



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

---

## **Efeito do óleo da espécie vegetal *Caryocar villosum* em linhagem de células vero *in vitro***

Discente: IZABELLA CARLA SILVA LOPES

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ LUIZ MARTINS DO NASCIMENTO

BELÉM-PA  
2024

IZABELLA CARLA SILVA LOPES

**Efeito do óleo da espécie vegetal *Caryocar villosum*  
em linhagem de células vero *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas – ICB, da Universidade Federal do Pará – UFPA, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

BELÉM-PA  
2024

## **DEDICATÓRIA**

Dedico o meu trabalho a minha família, em especial a minha vizinha Raimunda de Souza Lopes (*in memoriam*), a qual se sentia extremamente orgulhosa por ter uma neta mestranda, e a perdi em meio a pandemia para o covid.

Dedico o meu esforço para ela pois como ela dizia – Ela era a raiz do meu coração.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a força vital e divina que há dentro de mim, a presença EU SOU O QUE SOU, DEUS, que me faz uno com o restante do mundo e que despertou em mim a TODA a “força de vontade” sobrenatural e necessária para que eu terminasse esse trabalho diante das mais diversas dificuldades que passei assim como colocou pessoas no meu caminho para que pudessem me ajudar a termina-lo.

Agradeço a minha família por estarem comigo em meio as adversidades me proporcionando um suporte a qual necessitava para desempenhar o meu trabalho.

Agradeço profundamente ao meu Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento, por ter me dado a oportunidade de trabalhar ao seu lado, por seus conhecimentos enriquecedores, sua experiência incrível, pelas chamadas de atenção, pela sua paciencia comigo principalmente referente aos meus problemas pessoais... e pelo seu suporte nessa fase final a qual foi incasável para que esse trabalho tenha sido terminado.

Agradeça a minha companheira de bancada, do curso de mestrado Nágila monteiro, que trabalhando juntas, se ajudando, sempre em sintonia. Ao meu amigo Adan, colaborador deste trabalho que foi fundamental nesta fase final me ajudando com gráficos, análises e com suas palavras de fortalecimento e com seu jeito puro e prestativo de ser.

A professora Edilene por sempre conversar de forma a me ajudar, a me incentivar, a indentificar quando algo não ocorria bem e ate mesmo a apontar a falhas de forma gentil, isso é muito importante para um processo de aprendizagem.

A professora Barbarella pela sua genialidade frente as perguntas, pelo suporte necessário dentro do laboratório mesmo sendo sempre tão ocupada.

A todos do LMNC em especial Mesc. Neidiane por toda ajuda com a sua experiência como técnica de laboratório, sempre solícita, sempre pronta pra ajudar, obrigada por ser essa pessoa incrível. Ao professor Dr. Fábio por vários direcionamentos e ajuda científica no trabalho. A todos que passaram e que ajudaram a alguma forma ao longo da realização deste trabalho e nessa fase final as minhas meninas Eline, Anne e Dayanne. E a nossa querida Tatiane Sá (*in memorian*) a qual deu origem a este trabalho e me sinto honrada em poder continuar.

Agradeço a todos do LBE, na qual a equipe sempre solícita e disposta a nos auxiliar quando necessitamos usufruir de sua estrutura, agradecimento especial ao professor Dr Chubert e querida Fernanda.

Agradeço ao meu pai Carlos Alberto por todo o suporte mesmo com toda as nossas dificuldades nesses últimos anos, sempre me auxiliando para que eu continuasse nos meus estudos. A minha mãe Isabel Santos por esta sempre comigo, minha mãe amiga, a irmã Carolina Lopes e as minhas sobrinhas Livia e Sophia por serem e me darem motivo de crescer na vida. Aos meus irmãos Carlos e Ana que mesmo longe sempre estão dentro do meu coração. Aos meus cachorrinhos Marcos, Sansa e Jade por me receberem de forma tão amorosa quando chegava em casa cansada. Aos meus vários tios, tias, a minha querida vó Irá que sempre me deram os mais diferentes apoio. Agradeço a minha tia psicóloga Lena Lopes, que em todo esse período conturbado, por ter me dado um suporte extremamente necessário para meu tratamento, autoconhecimento e para que eu conseguisse lidar com as adversidades que surgiam; agradeço a minha tia Vera Lúcia também nesta fase final pelas palavras de encorajamento, ao Chidi Otobo por esta ao meu lado e por ter me dado o suporte que eu precisava para finalizar este trabalho.

Aos meus amigos da vida Laís, Mayque, Thais, Jackeline Jackeline, Jamilly, Jaqueline, Viviane, Sayuri, Tina, Caio, Camilly, Hilda, Carlos William, Tiago, João Antunes e aos meus vizinhos e amigos do vôlei.... Dentre muitos outros amigos que sempre estavam segurando a minha mão e aliviando as dificuldades.

Importante frisar que sem uma rede de afeto, composto por pessoas queridas e que nos desejam o bem de forma genuína... não conseguimos ir mais além, mesmo que tenhamos que percorrer o caminho sozinhos! E que, quando agimos com o coração e de forma pura e correta as pessoas ao nosso redor são tocadas e DEUS sabe como direcioná-las para nos dá uma força, uma ajuda necessária... este foi meu alicerce pois tenho consciencia que não conseguiria fazer tudo sozinha... meu sentimento é apenas o de GRATIDÃO!

