partir da observação dos ensaios de viabilidade celular, fomos analisar se esses teriam a capacidade de reduzir a senescência celular pelo ensaio de SA- β -gal, considerado o marcador da senescência (DEBACQ-CHAINIAUX *et al.*, 2009). O ensaio da β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) é muito útil para testar se diferentes condições ou compostos podem induzir ou inibir o aparecimento de células senescentes. Além disso, pode ser usado para estudar o aparecimento de

células senescentes após diferentes tipos de estresse e para identificar os potenciais efeitos protetores antisenescente dos compostos (ITAHANA, K.; ITAHANA, Y.; DIMRI, 2013).

A observação da indução de senescência celular analisada em nosso estudo corrobora com a literatura, enfatizando que a D-galactose possui tal capacidade (HOU *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2017). Nossos resultados mostraram que a incubação com os extratos EHLSM e EHLST no grupo Basal não demonstraram alterar o estado senescente das células indicado pela atividade lisossomal da SA- β -gal inalterada naquela condição experimental. No grupo D-Galactose, o tratamento com os extratos EHLSM e EHLST foi capaz de reduzir o percentual de senescência celular induzido pelo D-gal, indicando que os mesmos demonstram atividade anti-senescente. A literatura mostra que estudos com extratos e compostos isolados reduzem o percentual de células senescentes, aliando-se ao ensaio da SA- β -gal, marcadores celulares complementares, como a avaliação do ciclo celular e das proteínas envolvidas nessa via, como as proteínas p53, p21, p16 e pRb (DU *et al.*, 2019; GUO; WU; XU, 2019; WANG *et al.*, 2020).

Seguindo esse método indutivo, e sabendo que os extratos diminuem a senescência celular no grupo D-Galactose e não alteram a condição basal de senescência, analisamos se esses extratos seriam capazes de reduzir o estresse oxidativo observado na senescência celular gerada neste modelo de indução e também sob condições onde não haveria exposição ao agente indutor da senescência. Para isto recorreremos ao ensaio do DHE para quantificarmos a produção de ânions superóxido.

Observamos que no grupo Basal, o tratamento com os extratos EHLSM e EHLST promoveram um aumento da produção de ânions superóxido. No grupo D-Galactose observamos que os extratos EHLSM e EHLST foram capazes de reduzir a produção de ânions superóxido aumentadas quando as células foram desafiadas com D-gal. Sendo assim, nossos resultados demonstram dois efeitos distintos no tratamento com os dois extratos sob a produção de ânions superóxido na ausência ou presença do agente indutor da senescência em cultivo primário de RAECs. Tais efeitos necessitam de maior esclarecimento a nível molecular.

A literatura mostra que produtos naturais (fenólicos ou de outras classes de metabólitos secundários), possuem capacidade de modular a síntese e/ou

degradação de EROs e ERNs para sinalização celular, seja em estado patológico ou saudável (CHEDEA *et al.*, 2021; RAJASHEKAR, 2023). Em estudos de várias linhas de pesquisa é demonstrado que os compostos fenólicos podem assumir papel dual de serem antioxidantes ou pró-oxidantes de acordo com estado de estresse ou injúria celular, tempo de exposição e concentração (GOUTZOURELAS *et al.*, 2014; SPISSU *et al.*, 2022). Contudo, vale destacar que na senescência o papel dos compostos fenólicos é de caráter antioxidante, debelando a produção excessiva das espécies radicalares e promovendo atenuação dos danos celulares (DU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2020).

Vários extratos tem capacidade antisenescente por redução do estresse oxidativo e que os compostos fenólicos presentes nestes extratos são os principais componentes responsáveis por debelarem as EROs. Tal redução reflete diretamente na atenuação da senescência celular (HUO *et al.*, 2018; MOADDEL *et al.*, 2022; SONG *et al.*, 2014; SHAKERI *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2021). Nossos dados refletem os primeiros indícios de estudos com extratos obtidos da casca do fruto de árvores do gênero *Spondias spp.*, evidenciando ainda mais a relação entre estresse oxidativo e senescência e a capacidade antioxidante de substâncias em refrear estes processos.

Contudo, estudos complementares são necessários para maiores investigações acerca da ação dos extratos EHLSM e EHLST sobre a regulação da expressão de enzimas antioxidantes (como SOD, CAT e regulação via Nrf2), investigação das vias endógenas de produção de EROs (como a NOX e mitocôndria, principalmente), além dos danos lipídicos e no material genético, investigação da via de transcrição (NFkB) de citocinas pró-inflamatórias (Tnf- α , IL-1 e IL-6) e análise do ciclo celular através das principais proteínas envolvidas nessa via (p16, p21, p53 e pRb).

Sendo assim, tendo nossas hipóteses postuladas e testadas, podemos inferir que os extratos EHLSM e EHLST demonstraram atividade antisenescente em RAECs desafiadas com D-galactose, e que esta atividade pode estar relacionada, dentre outros eventos, com a capacidade antioxidante dos extratos.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo demonstram que os extratos EHLSM e EHLST:

- São ricos em compostos antioxidantes com potente atividade antirradicalar
- Demonstram baixa toxicidade em cultivo primário de células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos.
- Diminuem o percentual de células senescentes frente ao modelo de indução de senescência por D-galactose em células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos
- Reduzem o estresse oxidativo ocasionado pelo modelo de indução de senescência D-galactose em células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos.

Referências

REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, M.; RAINER, P. P.; SEDEJ, S.; KROEMER, G. Hallmarks of cardiovascular ageing. **Nature Reviews Cardiology**. p. 1-24, 2023.

ACOSTA, P. B.; GROSS, K. C. Hidden sources of galactose in the environment. **European Journal of Pediatrics**. v. 154, suppl. 2, p. S87-S92, 1995.

AKAR, Z.; KÜÇÜK, M.; DOĞAN, H. A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 32, n. 1, p. 640-647, 2017.

ALMEIDA, A. J. P. O.; RIBEIRO, T. P.; MEDEIROS, I. A. Aging: Molecular pathways and implications on the cardiovascular system. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2017, p. 1-19, 2017.

ALMEIDA, A. J. P. O.; REZENDE, M. S. A.; DANTAS, S. H.; LIMA, S. L.; OLIVEIRA, J. C. P. L.; AZEVEDO, F. L. A. A.; ALVES, R. M. F. R.; MENEZES, G. M. S.; SANTOS, P. F.; GONÇALVES, T. A. F.; SCHINI-KERTH, V. B.; MEDEIROS, I. A. Unveiling the role of inflammation and oxidative stress on age-related cardiovascular diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2020, n. 1., p. 1-20, 2020.

ALMEIDA, A. J. P. O.; OLIVEIRA, J. C. P. L.; PONTES, L. V. S.; JÚNIOR, J. F. S.; GONÇALVES, T. A. F.; DANTAS, S. H.; FEITOSA, M. S. A.; SILVA, A. O.; MEDEIROS, I. A. ROS: Basic concepts, sources, cellular signaling, and its implications in aging pathways. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2022, p. 1-23, 2022.

ANGEL, K. S. O-D.; GUTIERREZ, H.; KONINGSBERG, M.; PÉREZ-VILLANUEVA, J.; LÓPEZ-DIAZGUERRERO, N. E. Exploring the fuzzy border between senolytics and senomorphics with chemioinformatics and systems pharmacology. **Biogerontology**. v. 23, p. 453-471, 2022.

ARANDA-RIVERA, A. K.; CRUZ-GREGORIO, A.; ARANCIBIA-HERNÁNDEZ, Y. L.; HERNAÁNDEZ-CRUZ, E. Y.; PEDRAZA-CHAVERRI, J. ROS and oxidative stress: An overview of basic concepts. v. 2, p. 437-478, 2022.

ARAUNA, D.; FURRIANCA, M.; ESPINOSA-PARRILLA, Y.; FUENTES, E.; ALARCÓN, M.; PALOMO, I. Natural bioactive compounds as protectors of mitochondrial dysfunction in cardiovascular diseases and aging. **Molecules**. v. 24, n. 3, p. 1-21, 2019.

AREFIN, S.; BUCHANAN, S.; HOBSON, S.; STEINMETZ, J.; ALSALHI, S.; SHIELS, P. G.; KUBLICKIENE, K.; STENVINKEL, P. Nrf2 in early vascular ageing: Calcification, senescence and therapy. **Clinica Chimica Acta**. v. 505, p. 108-118, 2020.

ARIAS, A.; FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T. Exploring the potencial of antioxidants from fruits and vegetabels and strategies for their recovery. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 77, n. 102974, p. 1-16, 2022.

ARRANHO, C. N. Parte III – Senescência celular: Mecanismos e abordagens terapêuticas. In: ARRANHO, C. N. **Relatórios de estágio e monografia intitulada “senescência celular: mecanismos e abordagens terapêuticas”**. Relatório de estágio (Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Portugal, p. 49-68, 2017.

ARYAL, S.; BANIYA, M. K.; DANEKHU, K.; KUNWAR, R.; KOIRALA, N. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. **Plants**. v. 8, n.4, p. 1-12, 2019.

ATANASOV, A. G.; ZOTCHEV, S. B.; DIRSCH, V. M.; TASKFORCE, T. I. N. P. S.; SUPURAN, C. Natural products in drug discovery: Advances and opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 20, p. 200-216, 2021.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants andagri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**. v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BALIYAN, S.; MUKHERJEE, R.; PRIYADARSHINI, A.; VIBHUTI, A.; GUPTA, A.; PANDEY, R. P.; CHANG, C-M. Determination of antioxidants by DPPH scavenging activity and quantitative phytochemical analysis of *Ficus religiosa*. **Molecules**. v. 27, n.4, p. 1-19, 2022.

BARBOSA, H. D. M. et al. Spondias tuberosa inner bark extract exert antidiabetic effects in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, p. 248–257, 2018.

BARIZÃO, É. O. et al. Phenolic composition of *Dipterix alata* Vogel pulp + peel and its antioxidant and cytotoxic properties. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 32, n. 12, p. 2206-2214, 2021.

BECK, J.; HORIKAWA, I.; HARRIS, C. Cellular senescence: Mechanisms, morphology, and mouse models. **Veterinary Pathology**. v. 57, n. 6, p. 747-757, 2020.

BERNAL, J.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Advanced analysis of nutraceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Nutraceutical Analysis**. v. 55, n. 4, p. 758-774, 2011.

BICAS, J. L. et al. Volatile constituents of exotic fruits from Brazil. **Food Research International**. v. 44, p. 1843-1855, 2011.

BIRCH, J.; BARNES, P. J.; PASSOS, J. F. Mitochondria, telomeres and cell senescence: Implications for lung ageing and disease. **Pharmacology and Therapeutics**. v.183, p. 34-49, 2018.

BIRD, I. M. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. **BMJ**. v. 299, n. 6702, p. 783-787, 1989.

BLOOM, S. I.; ISLAM, M. T.; LESNIEWSKI, L. A.; DONATO, A. J. Mechanisms and consequences of endothelial cell senescence. **Nature Reviews Cardiology**. v. 20, p. 38-51, 2023.

BORGHESAN, M.; HOOGAARS, W. M. H.; VARELA-EIRIN, M.; TALMA, N.; DEMARIA, M. A senescence-centric view of aging: Implications for longevity and disease. **Trends in Cell Biology**. v. 30, n. 10, p. 777-791, 2020.

BRASIL. RDC Nº 216 de 15 de setembro de 2004. Resolução de Diretoria Colegiada nº 216 de 15 de setembro de 2004. **Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação**: Diário Oficial da União, 2004.

CABRAL, B. et al. Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 26, n. 3, p. 304–311, 2016.

CALIXTO, J. B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 91, n. e20190105, suppl. 3, 2019.

CAO, P.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; FANG, Y.; LYU, J.; SHEN, Y. The age-related changes and differences in energy metabolism and glutamate-glutamine recycling in the d-gal-induced and naturally occurring senescent astrocytes in vitro. **Experimental Gerontology**. v. 118, p. 9-18, 2019.

CARRERA, C. E. A. Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. **Analytica Chimica Acta**. n. 732, p. 100-104, 2012.

CHAIB, S.; TCHKONIA, T.; KIRKLAND, J. L. Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. **Nature Medicine**. v. 12. p. 1556-1558, 2022.

CHALA, N.; MOIMAS, S.; GIAMPIETRO, C.; ZHANG, X.; ZAMBELLI, T.; EXARCHOS, V.; NAZARI-SHAFTI, T. Z.; POULIKAKOS, D.; FERRARI, A. Mechanical fingerprint of senescence in endothelial cells. **Nano Letters**. v. 21, n. 12, p. 4911-4920, 2021.

CHEDEA, V. S. et al. Antioxidant/Pro-oxidant actions of polyphenols from grapevine and wine by-products-base for complementary therapy in ischemic heart diseases. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**. v. 8, n. 750508, p. 1-23, 2021.

CHEN, B. et al. Human embryonic stem cell-derived exosomes promote pressure ulcer healing in aged mice by rejuvenating senescent endothelial cells. **Stem Cell Research & Therapy**. v. 10, n. 142, p. 1-17, 2019.

CHEN, M.; ZHAO, Z.; YU, S. Cytotoxicity and apoptotic effects of polyphenols from sugar beet molasses on colon carcinoma cells in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 17, n. 7, p. 1-10, 2016.

CHEN, Q.; FISCHER, A.; REAGAN, J. D.; YAN, L.-J.; AMES, B. N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 92, p. 4337-4341, 1995.

CHEN, R.; ZHANG, X.; ZHU, X.; WANG, C.; XU, W. Myricetin alleviated hydrogen peroxide-induced cellular senescence of nucleus pulposus cell through regulating SERPINE1. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**. v. 18, n. 143, p. 1-11, 2023.