## RESUMO

Os fibroblastos são células que participam de diferentes processos no organismo sendo indispensáveis no desenvolvimento e homeostase dos tecidos. São importantes agentes no processo de cicatrização, estando presentes nas fases inflamatória, proliferativa e de remodelação. Essas células produzem biomoléculas que compõem a matriz extracelular, como o colágeno, as quais dão o suporte necessário para uma cicatrização saudável. Contudo a cicatrização é um processo complexo e está sujeito a falhas, diante disto é importante investigar alternativas terapêuticas para produzir tratamentos mais efetivos em casos onde o processo de cicatrização não é eficaz. Produtos naturais oriundos de plantas são amplamente usados como formas terapêuticas para a cicatrização tendo em vista seus menores efeitos colaterais, baixo custo, aliado ao conhecimento tradicional tornam-se atrativo a estudos que priorizam valorizar a biodiversidade. O *Caryocar villosum* (Cv), fruto nativo da região amazônica, é uma fonte notável de compostos bioativos com potencial terapêutico que possuem aplicações cosméticas e farmacêuticas. Neste trabalho foi investigado a ação do óleo de Cv (OCv) em células da linhagem VERO (like fibroblastos). As células foram tratadas com 75, 125 e 250 µg/ml por 24h. Foram realizados os ensaios de citotoxicidade, microscopia óptica, proliferação celular, análise morfológica e análises de componentes da matriz extracelular, como marcação com faloidina e imunofluorescência para anticorpo colágeno tipo III. Nenhuma citotoxicidade foi observada nas células após o tratamento do OCv. O tratamento do OCv induziu alterações morfológicas e fisiológicas nas células indicando ativação celular. A microscopia de fluorescência revelou maior espalhamento celular, rearranjo de filamentos de actina e aumento na exposição da superfície celular em comparação com células não tratadas. Além disso, este estudo sugere que as células tratadas com OCv são ativadas através do rearranjo do citoesqueleto, aumento da superfície celular, proliferação e aumento da síntese de colágeno. Esses achados indicam que o OCv pode ser uma boa estratégia terapêutica para gerar produtos, a partir da biodiversidade da Amazônia, com o objetivo de atuar no processo de cicatrização.

**PALAVRAS-CHAVES:** Cicatrização, Fibroblastos, *Caryocar villosum*, Matriz extracelular.

## ABSTRACT

Fibroblasts are cells that participate in different processes in the body, being indispensable in the development and homeostasis of tissues. They are important agents in the healing process, being present in the inflammatory, proliferative and remodeling phases. These cells produce biomolecules that constitute the extracellular matrix, such as collagen, which provide the necessary support for healthy healing. However, healing is a complex process, and it is prone to failure, so it's important to investigate therapeutic alternatives to produce more effective treatments in cases where natural healing is not effective. Natural products from plants are widely used as therapeutic forms for healing considering their lower side effects, low cost, this combined with traditional knowledge makes it attractive to studies that prioritize valuing biodiversity. *Caryocar villosum* (Cv), a fruit native to the Amazon region, is a remarkable source of bioactive compounds with therapeutic potential that has cosmetic and pharmaceutical applications. In this work, the action of Cv oil (CvO) on VERO cell line (fibroblast-like cells) was investigated. The cells were treated with 75, 125 and 250 µg/mL for 24 hours. Cytotoxicity assays, optical microscopy, cell proliferation, morphological analysis, and analysis of extracellular matrix components, such as phalloidin staining and immunofluorescence for type III collagen antibody, were performed. Any cytotoxicity was observed in the cells after CvO treatment. CvO treatment induced morphological and physiological changes in the cells indicating cell activation. Fluorescence microscopy revealed greater cell spreading, rearrangement of actin filaments and increased cell surface exposure compared to untreated cells. Furthermore, this study suggests that fibroblasts treated with CvO are activated through cytoskeletal rearrangement, increasing cell surface, proliferating, and increasing collagen synthesis. These findings indicate that CvO may be a good therapeutic strategy from biodiversity to stimulate the healing process.

**KEYWORDS:** Healing, Fibroblasts, *Caryocar villosum*, Extracellular matrix.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fruto piquiá ( <i>Caryocar villosum</i> ).....	20
<b>Figura 2.</b> Desenho experimental.....	25
<b>Figura 3.</b> Viabilidade celular.....	30
<b>Figura 4.</b> Proliferação celular.....	31
<b>Figura 5.</b> Volume Celular.....	32
<b>Figura 6.</b> Marcação fluorescência direta.....	34
<b>Figura 7.</b> Análise de Hidroxiplina.....	35
<b>Figura 8.</b> Microscopia de imunofluorescência.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

TC	TECIDO CONJUNTIVO
MEC	MATRIZ EXTRACELULAR
OCV	OLEO DE CAROCAR VILLOSUM
EROS	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
DMEN	DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM
DMSO	DIMETILSULFÓXIDO
FBS	SORO BOVINO FETAL
MTT	THIAZOLYL BLUE TETRAZOLIUM BROMIDE
PBS	TAMPÃO FOSFATO-SALINO
PHEM	TAMPÃO PHEM (PIPES, HEPES, EGTA E MAGNÉSIO)
pH	POTENCIAL HIDROGENIÔNICO
BSA	ALBUMINA DE SORO BOVINO
DAPI	4',6'-DIAMINO-2-FENIL-INDO
TRITON-X	SOLUÇÃO AQUOSA DE POLIOXIETILENO-OCTIL-FENIL-ÉTER
	AGENTE SURFACTANTE NÃO-IÔNICO

## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
2.1 A CICATRIZAÇÃO E SEU CONTEXTO CELULAR .....	12
2.2 O PAPEL DO FIBROBLASTO NA CICATRIZAÇÃO.....	13
2.3 A ESPÉCIE VEGETAL <i>Caryocar villosum</i> .....	15
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
4.1 OBJETIVO GERAL: .....	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	20
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
5.1 DESENHO EXPERIMENTAL .....	21
5.2 MATERIAL BOTÂNICO.....	21
5.3 DILUIÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS E TRATAMENTO COM O ÓLEO DO <i>C. Villosum</i> .....	22
5.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> COM ÓLEO DO <i>C. Villosum</i> .....	22
5.4.1 CULTIVO DE CÉLULAS VERO .....	22
5.4.2 ENSAIO DE CITOTOXIDADE CELULAR POR MTT .....	22
5.4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	23
5.4.5 VOLUME CELULAR.....	23
5.4.6 MARCAÇÃO FLUORESCENCIA DIRETA POR FALOIDINA .....	24
5.4.7 QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA.....	24
5.4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA – colágeno tipo III .....	25
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
<b>7. DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>34</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O processo de cicatrização objetiva contornar uma injúria tecidual, visando o seu reparo; esse processo é organizado em três etapas sequenciais e sobrepostas: a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase de remodelação (Cañedo-Dorantes, 2019). Este processo é uma reação fisiológica natural decorrente a uma lesão, contudo o mesmo não é um fenômeno simples, pois envolve uma interação complexa entre vários tipos de celulares, citocinas, mediadores e o sistema vascular (Landén et al, 2016; Heather A. Wallace, 2020).

Os fibroblastos são células importantes para o processo de cicatrização, pois fornecem os componentes extracelulares necessários que servirão de suporte a este processo (Reinke and Song, 2012; Heather A. Wallace, 2020). Após a lesão, essas células são recrutadas para migrar a área lesionada, participando de todas as fases da cicatrização; até que ocorra a epitelização completa da região, essas células são essenciais para uma cicatrização saudável (Tomasek, 2002; Kendall, 2014).

Substâncias naturais aliadas ao conhecimento tradicional são atrativos para pesquisas visando novos produtos que almejam aproveitar e empregar a biodiversidade amazônica. Estes produtos são candidatos em potenciais a complementar ou melhorar tratamentos já utilizados. O *Caryocar villosum* (Cv), fruto conhecido popularmente como piquiá, nativo da região amazônica, é amplamente utilizado na alimentação da população regional assim como no uso medicinal tradicional (Galuppo, 2004). Seu gênero, pertencente a família Caryocaraceae, possui inúmeras aplicações como usos medicinais, cosméticos, entre outros (Rigonato E Almeida, 2004; Miranda *et al* 2019).

Diante disto, este trabalho tem como objetivo analisar o mecanismo de ação do óleo de Cv (OCv) em linhagem de células vero (like-fibroblastos) tendo em vista a análise dos efeitos morfológicos na estrutura celular e outros mecanismos envolvidos na cicatrização a nível celular.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A CICATRIZAÇÃO E SEU CONTEXTO CELULAR

A estrutura da pele é composta por duas camadas: a epiderme e a derme. A derme é o tecido conjuntivo (TC) da pele, o TC é uma estrutura de ligação, suporte e organização para tecidos e órgãos, e as suas células são os fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos e outras células importantes do sistema imune (Kupper, 2004). Essas células estão distribuídas na região interna do TC, subendotelial e na parte externa, onde desempenham a função do armazenamento de metabolitos, respostas imunológicas e inflamatórias, e na reconstituição tecidual após uma lesão (Pasparakis, 2014; Rouselle, 2018, Cañedo-Dorantes, 2019).

A matriz extracelular (MEC), presente na derme, exerce múltiplas influências sobre a fisiologia dos tecidos; ela atua como suporte estrutural para as células, fornece um sistema de transporte para nutrientes, suporte para conexões celulares, para o movimento e migração, transdução de estímulos químicos e físicos que regulam a atividade celular (processos de sinalização) e contribui com propriedades mecânicas e reatividade a mudanças ambientais (Engler *et al.*, 2006, Maarouf *et al.*, 2019).

A composição da MEC se dá por uma variedade de componentes como proteoglicanos, proteínas, água e colágeno os quais determinam as propriedades físicas e bioquímicas do tecido conjuntivo (Tazima, 2008; Mckee *et al.*, 2019).

As duas classes de moléculas principais da MEC são secretadas pelos fibroblastos e células epidérmicas sendo, portanto, as proteínas estruturais fibrosas, como colágeno, elastina, laminina e os proteoglicanos. Dentre os componentes da MEC, o colágeno é a proteína mais abundante no corpo, e seus tipos mais comuns são o colágeno do tipo I e o do tipo III; que formam as fibrilas estruturais e são responsáveis pela estrutura, estabilidade, resistência e rigidez do tecido (Eyre, 1980; Gregory S. Schultz, 2005; Ricard-Blum, 2011; Theocharidis & Connelly, 2017).