CHEN, Z.; WU, Y.; LIN, Q.; CAI, J.; LIU, X.; LIANG, Y. Nutrition interventions of herbal compounds on cellular senescence. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2022, p. 1-17, 2022.

CHILDS, B. G.; DEURSEN, J. M. Senescent cells: a therapeutic target for cardiovascular disease. **Journal of Clinical Investigation**. v. 128, n. 4, p. 1217-1228, 2018.

CHILDS, B. G.; DURIK, M.; BAKER, D. J.; DEURSEN, J. M. Cellular senescence in aging and age-related disease: From mechanisms to therapy. **Nature Medicine**. v. 21, n. 12. p. 1424-1435, 2015.

COELHO, M. I. Z. **Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca do umbu (*Spondias tuberosa* Arruda) obtidos por diferentes técnicas**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina – Centro Tecnológico. Florianópolis. P.165. 2015.

CONSTATINO, S.; PANENI, F.; COSENTINO, F. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. **Journal of Physiology**. v.594, n. 8, p. 2061-2073, 2016.

CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro: Região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, 2018. (Série Biodiversidade; 51). Disponível em: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/fauna-e-flora/copy_of_LivroNordeste21122018.pdf>. Acesso em 07 de junho de 2023.

CORDEIRO, B. M. P. D. C. et al. Hexane extract from *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves has antioxidant activity and is an anti-Candida agent by causing mitochondrial and lysosomal damages. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

CRISTOFOLI, N. L. et al. Antioxidant and antimicrobial potential of cajazeira leaves (*Spondias mombin*) extracts. **Separation Science and Technology**. v. 54, n. 4, p. 580-590, 2019.

DAIBER, A.; STEVEN, S.; WEBER, A.; SHUVAEV, V. V.; MUZYKANTOV, V. R.; LAHER, I.; LI, H.; LAMAS, S.; MUNZEL, T. Targeting vascular (endothelial) dysfunction. **British Journal of Pharmacology**. v. 174, p. 1591-1619, 2017.

DAROI, P. A.; DHAGE, S. N.; JUVEKAR, A. R. p-Coumaric acid protects against D-galactose induced neurotoxicity by attenuating neuroinflammation and apoptosis in mice brain. **Metabolic Brain Disease**. v. 37, p. 2569-2579, 2022.

DAVALLI, P.; MITIC, T.; CAPORALI, A.; LAURIOLA, A.; D'ARCA, D. Ros, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.1, n. 1, p. 1-18, 2016.

DE TORRES, C.; DÍAZ-MAROTO, M. C.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; PÉREZ-COELLO, M. S. Effect of freeze-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. **Analytica Chimica Acta**. n. 660, p. 177-182, 2010.

DEBACQ-CHAINIAUX, F.; ERUSALIMSKY, J. D.; CAMPISI, J.; TOUSSAINT, O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. **Nature Protocols**. v. 4, p. 1798-1806, 2009.

DIGHE, P. A.; VISWANATHAN, P.; MRUTHUNJAYA, A. K.; SEETHARAM, R. N. Effect of bFGF on HLA-DR expression of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Stem Cells**. v. 8, n.1, p. 43-57, 2013.

DODOG, S.; CEPELAK, I.; PAVIK, I. Hallmarks of senescence and aging. **Biochemia Media**. v. 23, n. 3, p. 1-15, 2019.

DU, L.; CHEN, E.; WU, T.; RUAN, Y.; WU, S. Resveratrol attenuates hydrogen peroxide-induced aging through upregulation of autophagy in human umbilical vein endothelial cells. **Drug Design, Development and Therapy**. v. 13, p. 747-755, 2019.

EL-FAR, A. H. et al. Quercetin attenuates pancreatic and renal D-Galactose-induced aging-related oxidative alterations in rats. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 21, n. 4348, p. 1-23, 2020.

ELZI, D. J.; SONG, M.; SHIO, Y. Role of galactose in cellular senescence. **Experimental Gerontology**. v. 73, p. 1-4, 2016.

FERNANDES, C. et al. Targeting hydroxybenzoic acids to mitochondria as a strategy to delay skin ageing: An in vitro approach. **Molecules**. v. 27, n. 6183, p. 1-27, 2022.

FOLDVARI, M.; OGUEJIOFOR, C.; AFRIDI, S.; KUDEL, T.; WILSON, T. Liposome encapsulated prostaglandin E1 in erectile dysfunction: Correlation between *in vitro* delivery through foreskin and efficacy in patients. **Urology**. v. 52, n.5, p. 838-843, 1998.

FREITAS, M. A. et al. HPLC-DAD analysis and antimicrobial activities of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **3 Biotech**. v. 12, n. 1, p. 1-16, 2022.

GARCEZ, F. R. et al. Fenilpropanóides e outros constituintes bioativos de *Nectandra megapotamica*. **Química Nova**. v. 32, n. 2, p. 407-411, 2009.

GHASENI, M. et al. The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 12827, p. 1-30, 2021.

GOMES, J. M.; TERTO, M. V. C.; SANTOS, S. G.; SILVA, M. S.; TAVARES, J. F. Seasonal variations of polyphenols content, sun protection, factor and antioxidant activity of two Laminaceae species. **Pharmaceutics**. v. 13, n. 110, p. 1-16, 2021.

GOMES, M. S. et al. Anti-inflammatory and antioxidant activity of hydroethanolic extract of *Spondias mombin* leaf in na oral mucositis experimental model. **Archives in Oral Biology**. v. 11, n. 104664, p. 1-9, 2020.

GOUTZOURELAS, N. et al. Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. **Human and Experimental Toxicology**. v. 33, n. 11, p. 1099-1112, 2014.

GREGORIS, E.; LIMA, G. P. P.; FABRIS, S.; BERTELLE, M.; SICARI, M.; STEVANATO, R. Antioxidant properties of Brazilian tropical fruits by correlation between diferente assays. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 1-8, 2013.

GROOTAERT, M. O. J.; MOULIS, M.; ROTH, L.; MARTINET, W.; VINDIS, C.; BENNETT, M. R.; DE MEYER, G. R. Y. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**. v. 114, p. 622-634, 2018.

GUEDES, J. A. C. et al. Compative analyses of metabolic fingerprint integrated with cytotoxic activity and in silico approaches of the leaves extract of *Spondias mombin* L. and *Spondias tuberosa* Arr. Cam. from Northeast, Brazil. **Phytochemistry Letters**. v. 40, p.26-36, 2020.

GUO, F.; WU, R.; XU, J. Salicilin prevents TNF- α -induced cellular senescence in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Artificial cells, Nanomedicine, and Biothecnology**. v. 47, n. 1, p. 2618-2623, 2019.

GUO, J.; HUANG, X.; DOU, L.; YAN, M.; SHEN, T.; TANG, W.; LI, J. Aging and aging-related diseases: From molecular mechanisms to interventions and treatments. **Signal Transduction and Targeted Therapy**. v. 7, n. 391, p. 1-40, 2022.