Embora as matrizes extracelulares possam parecer inertes, elas são altamente dinâmicas e passam por alterações, como resultado da síntese e remodelamento de suas moléculas mediadas por células; o que é essencial para preservar a homeostase do TC, na reparação tecidual e em algumas patologias (Hinz, 2016; Hopps, 2012; Janmey, 2016). No contexto da reparação e cicatrização tecidual a deposição da MEC tem como objetivo promover reconstituição da funcionalidade tecidual (Sotille *et al.* 2005).

## 2.2 O PAPEL DO FIBROBLASTO NA CICATRIZAÇÃO

Após a ocorrência de uma lesão tecidual, o processo de reparo do tecido se iniciam com a finalidade de restaurar o dano. O processo de cicatrização é uma reação fisiológica natural a lesões ou doenças teciduais. Não é um fenômeno simples, pois envolve uma interação complexa entre vários tipos de células, citocinas, mediadores e sistema vascular (Rowan MP., 2015; Wilkson, 2023).

Quando a pele é lesionada, os eventos sequenciais do processo de reparação são organizados em fases sobrepostas que ocorrem através da integração de processos dinâmicos, aos quais ocorrem de forma harmônica com a finalidade de garantir a reparação ao dano ocorrido (Landén NX., 2016, Adiss R., 2020; Mandelbaum *et al.*, 2003, Faleiro *et al.*, 2009).

As etapas que ocorrem de forma sequencial e sobrepostas são a fase inflamatória, a fase proliferativa (formação tecido de granulação com depósito de matriz extracelular) e a fase de remodelação tecidual (Clark, 1993; L. Cañedo *et al.*, 2019). Uma extensa rede de comunicação entre as células e a matriz extracelular é estabelecida e participa ativamente na cicatrização da ferida (Rititié L., 2016; Reinke JM., 2012; Gullamat Prats R., 2021).

Dentro deste contexto, os fibroblastos desempenham um papel essencial na cicatrização de feridas. Essas células estão envolvidas ativamente neste processo e sua ação é crítica para as fases inflamatória, proliferativa e de remodelação (Werner S., 2007; Guilamat Prats, 2021).

Os fibroblastos representam um grupo complexo e versátil de células que estão envolvidas em processos importantes na regulação da homeostase, indispensáveis no desenvolvimento da pele, processos celulares no TC e em patologias (Werner *et al.*, 2007; Tracy *et al.*, 2016; Moretti *et al.*, 2022). Estas são células derivadas do mesoderma embrionário e podem ser encontradas em quase todos os tecidos e órgãos do corpo e dispõem de uma grande plasticidade, uma vez que são capazes de sofrer alteração em sua função, na sua morfologia ou até mesmo diferenciar-se em um outro fenótipo celular. Isto lhes confere papéis diferentes em camadas dérmicas distintas (Sorrell, 2009; Werner, 2007; Tracy, 2016, Chitturi e Leask, 2024).

No processo de cicatrização os fibroblastos estão presentes desde o início até que ocorra a completa epitelização do tecido lesionado (Bainbridge, 2013; Moretti *et al.*, 2022). Essas células são estimuladas a migrar para a área da lesão, onde elas passam a se proliferar para desempenhar funções importantes para esse processo (Schultz *et al.*, 2011; Tracy *et al.*, 2016). Estas células produzem elementos que compõem a matriz extracelular, e no contexto de cicatrização são responsáveis em sintetizar os componentes correspondentes a uma nova

MEC, como moléculas de colágeno para apoiar as outras células associadas a uma cicatrização eficaz (Bainbridge, 2013; Tracy *et al.*, 2016; Olazaba O. *et al.*, 2024).

O processo de cicatrização é concluído após ocorrer o remodelamento da MEC na região da lesão, onde o tecido lesionado é preenchido pelo TC jovem e os níveis de fibroblastos da região da lesão voltam aos níveis basais. Diante do exposto é notável a importância dos fibroblastos no processo de cicatrização, onde se tornam essenciais para dar suporte a uma cicatrização saudável (Desmoulière *et al.*, 1995; Bainbridge, 2013; Jiang e Rinkevich, 2021). Estudos recentes incluem a utilização dessas células como modelos importantes para estudos tanto *in vivo* como *in vitro* com ênfase no processo de cicatrização (Guilamat Prats 2021, Jiang D. 2021).

### 2.3 A ESPÉCIE VEGETAL *Caryocar villosum*

O Brasil, em especial a região amazônica, possui uma grande variedade de espécies silvestres e nativas considerando-se uma vasta biodiversidade. Estudos a cerca de produtos naturais, são importantes para que haja o uso e o manejo correto dessa biodiversidade, que tem como objetivo conectar o interesse e a busca de novos fitofármacos visando complementar tratamentos com fármacos existentes assim como valorizar o potencial bioativo dessas espécies aliados ao conhecimento tradicional (Payzar et al., 2014; El-Hamoli et al., 2019; Geidoni et al., 2019; Diniz, et al., 2019).

Podemos citar comunidades de difícil acesso à recursos, e à saúde pública, e têm como opção viável e menos onerosa o uso de plantas medicinais associados com o conhecimento tradicional para o tratamento de doenças.