HAHN, H. J. et al. Pretreatment of ferulic acid protects human dermal fibroblasts against ultraviolet A irradiation. **Annals of Dermatology**. v. 28, n. 6, p. 740-748, 2016.

HAMINIUK, C. W.; MACIEL, G. M.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; PERALTA, R. M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science + Technology**. v. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012.

HAN, X.; TAI, H.; WANG, X.; WANG, Z.; ZHOU, J.; WEI, X.; DING, Y.; GONG, H.; MO, C.; ZHANG, J.; QIN, J.; MA, Y.; HUANG, N.; XIANG, R.; XIAO, H. AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic

flux restauration and intracellular NAD⁺ elevation. **Aging Cells**. v. 15, p. 416-427, 2016.

HAN, Y.; KIM, S. Y. Endothelial senescence in vascular diseases: Current understanding and future opportunities in senotherapeutics. **Experimental & Molecular Medicine**. v. 55, p. 1-12, 2023.

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

HEISS, C.; SPYRIDOPOULOS, I.; HAENDELER, J. Interventions to slow cardiovascular aging: Dietary restriction, drugs and novel molecules. **Experimental Gerontology**.v. 109, p. 108-118, 2018.

HEMANTHAKUMAR, K. A.; FANG, S.; ANISIMOV, A.; MAYRANPAA, M. I.; MERVAALA, E.; KIVELA, R. Cardiovascular disease risk factors induce mesenchymal features and senescence in mouse cardiac endothelial cells. **eLife**. v. 10, n. e62678, p. 1-30, 2021.

HODGSON, R.; KENNEDY, B. K.; MASLIAH, E.; SCEARCE-LEVIE, K.; TATE, B.; VENKATESWARAN, A.; BRAITHWAITE, S. P. Aging: therapeutics for a healthy future. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 108, p. 453-458, 2020.

HONDA, S.; IKEDA, K.; URATA, R.; YAMAZAKI, E.; EMOTO, N.; MATOBA. Cellular senescence promotes endothelial activation through epigenetic alteration, and consequently accelerates atherosclerosis. **Scientific Reports**. v. 11, n. 14608, p. 1-11, 2021.

HOU, J.; YUN, Y.; XUE, J.; SUN, M.; KIM, S. D-galactose induces astrocytic aging and contributes to astrocytoma progression and chemoresistance via cellular senescence. **Molecular Medicine Reports**. v. 20, p. 4111-4118, 2019.

HSEU, Y-C. et al. *Trans*-cinnamic acid attenuates UVA-induced photoaging through inhibition of AP-1 activation and induction of Nrf2-mediated antioxidant genes in human skin fibroblasts. **Journal of Dermatological Science**. v. 90, n. 2, p. 123-134, 2018.

HUO, J. et al. Coenzyme Q10 Prevents Senescence and Dysfunction Caused by oxidative stress in vascular endothelial cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2018, p. 1-15, 2018.

HUANG, J. F. et al. Sinapic acid inhibits IL-1 β -induced apoptosis and catabolism in nucleus pulposus cells and ameliorates intervertebral disk degeneration. **Journal of Inflammation Research**. v. 13, p. 883-895, 2020.

HUANG, X. et al. p-Coumaric acid attenuates IL-1 β -induced inflammatory responses and cellular senescence in rat chondrocytes. **Inflammation**. v. 43, n. 2, p. 619-629, 2020.

HWANG, H. J.; KIM, N.; HERMAN, A. B.; GOROSPE, M.; LEE, J-S. Factors and pathways modulating endothelial cell senescence in vascular aging. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, n. 7, p. 1-15, 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mudança demográfica no Brasil no início do século XXI: Subsídios para as projeções da população**. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9197-mudanca-demografica-no-brasil-no-inicio-do-seculo-xxi.html>>. Acesso em 12 de julho de 2023.

ITAHANA, K.; ITAHANA, Y.; DIMRI, G. P. Colorimetric detection of senescence-associated β galactosidase. **Methods in Molecular Biology**. v. 965, p. 143-156, 2013.

JAUL, E.; BARRON, J. Age-related diseases and clinical and public health implications for the 85 years old and over population. **Frontiers in Public Health**. v. 5, n. 335, p. 1-7, 2017.

JIA, G.; AROOR, A. R.; JIA, C.; SOWERS, J. R. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**. v. 1865, n. 7, p. 1802-1809, 2019.

JUAN, C. A.; LASTRA, J. M. P.; PLOU, F. J.; PÉREZ-LEBEÑA, E. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: Outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 4642, p. 1-21, 2021.

KANE, A. E.; SINCLAIR, D. A. Sirtuins and NAD⁺ in the development and treatment of metabolic and cardiovascular diseases. **Circulation Research**. v. 123, p. 868-885, 2018.

KATSUUMI, G.; SHIMIZU, I.; YOSHIDA, Y.; MINAMINO, T. Vascular senescence in cardiovascular and metabolic diseases. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**. v. 5, p. 1-13, 2018.

KATUSIC, Z. S.; D'USCIO, L. V.; NATH, K. A. Vascular protection by tetrahydrobiopterin: progress and therapeutic prospects. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 30, n. 1, p. 48-54, 2009.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**. v. 36, p. 703-705, 2001.

KAUR, J.; FARR, J.N. Cellular senescence in age-related disorders. **Translational Research**. v. 226, p. 96-104, 2020.

KHAN, S. Y.; AWAD, E. M.; OSZWALD, A.; MAYR, M.; YIN, X.; WALTENBERGER, B.; STUPPNER, H.; LIPOVAC, M.; UHRIN, P.; BREUSS, J. M. Premature senescence of endothelial cells upon chronic exposure to TNF α can be prevented by N-acetyl cysteine and plumericin. **Scientific Reports**. v. 7, n. 39501, p. 1-13, 2017.

KHOSHDEL, F. et al. Impact of caffeic acid on the testicular damages in D-galactose-induced aging model in mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. v. 25, n. 10, p. 1190-1195, 2022.

KIRKLAND, J.; TCHKONIA, T. Cellular senescence: A translational perspective. **EBioMedicine**. v. 21, p. 21-28, 2017.

KRZYSZTOFORSKA, K. et al. Administration of protocatechuic acid affects memory and restores hippocampal and cortical serotonin turnover in rat model of oral D-galactose-induced memory impairment. **Behavioural Brain Research**. v. 368, n. 111896, p. 1-12, 2019.

KUMAR, A.; BANO, D.; EHNINGER, D. Cellular senescence in vivo: From cells to tissues to pathologies. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 190, p. 1-29, 2020.

LAGOUMTZI, S. M.; CHONDROGIANNI, N. Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 171, n. 1, p. 169-190, 2021.

LEE, G-H.; HOANG, T-H.; JUNG, E-S.; JUNG, S-J.; HAN, S-K.; CHUNG, M-J.; CHAE, S-W.; CHAE, H-J. Anthocyanins attenuate endothelial dysfunction through regulation of uncoupling of nitric oxide synthase in aged rats. **Aging Cell**. v. 19, n. e13279, p. 1-15, 2020.

LEE, S.; YU, J. S.; PHUNG, H. M.; LEE, J. G.; KIM, K. H.; KANG, K. S. Potential anti-skin aging effect of (-)-catechin isolated from the root bark of *Ulmus davidiana* var. *japonica* in tumor necrosis factor- α -stimulated normal human dermal fibroblasts. **Antioxidants**. v. 9, n. 981, p. 1-13, 2020.

LI, H.; YU, X.; MENG, F.; ZHAO, Z.; GUAN, S.; WANG, L. Ferulic acid supplementation increases lifespan and stress resistance via Insulin/IGF-1 signaling pathway in *C. elegans*. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 4279, p. 1-19, 2021.

LI, W.; QIN, L.; FENG, R.; HU, G.; SUN, H.; HE, Y.; ZHANG, R. Emerging senolytic agents derived from natural products. **Mechanisms of Ageing and Development**. v.181, p. 1-6, 2019.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G.; ARAN, L.; DELLA-MORTE, D.; GARGIULIO, G.; TESTA, G.; CACCIATORE, F.; BONADUCE, D.; ABETE, P. Oxidative stress, aging, and diseases. **Clinical Interventions in Aging**. v. 13, p. 757-772, 2018.

LIMA, G. P. P.; VIANELLO, F.; CORRÊA, C. R.; CAMPOS, R. A. S.; BORGUINI, M. G. Polyphenols in fruits and vegetables and Its effect on human health. **Food and Nutrition Sciences**. v. 5, p. 1065-1082, 2014.

LIU, H.; XU, Q.; WUFUER, H.; LI, Z.; SUN, R.; JIANG, Z.; DOU, X.; FU, Q.; CAMPISI, J.; SUN, Y. Rutin is a potent senomorphic agent to target senescent cells and can improve chemotherapeutic efficacy. **Aging Cell**. v. e13921, p. 1-20, 2023.

LIZARDO, D. Y.; LIN, Y. L.; GOKCUMEN, O.; ATILLA-GOKCUMEN, G. E. Regulation of lipids is central to replicative senescence. **Molecular BioSystems**. v. 13, p. 498-509, 2017.

LU, J.; ZHENG, Y-L.; LUO, L.; WU, D-M.; SUN, D-X.; FENG, Y-J. Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. **Behavioural Brain Research**. v. 171, p. 251-260, 2006.

LUO, Y.; ZOU, P.; ZOU, J.; WANG, J.; ZHOU, D.; LIU, L. Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK α dependent manner. **Experimental Gerontology**. v. 46, n. 11, p. 860-867, 2011.

MACHADO, M. D.; CARVALHO, P. C. L.; VAN DEN BERG, C. Domestication, hybridization, speciation, and the origins of an economically important tree crop of *Spondias* (Anacardiaceae) from the Brazilian Caatinga dry forest. **Neodiversity**. v. 8, n. 1, p. 8–49, 2015.

MARCHI, L. B. **Avaliação da atividade antioxidante e atividade antimicrobiana extratos de cascas de romãs (*Punica granatum* L.) submetidas a dois diferentes métodos de secagem**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Maringá. Maringá, p. 41. 2014.

MARQUES, L. G. **Liofilização de frutas tropicais**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Exatas e da Tecnologia. São Carlos. p. 293. 2008.

MEI, Y. et al. In vitro photodynamic therapy of endothelial cells using hematoporphyrin monomethyl ether (Hemoporphin): Relevance to treatment of port wine stains. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 27, p. 1-15, 2019.

MEIRELES, B. R. L. A.; ALCÂNTARA, M. A.; POLARI, I. L. B.; SOUZA, A. G.; SANTOS, N. A.; GRISI, C. V. B.; CORDEIRO, A. M. T. M. Catole coconut (*Syagrus cearensis*) oil: physicochemical characterization and thermo-oxidative stability by TG/DTG/DTA and Rancimat. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 147, n. 5, p. 3591-3598, 2021.

MENESES, V. P.; SILVA, J. R. A.; NETO, J. F.; ROLIM, H. O.; ARAÚJO, A. L. M.; LIMA, P. S. E. Subprodutos de frutas tropicais desidratados por secagem convectiva. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 13, n. 4, p. 472-482, 2018.

MENG, D-D. et al. Endothelial cells promote the proliferation and migration of Schwann cells. **Annals of Translational Medicine**. v. 10, n. 2, p. 1-10, 2022.

MERINVILLE, E.; BYRNE, A. J.; RAWLINGS, A. V.; MUGGLETON, A. J.; LALOEUF, A. C. Three clinical studies showing the anti-aging benefits of sodium salicylate in human skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**. v. 9, p. 174-184, 2010.

MISTRIOTIS, P.; ANDREADIS, S. T. Vascular aging: Molecular mechanisms and potential treatments for vascular rejuvenation. **Ageing Research Reviews**. v. 17, p. 1-57, 2017.

MOADDEL, R. et al. Identification of gingerone A as a novel senolytic compound. **PloS One**. v. 17, n. 3, p. 1-10, 2022.

MONTREAU, F. Sur le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins par la méthode Folin-Ciocalteu. **Connaissance de la Vigne et du Vin**. v. 24, p. 397-404, 1972.

MORAVA, E. Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency: Review and outlook for a novel treatable CDG. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 112, n. 4, p. 275-279, 2014.

NASIRIAN, F.; MENICHETTI, G. Molecular interaction networks and cardiovascular disease risk: The role of food bioactive small molecules. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**. v. 43, n. 6, p. 813-823, 2023.

NEVES, N. C. V. et al. Optimization of phenolic compounds extraction from *Campomanesia lineatifolia* leaves. **Rodriguésia**. v. 71, p. 1-9, 2020.

NOWAK, D.; JAKUBCZY, E. The Freeze-Drying of Foods—The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. **Foods**. v. 9, n. 10, p. 1-27, 2020.

NWORU, S. C.; AKAH, P. A.; OKOYE, F. B. C.; TOUKAM, D. K.; UDEH, J.; ESIMONE, C. O. The leaf extract of *Spondias mombin* L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis factor- α and nitric oxide (NO). **Journal of Immunotoxicology**. v. 8, n. 1, p. 10-16, 2011.

OGRODNIK, M. Cellular aging beyond cellular senescence: Markers of senescence prior to cell cycle arrest *in vitro* and *in vivo*. **Aging Cell**. v. 20, n. 4, p. 1-19, 2021.

OLIVEIRA, A. C.; et al. Envelhecimento vascular e rigidez arterial. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 119, n. 4, p. 604-615, 2022.

OLIVEIRA, C. et al. Hydroxybenzoic acid derivatives as dual-target ligands: Mitochondriotropic antioxidants and cholinesterase inhibitors. **Frontiers in Chemistry**. v. 6, n. 126, p. 1-17, 2018.

OMENA, C. M. B. et al. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities in fruits. **Food Research International**. v. 49, p. 334-344, 2012.