Um exemplo bem prático acerca disto acontece quando ocorre lesões na pele, como ferimentos ou queimaduras. E por ser uma problemática amplamente existente e que dependendo dos casos, de difícil tratamento somados ao seu alto custo; os produtos naturais têm potencial a ser uma alternativa importante atuando como terapia de complementação.

Alguns dos benefícios de fitofármacos dentre as quais podemos citar são os efeitos colaterais reduzidos, devido sua composição possuir substâncias naturais; por serem uma alternativa de baixo custo e ainda terem potencial em representar uma oportunidade para o uso sustentável e no desenvolvimento de novos tratamentos e aplicações de terapias mais eficazes. (Pazyar N. Et al., Criollo-Mendoza MS. et al., 2023).

Na região amazônica destacam-se algumas plantas podem ser utilizadas como fontes de materiais para tratamentos de lesões na pele, dentre elas, podemos destacar algumas espécies pertencentes ao gênero *Caryocar*; que além de algumas destas serem empregadas em tais tratamentos, estas plantas também são amplamente usadas por populações locais em diversas aplicações com uso medicinal, além de alimentício, artesanais e entre outros. E esta riqueza de conhecimento popular tradicional podem auxiliar estudos científicos na descoberta de determinadas potencialidades dessas plantas (Rigonato, 2004; Barreto, GP., 2009).

Segundo Miranda (2019) esse gênero possui como característica marcante, frutos oleaginosos com grande importância na alimentação humana e animal; abrange 16 espécies as quais estão amplamente distribuídas em países tropicais.

Os componentes bioativos presentes em espécies do gênero *Caryocar* podem ter ações farmacológicas importantes, as quais incluem substâncias fenólicas entre outros, e os carotenóides como principais. Sendo assim evidenciado a capacidade antioxidante e atividade

antígenotóxica dentre outras (Barreto Gp., 2009; Almeida Mr., 2012; Chiste Rc., 2012; De Oliveira ML., 2010; De FIGuereido Prl., 2016).

Os óleos dos frutos do gênero *Caryocar* são ricos em uma vasta variedade de ácidos graxos, indicando o potencial desses óleos para a nutrição humana (Yamaguchi, 2017; Miranda, et al., 2019). Estudos a cerca dos frutos da espécie do gênero *Caryocar* mostraram efeitos importantes para o tratamento de várias patologias, como respiratórias, musculares e até ação anti-inflamatória (Costa, 2011; MirandaVilela, 2014).

Dentre as espécies do gênero *Caryocar*, podemos destacar *Caryocar villosum* (Cv) conhecido popularmente como Piquiá, pertencente à família Caryocaraceae. É uma árvore frutífera de grande porte (20-30m), comumente encontrada na Amazônia, especialmente abundante no Estado do Pará, localizado na região Norte do Brasil, assim como na Guiana Francesa e Venezuela (Loureiro et al, 1979; Martins, 2007; Barstrow, 2018).

O seu óleo utilizado na culinária e pode ter finalidade tanto para preparar pratos regionais quanto para substituto da manteiga; além de haver aplicações na literatura para a produção de sabonetes e aplicabilidade em cosméticos (Clement, 1993, Pianovski, 2008; Barreto GP., 2009; Roxo M., 2020).

O Cv é utilizado por comunidades tradicionais para o tratamento de diversas doenças. A casca da árvore normalmente é utilizada em infusão e aplicada na medicina popular em combate a febre e para um efeito diurético (Vastano, 1983; Loureiro et al, 1979). Derivados do fruto são aplicados em tratamentos de doenças inflamatórias, respiratórias e até mesmo utilizados como analgésico (Rios, 2001; Galuppo, 2004). Também seu uso responde muito bem a problemas articulares e por suas ação cicatrizante (Marx, 1997, Barreto GP., 2009; Roxo M., 2020).

Essa espécie nativa da região amazônica é uma fonte notável de compostos bioativos, pois os frutos do Cv possuem altos teores de compostos fenólicos totais, flavonóides com atividade antioxidante (Barreto GP. 2009; Chisté, 2012; Almeida MR, 2012).



**Figura 1.** Fruto piquiá (*Caryocar villosum* Cv). 1- O fruto com a casca. 2- O fruto piquiá com a parte interna da casca e o seu mesocarpo. 3- O mesocarpo do fruto do piquiá.

Fonte: Fotografia da autora.

Referente aos componentes bioativos presentes na espécie Cv que possuem potenciais farmacológicos, pode-se destacar o ácido gálico e ácido elágico, atuantes como substâncias fenólicas, e os carotenoides, como luteína e zeaxantina que, segundo Almeida et al., 2012, estes compostos possuem capacidade antioxidante e não apresentaram atividade genotóxica. Esta espécie apresenta grande quantidade de lipídios, principalmente os ácidos graxos insaturados que se encontram em maior quantidade, a exemplo dos ácidos linoleico e oleico, e também ácido graxo saturado, como o ácido esteárico (Facioli, 1998; Mariano et al., 2009).

Os ácidos graxos têm a capacidade de modificar as reações inflamatórias e imunológicas das funções leucocitárias, permitindo evolução no processo de reparação de lesões, promovendo quimiotaxia e mantendo o leito da ferida úmido, favorecendo o processo de cicatrização (Yamaguchi, 2017; Baptista Silva, 2020; Roxo, 2020).

O nerolidol, um sesquiterpeno, presente em grandes quantidades nesta espécie aumenta a penetração e a entrega transdérmica de medicamentos terapêuticos quando administrados topicamente (Chan WK., 2016).

No contexto de cicatrização os fitoesteróides esqualeno, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol estão presentes em quantidades relativamente grandes no Cv aparentemente oferecendo uma vantagem sobre outras espécies de *Caryocar* para o processo de cicatrização de feridas e no controle de

complicações com infecções. A aplicabilidade do esqualeno está relacionada a produtos cosméticos devido à sua capacidade de permear, hidratar e proteger a pele (Cardeno A., 2015; Shanmugarajan TS, 2018).

Em um estudo no qual o avaliou o extrato do *C. villosum* comparado com o de outras espécies do mesmo gênero, como o *C. brasiliense* e o *C. coriaceum*, provou que o primeiro apresentou um efeito antioxidante maior que os demais extratos a partir de ensaios com detecção de espécies reativas de oxigênio denominado de EROS (Chisté et al., 2012) assim como uma inibição da formação de óxido nítrico, em ensaios *in vivo*, nas concentrações entre 6,2 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de extrato no estudo de (Yamaguchi et al., 2017).

Dentro deste contexto, o *C. villosum* contém diversos compostos que o apresentam como uma importante fonte de moléculas para o processo de cicatrização de feridas cutâneas. Portanto, se faz necessário testar as propriedades cicatrizantes do *C. villosum* e assim entender e descobrir possíveis efeitos de seus mecanismos que possibilitariam ser aplicados ao processo de reparação da pele em modelos *in vitro* e *in vivo*.

Importante ressaltar que a literatura ainda carece de informações referentes a espécie, sendo necessário expandir o conhecimento sobre as atividades biológicas desta espécie visando agregar valor a mesma, dando suporte científico e relevância ao conhecimento hierárquico de comunidades locais que já fazem o uso medicinal do *C. villosum*.

### 3. JUSTIFICATIVA

A cicatrização é um processo que visa o reparo de uma injúria a nível tecidual que engloba eventos celulares coordenados com o objetivo de restabelecer o tecido danificado. Por envolver muitos processos celulares o desenvolvimento da cicatrização pode estar sujeita a diferentes complicações que podem interferir no andamento e até prejudicar uma cicatrização saudável, resultando em feridas crônicas, alterações no tecido cicatricial, infecções devido ao tempo de exposição da lesão entre outros. Tais problemas de saúde afetam milhares de pessoas no mundo, gera alto custo para a saúde pública além de comprometer a qualidade de vida dos pacientes fazendo necessária a pesquisa em busca de novas possibilidades terapêuticas para o complexo processo cicatrização.

A biodiversidade do Brasil somada ao uso do conhecimento e da prática tradicional espécies nativas com potencial nutricional e compostos bioativos, apresentam um enorme potencial para o desenvolvimento de novos produtos naturais. O *C. villosum* é um fruto que apresenta um excelente potencial nutricional e de compostos ativos, tornando-se um candidato promissor para se realizar pesquisas para novas possibilidades terapêuticas. Neste trabalho pretendemos estudar a ação do Óleo da espécie vegetal *C. villosum* aplicada em modelo de células like-fibroblastos *in vitro*, utilizando as linhagens de células VERO, a fim de analisar os efeitos intrínsecos na sua morfologia e ativação celular, correlacionando com eventos celulares acerca da melhora do processo de cicatrização.

Somado a isso importante ressaltar que recentemente, o nosso Laboratório patenteou o uso dessa planta para fins de uso em feridas com a “Formulação tópica contendo base de extrato liofilizado de *Caryocar Villosum*- Piquiá” que tem por finalidade cicatrizante de lesões teciduais em uso em humanos e veterinário! Br N°102019009990-9 A2 - Instituto Nacional de propriedade intelectual (INPI).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar os mecanismos da ação do Oléo *Caryocar villosum* (OCv) sobre as células de linhagem Vero *in vitro*.