OMOBOYOWA, D. A. et al. Antidiabetes study of *Spondias mombin* (Linn) stem bark fractions in high-sucrose diet-induced diabetes in *Drosophila melanogaster* . **Journal of Taibah Medical Sciences**. v. 18, n. 4, p. 663-675, 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Departamento de Economia e Assuntos Sociais. **World Population Prospects 2022: Summary of Results**. New York, 2022. Disponível em: <
https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf>. Acesso em 12 de julho de 2023.

OWENS, W. A.; WALASZCZYK, A.; SPYRIDOPOULOS, Y.; DOOKUN, E.; RICHARDSON, G.; D. Senescence and senolytics in cardiovascular disease: Promise and potential pitfalls. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 198, n. 111540, p. 1-18, 2021.

OSORIO-PAZ, I.; VALLE-JIMÉNEZ, X.; BRUNAUER, R.; ALAVEZ, S. Vannilic acid improves stress resistance and substantially extends life span in *Caenorhabditis elegans*. **The Journals of Gerontology**. v. 78, n. 7, p. 1100-1107, 2023.

PAN, Z.; DONG, H.; HUANG, N.; FANG, J. Oxidative stress and inflammation regulation of sirtuins: New insights into common oral diseases. **Frontiers in Physiology**. v. 13, p. 1-20, 2022.

PANENI, F.; CANESTRO, C. D.; LIBBY, P.; LUSCHER, T. F.; CAMICI, G. G. The aging cardiovascular system: understanding it at the cellular and clinical levels. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 69, n. 15, p. 1952-1967, 2017.

PANTELIS, P.; et al. The dual role of oxidative-stress-induced autophagy in cellular senescence: Comprehension and therapeutic approaches. **Antioxidants**. v. 12, n. 1, p. 1-18, 2023.

PAPACONSTANINOU, 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. 1383, p. 1-25, 2019.

PARK, J.; SHIN, D. W. Senotherapeutics and their molecular mechanism for improving aging. **Biomolecules & Therapeutics**. v. 30, n. 6, p. 490-500, 2022.

PEREIRA, D. V. C. **Composição fenólica e atividade antioxidante de cajá (*Spondias mombin*)** nativo do Distrito Federal. TCC (Graduação em Farmácia). Universidade de Brasília – Faculdade de Ceilândia. Brasília. p. 37. 2017.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; DOS SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**. ISBN 978-85-85658-70-0. p. 1-5, 2017.

POLE, A.; DIMRI, M.; DIMRI, G. P. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. **AIMS Molecular Science**. v. 3, n. 3, p. 300-324, 2016.

PORSH, L.; SIMAS, L. A. W.; GRANZOTI, R. O. C. Estresse oxidativo e o seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica **Brazilian Journal of Natural Sciences**. v. 2, n. 2, p. 80-85, 2019.

PRASAD, K. N.; YANG, B.; YANG, S.; CHEN, Y.; ZHAO, M.; ASHRAF, M.; JIANG, Y. Identification of phenolic compounds and appraisal of antioxidant and antityrosinase activities from litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) seeds. **Food Chemistry**. v. 116, n. 1, p. 1-7, 2009.

QIAO, J.; ZHAO, D.; LIU, M.; SUI, B.; LIU, Y.; XING, X. Study on improvement effects of total ginsenosides on D-galactose induced PC 12 cell senescence and its mechanism. **China Pharmacy**. v. 12, p. 2993-2999, 2020.

RAHIMI, V. B.; ASKARI, V. R.; MOUSAVI, S. H. Ellagic acid reveals promising anti-aging effects against D-galactose-induced aging on human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y: A mechanism study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 108, p. 1712-1724, 2018.

RAHIMI, V. B.; ASKARI, V. R.; MOUSAVI, S. H. Ellagic acid dose and time-dependently abrogates D-galactose-induced animal model of aging: Investigating the role of PPAR- γ . **Life Sciences**. v. 232, p. 1-17, 2019.

RAJ, V.; CHARLES, S.; GOENKA, L.; RAMAMOORTHY, T.; MARIMUTHU, C.; EMMANUEL, C.; MALA, K.; KUMARASAMY, S.; GEORGE, M. Avaliação da senescência de células sanguíneas mononucleares periféricas e na disfunção endotelial entre adultos com alto risco cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 116, n. 1, p. 37-47, 2021.

RAJASHEKAR, C. B. Dual role of plant phenolic compounds as antioxidants and prooxidants. **American Journal of Plant Sciences**. v. 14, p. 15-28, 2023.

RAY, P. D.; HUANG, B-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular signaling**. v. 24, n. 5, p. 1-25, 2012.

REY-BLANES, C. et al. In vitro evaluation of the antitumoral and antiangiogenic effects of extracts from *Spondias mombin* L. leaves. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 131, n. June, p. 1–9, 2020.

REZENDE, M. S. A.; ALMEIDA, A. J. P. O.; GONÇALVES, T. A. F.; AZEVEDO, F. L. A. A.; DANTAS, S. H.; SILVA, S. L.; SOARES, E. M. C.; ALVES, H. F.; LIMA, T. T.; JÚNIOR, J. F. S.; GUERRA, R. R.; ARAÚJO, I. G. A.; MEDEIROS, I. A. D-(+)-Galactose-induced aging: A novel experimental model of erectile dysfunction. **PLoS ONE**. v. 14, n. 4, p. 1-16, 2021.

RIBEIRO, L. O. et al. Nutrients and bioactive compounds of pulp, peel and seed from umbu fruit. **Ciência Rural**. v. 49, n. 4, p. 1-8, 2019.

RISS, T. L. et al. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**. p. 1-25, 2016.

RUFINO, M. S. M. Bioactive compounds and antioxidante capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**. v. 121, p. 996-1002, 2010.

RYU, J. Y.; NA, E. J. MMP expression alteration and MMP-1 production control by syringic acid via AP-1 mechanism. **Biomedical Dermatology**. v. 2, n. 15, p. 1-10, 2018.

SAAFAN, S. M. et al. Rutin attenuates D-galactose-induced oxidative stress in rats' brain and liver: Molecular docking and experimental approaches. **Food & Function**. v. 14, p. 5728-5751, 2023.

SAENNO, R. et al. Caffeic acid alleviates memory and hippocampal neurogenesis deficits in aging rats induced by D-galactose. **Nutrients**. v. 14, n. 2169, p. 1-13, 2022.

SALLA, S.; SUNKARA, R.; OGUTU, S.; WALKER, L. T.; VERGHESE, M. Antioxidant activity of papaya seed extracts against H₂O₂ induced oxidative stress in HepG2 cells. **LWT-Food Science and Technology**. v. 66, p. 293-297, 2016.

SAMEH, S.; AL-SAYED, E.; LABIB, M. R.; SINGAB, A. N. Genus *Spondias*: A phytochemical and pharmacological review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2018, p. 1-13, 2018.

SANTOS, A. T. L. et al. Antibacterial and antioxidante potential of *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) extracts. **Research, Society and Development**. v. 9, n. 12, p. 1-21, 2020.

SHAKERI, H.; GEVAERT, A. B.; SCHRIJVERS, D. M.; DE MEYER, G. R. Y.; DE KEULENAER, G. W.; GUNS, P. J. D. F.; LEMMENS, K.; SEGERS, V. F. Neuregulin-1 attenuates stress-induced vascular senescence. **Cardiovascular Research**. v. 114, p. 1041-1051, 2018.

SHEN, J. et al. Dietary phytochemicals that can extend longevity by regulation of metabolism. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 77, p. 12-19, 2022.

SHEN, Y. et al. Glutamine synthetase plays a role in D-galactose-induced astrocyte aging in vitro and in vivo. **Experimental Gerontology**. v. 58, p. 166-173, 2014.

SHI, J.; YU, J.; POHORLY, J.; YOUNG, J.; BRYAN, M.; WU, Y.; CANADA, A-F. Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. **Journal of Food Agriculture & Environment**. v. 104, n.3, p. 42-47, 2003.

SHIELDS, H. J. et al. Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: A comprehensive review of comparative and experimental studies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v. 9, p. 1-27, 2021.

SIES, H. et al. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Molecular Cell Biology**. v. 23, p. 499-515, 2022.

SILVA, A. et al. Antiviral activities of extracts and phenolic componentes of two *Spondias* species against dengue virus. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. v. 17, n. 4, p. 406-413, 2011.

SILVA, A. R. A. D. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**. v. 50, n. 6, p. 740–746, 2012.

SILVA, B. S. R. **Avaliação da segurança e eficácia *in vitro* do extrato hidroalcoólico liofilizado da casca de jaboticaba (*Plinia jaboticaba*)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara. p. 105. 2021.

SILVA, T. S. J. et al. *Spondias mombin*: Quality control and anti-inflammatory activity in human neutrophils. **Journal of Herbal Medicine**. v. 24, n. 3. 2020.

SINGH, C., K.; CHHABRA, G.; NDIAYE, M., A.; GARCIA-PETERSON, L. M.; MACK, N. J.; AHMAD, N. The role of sirtuins in antioxidant and redox signaling. **Antioxidant Redox Signaling**. v. 28, n. 8, p. 643-661, 2018.

SIQUEIRA, E. M. D. S. et al. *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC-DAD and LC–MS/MS and *in vivo* anti-inflammatory activity. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 10, p. 1656–1665, 2016.

SIQUEIRA, E. M. S. et al. Antiviral potential of *Spondias mombin* L. leaves extract against herpes simplex virus type-1 replication using *in vitro* and *in silico* approaches. **Planta Medica**. v. 86, n. 7, p. 505-515, 2020.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**. v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SONG, Z. et al. Ginsenoside Rb1 Prevents H₂O₂-Induced HUVEC Senescence by Stimulating Sirtuin-1 Pathway. **PloSOne**. v. 9, n.11, p. 1-9, 2014.

SPISSU, Y. et al. Anti- and Pro-oxidant activity of polyphenols extracts of Syrah and Chardonnay grapevine pomaces on melanoma câncer cells. **Antioxidants**. v. 12, n. 80, p. 1-23, 2023.

TANIGAWA, T. et al. (+)-Catechin protects dermal fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 14, n. 133, p. 1-7, 2014.

TRINIDAD, F. R. J.; RUIZ, M. A.; BATLLÓ, N. S.; BADENES, À. V.; GIBERT, J. B.; CAÑELLAS, A. V.; MORENO, M. R.; ROFASTES, X. F.; TENAS, M. S.; DANTAS, A. P.; TURA-CEIDE, O.; MUXART, M. R. Linking *in vitro* models of endothelial dysfunction with cell senescence. **Life**. v. 11, n. 1323, p. 1-14, 2021.

UCHÔA, A. D. A. et al. Antioxidant activity and phytochemical profile of *Spondias tuberosa* Arruda leaves extracts. **American Journal of Plant Sciences**. v. 6, p. 3038-3044, 2015.

VALIEVA, Y.; IVANOVA, E.; FAYZULLIN, A.; KURKOV, A.; IGRUNKOVA, A. Senescence-associated β -galactosidase detection in pathology. **Diagnosis**. v. 12, n. 2309, p. 1-14, 2022.

VARESI, A.; CHIRUMBOLO, S.; CAMPAGNOLI, L. I. M.; PIERELLA, E.; PICCINI, G. B.; CARRARA, A.; RICEVUTI, G.; SCASSELLATI, C.; BONVICINI, C.; PASCALE, A. The role of antioxidants in the interplay between oxidative stress and senescence. **Antioxidants**. v. 11, n. 1224, p. 1-42, 2022.

VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**. v.3, n.4, p. 200-201, 2012.

WANG, H-H.; SUN, Y-N.; QU, T-Q.; SANG, X-Q.; ZHOU, L-M.; LI, Y-X; REN, F-Z. Nobiletin prevents D-galactose-induced C2C12 cell aging by improving mitochondrial function. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 23, n. 11963, p. 1-12, 2022.

WANG, J. M.; CHEN, A. F.; ZHANG, K. Isolation and primary culture of mouse aortic endothelial cells. **Journal of Visualized Experiments**. v.118, n. e52965, p. 1-7, 2016.

WANG, Q.; ZOU, M-H. Measurement of reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial ROS in AMPK knockout mice blood vessels. **Methods in Molecular Biology**. v. 1732, p. 507-517, 2018.

WANG, X.; ZHANG, J-Q.; XIU, C-K.; YANG, J.; FANG, J-Y.; LEI, Y. Ginseng-Sanqi-Chuanxiong (GSC) extracts ameliorate diabetes-induced endothelial cell senescence through regulating mitophagy via the AMPK pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2020, p. 1-22, 2020.

WANG, Y.; HE, Y.; RAYMAN, M. P.; ZHANG, J. Prospective selective mechanism of emerging senolytic agents derived from flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 69, n. 42, p. 12418-12323, 2021.

WANG, Z.; WU, C.; ZHANG, M.; DONG, A.; NIU, R.; ZHANG, J. Sevoflurane promotes the proliferation of HUVECs by activating VEGF signaling. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 19, p. 1336-1342, 2020.

WOJTALA, A.; BONORA, M.; MALINSKA, D.; PINTON, P.; DUSZYNSKI, J.; WIECKOWSKI, M. R. Chapter Thirteen – Methods to monitor ROS production by fluorescence microscopy and fluorometry. **Methods in Enzymology**. v. 542, p. 243-262, 2014.

WOO, J.; SHIN, S.; CHO, E.; RYU, D.; GARANDEAU, D.; CHAJRA, H.; FRÉCHET, M.; PARK, D.; JUNG, E. Senotherapeutic-like effect of *Silybum marianum* flower extract revealed on human skin cells. **PloS One**. v. 16, n. 12, p. 1-19, 2021.