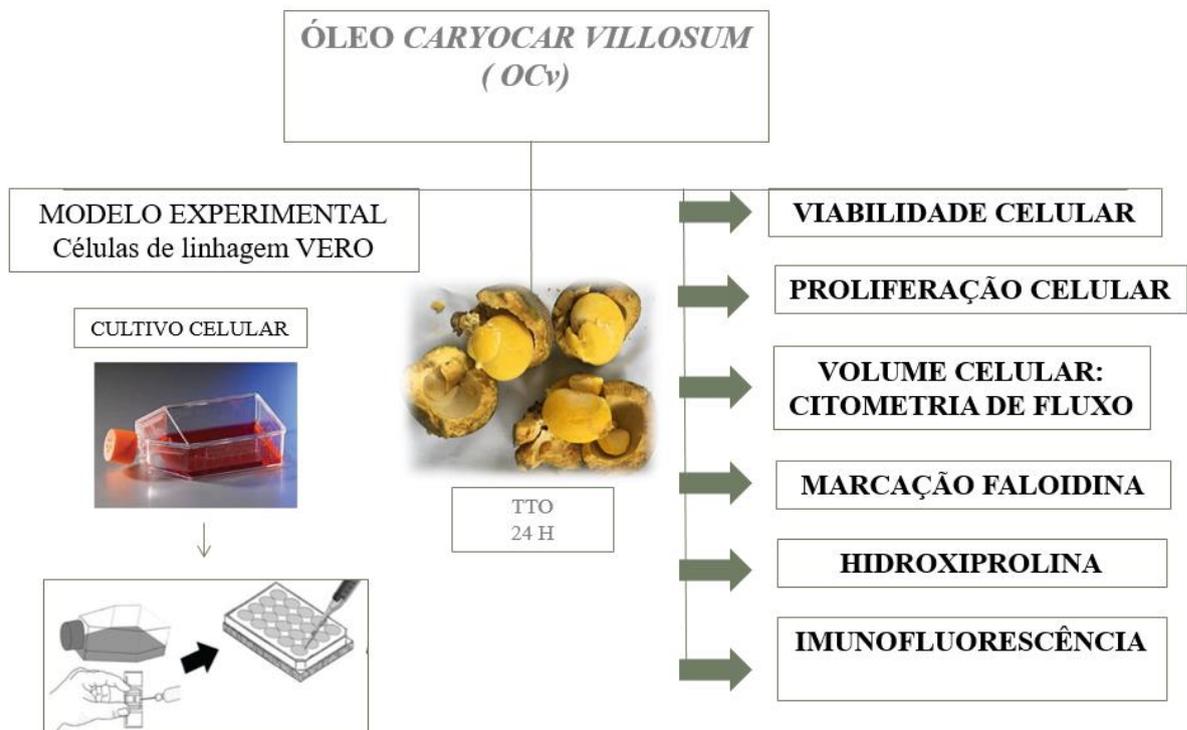
### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 4.1.1 Avaliar a citotoxicidade do OCv sobre as células de linhagem Vero;
- 4.1.2 Avaliar a morfologia e proliferação das células Vero quando tratadas pelo OCv;
- 4.1.3 Avaliar a produção de componentes do citoesqueleto e da matriz extracelular em células Vero estimuladas pelo OCv.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Esquema ilustrativo demonstrando os experimentos foram realizados com o OCv em células da linhagem VERO (Figura 2).



**Figura 2.** Desenho experimental. Representação experimental para estudar o efeito do óleo do *Caryocar villosum* (OCv), sobre células da linhagem VERO.

### 5.2 MATERIAL BOTÂNICO

Neste trabalho foi utilizado um óleo obtido a partir do mesocarpo interno (polpa) da espécie *C. villosum*, o qual foi gentilmente cedido pela Prof. Dra. Tatiane Sá (*in memoriam*) da Universidade Estadual do Pará Polo Santarém. As amostras foram liofilizadas e armazenadas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até o início dos experimentos.

Os frutos do *C. villosum* utilizados para a produção do óleo, foram coletados de uma propriedade privada denominada comunidade Cipoal, no município de Santarém, Estado do Pará, Brasil, Localizada na BR- 163 - KM 14, a Direita da BR. Ramal dos Sabinos, 2°33'34" S, 54°44'13" W. As amostras foram depositadas no herbário da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA (sob protocolo HSTM 9844 CARYOCARACEAE *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers).

### 5.3 DILUIÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS E TRATAMENTO COM O ÓLEO DO *C. Villosum*

Para o presente trabalho, o óleo *C. villosum* (OCv) foi diluído inicialmente em solvente DMSO (Dimetilsulfóxido) com a concentração final de DMSO  $\leq 0,003\%$ , pois o mesmo é altamente lipofílico; posteriormente foi diluído em meio de cultivo DMEM. Foram usadas diferentes concentrações do óleo, as quais abrangeram de 12,5 a 500 $\mu\text{g/mL}$  para os testes iniciais até que foram ajustadas as concentrações ideais no decorrer da realização da metodologia.

### 5.4 ENSAIOS *IN VITRO* COM ÓLEO DO *C. Villosum*

#### 5.4.1 CULTIVO DE CÉLULAS VERO

As células utilizadas neste trabalho são células da linhagem Vero (like-fibroblastos) foram obtidas no banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SBF (soro bovino fetal), e mantidas em garrafas estéreis a 37°C, em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. As mesmas foram cultivadas até que entrassem em cerca de 80% de confluência e direcionadas aos ensaios descritos neste trabalho. A contagem celular foi realizada em Câmara de Neubauer e a densidade celular foi ajustada de acordo com cada metodologia experimental.

#### 5.4.2 ENSAIO DE CITOTOXIDADE CELULAR POR MTT

As células da linhagem VERO foram semeadas em placa de 96 poços com a densidade celular de 3x10<sup>4</sup> células/poço. Após a aderência das células no fundo da placa, foi realizado o

tratamento do OCv nas concentrações de 12,5, 25, 50, 75, 125, 250 e 500mg/mL por um período de 24 horas. Após o tratamento as células foram lavadas 2 vezes com PBS e adicionado 100µl da solução de MTT (0,5mg/mL), as mesmas ficaram incubadas na estufa por 3 horas. O MTT foi retirado e adicionado 100µl de DMSO em cada poço e a placa ficou em agitação por 10 minutos. A leitura da solução final foi realizada e quantificada por espectrofotometria em leitor de microplaca (Biorad Model 450 Microplate Reader) com comprimento de onda de 570nm.