WOO, J. et al. *Isatis tinctoria* L. leaf extract inhibits replicative senescence in dermal fibroblasts by regulating mTOR-NFκB-SASP signaling. **Nutrients**. v. 14, n. 1979, p. 1-13, 2022.

WU, W.; HOU, C-L.; UM, X-P.; SUN, C.; ZHU, Y-C.; WANG, M-J.; LV, Q-Z. H₂S donor NaHS changes the production of endogenous H₂S and NO in D-Galactose-induced accelerated ageing. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. p. 1-14, 2017.

XIE, T.; PAN, R.; HUANG, W.; DONG, S.; WU, S.; YE, Y. Myricetin alleviates H₂O₂-induced senescence and apoptosis in rat nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells. **Folia Histochemica et Cytobiologica**. v. 61, n. 2, p. 98-108, 2023.

XU, Q. et al. The flavonoid procyanidin C1 has senotherapeutic activity and increases lifespan in mice. **Nature Metabolism**. v. 3, p. 1706–1726, 2021.

XU, X.; SHEN, X.; FENG, W.; YANG, D.; JIN, L.; WANG, J.; WANG, M.; TING, Z.; XUE, F.; ZHANG, J.; MENG, C.; CHEN, R.; ZHENH, X.; DU, L.; XUAN, L.; WANG, Y.; XIE, T.; HUANG, Z. D-galactose induces senescence of glioblastoma cells through YAP-CDK6 pathway. **Aging**. v. 12, n. 18, p. 18501-18521, 2020.

YE, W.; CAO, J-M.; TANG, X-J.; LIU, C.; HAO, D-J.; JIN, J.; LU, J-X. **Mitochondrial impairment mechanism in D-galactose-induced senescence in experimental cell model**. Conferência. International Conference on Biological Sciences and Technology (BST 2016). Advances in Biological Sciences Research. 2016.

YUNARTO, N.; CALVIN, C., C.; SULISTYOWATI, I.; OKTOBERIA, I., S.; RESWANDARU, U., N.; ELYA, B.; SAURIASARI, R.; MIHARDJA, L., K. Development and validation of a High-Performance Liquid Chromatography-Based Method for catechin isolated from the leaves of gambir (*Uncaria gambir* Roxb). **Tropical Journal of Natural Product Research**. v. 7, n. 3, p. 2569-2573, 2023.

ZEB, A. Concept, mechanism, and implications of phenolic antioxidants in foods. **Journal of Food Chemistry**. v. 44, n. 9, p. 1-22, 2020.

ZHANG, C.; et al. KNDC1 knockdown protects human umbilical vein endothelial cells from senescence. **Molecular Medicine Reports**. v. 10, n.1, p. 82-88, 2014.

ZHOU, D.; BORSA, M.; SIMON, A., K. Hallmarks and techniques of cellular senescence and cellular ageing in immune cells. **Aging Cell**. v. 20, n. e13316, p. 1-17, 2021.

ZHU, X. X.; MIAO, X. Y.; GONG, Y. P.; FU, B.; LI, C. L. Isolation and culture of rat aortic endothelial cells in vitro: a novel approach without collagenase digestion. **Journal of Cellular Biochemistry**. p. 1-9, 2019.

Anexos

ANEXOS

Anexo I



Universidade
Federal da
Paraíba



Universidade Federal da Paraíba

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos dos extratos de *Spondias mombin*/lutea Linn (cajá) e *Spondias tuberosa* Arruda (umbu) em modelo de senescência induzida por D-Galactose em células endoteliais isoladas da artéria aorta de ratos (RAECs)", protocolada sob o CEUA nº 9236061222 (ID 001923), sob a responsabilidade de **Isac Almeida de Medeiros e equipe; Islania Giselia Albuquerque Gonçalves; Javanyr Frederico de Souza Junior** - 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 19/07/2023.

We certify that the proposal "Evaluation of the effects of *Spondias mombin*/lutea (cajá) and *Spondias tuberosa* Arruda (umbu) e.x.t.r.a.c.t.s in model of senescence induced by D-Galactose in endothelial cells isolated f.r.o.m the aortic artery of rats (RAECs)", utilizing 21 Heterogenics rats (21 males), protocol number CEUA 9236061222 (ID 001923), under the responsibility of **Isac Almeida de Medeiros and team; Islania Giselia Albuquerque Gonçalves; Javanyr Frederico de Souza Junior** - 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 07/19/2023.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 01/2023 a 12/2023 Área: Ciências Farmacêuticas

Origem: Unidade de Produção Animal IPeFarM

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 4 a 8 semanas

Quantidade: 21

Linhagem: Rattus Norvegicus - Wistar

Peso: 250 a 300 g

João Pessoa, 19 de julho de 2023

Prof. Dr. Luiz Henrique César Vasconcelos
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Profa. Dra. Gláucia Veríssimo Faheina Martins
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba



Anexo II



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A3C0A3F

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A3C0A3F**
Usuário: **Universidade Federal da Paraíba**
CPF/CNPJ: **24.098.477/0001-10**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Spondias mombin Linn

Título da Atividade: **Estudo do potencial terapêutico da Spondias mombin Linn em ratos**

Equipe

Islania Giselia Albuquerque Gonçalves	Universidade Federal da Paraíba
Isac Almeida de Medeiros	Universidade Federal da Paraíba
Robson Cavalcante Veras	Universidade Federal da Paraíba
Mathania Silva de Almeida Rezende	Universidade Federal da Paraíba
Mikelly Andrade da Silva	Universidade Federal da Paraíba
Javanyr Frederico de Souza Júnior	Universidade Federal da Paraíba

Data do Cadastro: **20/08/2023 17:41:17**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:41** de **20/08/2023**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

Anexo III



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Atestado de Regularidade de Acesso

Cadastro nº A0BD05B

O Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, no exercício da competência conferida pelo inciso IV do § 1º do art. 6º da Lei nº 13.123/2015, atesta que o acesso ao Patrimônio Genético, referente ao cadastro abaixo identificado e resumido, cumpriu os requisitos da Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos até a data de emissão deste atestado.

Número do cadastro: **A0BD05B**
Usuário: **Universidade Federal da Paraíba**
CPF/CNPJ: **24.098.477/0001-10**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Spondias tuberosa

Título da Atividade: **Estudo do potencial terapêutico da Spondias tuberosa Arruda em ratos**

Equipe

Islania Giselia Albuquerque Gonçalves	Universidade Federal da Paraíba
Mikelly Andrade da Silva	Universidade Federal da Paraíba
Mariana Freire Caetano de Figueiredo	Universidade Federal da Paraíba
Javanyr Frederico de Souza Júnior	Universidade Federal da Paraíba
Robson Cavalcante Veras	Universidade Federal da Paraíba
Isac Almeida de Medeiros	Universidade Federal da Paraíba
Karina Carla de Paula Medeiros	Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Data do Cadastro: **01/08/2023 18:29:30**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **18:33** de **01/08/2023**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**