#### 5.4.3 ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células Vero foram semeadas  $1 \times 10^4$  células/poço, tratadas com OCv nas concentrações de 75, 125 e 250 µg/mL. As células foram lavadas em PBS, fixadas com paraformaldeído 3% por 30 minutos e coradas com Giemsa 10% (diluído em tampão fosfato pH 8,0) por 30 minutos. Foram realizadas lavagens para retirar o excesso de corante e posteriormente montadas em lâminas de vidro, contendo Entellan®. As amostras foram analisadas usando um microscópio Axio Scope.A1-Zeiss.

As células foram observadas em microscópio e micrografias de 5 campos e aleatoriamente por lamínula, totalizando 15 fotos por cada grupo experimental. O número de células foi mensurado através do programa *Image J*. A soma das contagens de núcleos celulares foi realizada em cada campo e o gráfico com número de células contadas versus os grupos tratados com o OCv. Os valores refletem as médias de três experimentos independentes (os resultados expressos por média).

#### 5.4.5 VOLUME CELULAR

As células Vero foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade celular de  $8 \times 10^4$  células/poço e tratadas por 24 h com OCv a 75, 125 e 250 µg/mL. Após o tratamento, os poços foram lavados duas vezes com PBS. As células foram analisadas por um citômetro de fluxo BD FACSCanto IITM. Um total de 10.000 eventos são necessários para adquirir os dados para o FSC-A, que representa o volume de célula apropriado, e os dados foram analisados pelo programa Flowing Software (versão 2.5.1).

#### 5.4.6 MARCAÇÃO FLUORESCENCIA DIRETA POR FALOIDINA

As células foram semeadas com densidade celular de  $8 \times 10^4$  células/poço utilizando lamínulas circulares (15mm) em placas de culturas de 24 poços (22,1mm). O tratamento das células com OCv foi realizado com as concentrações de 75 e 125  $\mu\text{g/mL}$  por 24 horas.

Após esse período as células foram fixadas com paraformolaldeído a 3% em tampão phem (1x). Após a fixação, foram realizadas três lavagens com PBS com pH 8.0. Foi realizada a permeabilização das células com a solução de TRITON-X a 0,3% com a incubação da amostra por 10 minutos, seguido de três lavagens de 10 minutos com PBS com pH 8.0. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com a solução de cloreto de amônio a 50mM pelo tempo de 30 a 60 minutos, seguido de três lavagens de 10 minutos com PBS com pH 8.0. A Faloidina complexada com o Alexa Fluor 594 (phalloidin fluorochrome Alexa Fluor 594 (Invitrogen Molecular Probes), um marcador de filamentos de actina, foi diluído em PBS-BSA-TW 1%, com diluição de 1:200, e colocado nas amostras por 60 minutos. Após esse período foram realizadas duas lavagens de 10 minutos com PBS. Os núcleos das células do grupo controle e das tratadas com OCv foram marcados com DAPI (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI). A análise de fluorescência foi realizada usando uma objetiva de 20x em um microscópio Zeiss Axioscope Fluorescence equipado com um iluminador de epifluorescência.

#### 5.4.7 QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA

Para avaliar a presença do aminoácido hidroxiprolina, um aminoácido presente no colágeno, utilizado tradicionalmente como metodologia para quantificar colágeno em amostras.

As células foram semeadas em placas de 24 poços; com a densidade celular  $1,0 \times 10^4$  células/poço. O tratamento realizado com o grupo de células tratadas com o OCv pelo tempo de 24 horas sob as concentrações 75, 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$ . Após o tratamento as células foram raspadas dos poços das placas, com raspador adequado, e transferidas junto com o sobrenadante a um tubo resfriado, e posteriormente lisadas com o auxílio de um sonicador, utilizando 5 ciclos de 30 segundos repetidos por 2 vezes. O lisado celular foi homogeneizado e centrifugado por 6 minutos em 3000 RPM a 4°C.

O sobrenadante coletado foi transferido para uma placa de 96 poços, acrescentado da Solução de Oxidação (Cloramine-T, Propanol e Tampão Citrato) por 20 minutos. Após esse

período foi colocado a solução Erlich's (4-Dimetil-lamina-benzoydo, Propanol e Ácido Perclorico) incubado por 30 min a 65°C. As amostras foram resfriadas em temperatura ambiente por no mínimo de 20 segundos. A leitura da solução final foi quantificada por espectrofotometria em leitor de microplaca (Biorad Model 450 Microplate Reader) com comprimento de onda de 550 nm.

#### 5.4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

As células Vero foram semeadas em placas de 24 poços a uma densidade celular de  $8 \times 10^4$  células/poço utilizando lamínulas circulares (15mm). Após o tratamento das células com OCv as células foram fixadas com paraformolaldeído a 3% em tampão phem (1x). Após a fixação foi realizada três lavagens com PBS com pH 8.0. A permeabilização das células foi realizada com a solução de TRITON-X a 0,3% com a incubação das células por 10 minutos, seguido de três lavagens de 10 minutos com PBS com pH 8.0. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com a solução de cloreto de amônio pelo tempo de 60 minutos, seguidos de três lavagens de 10 minutos com PBS com pH 8.0.

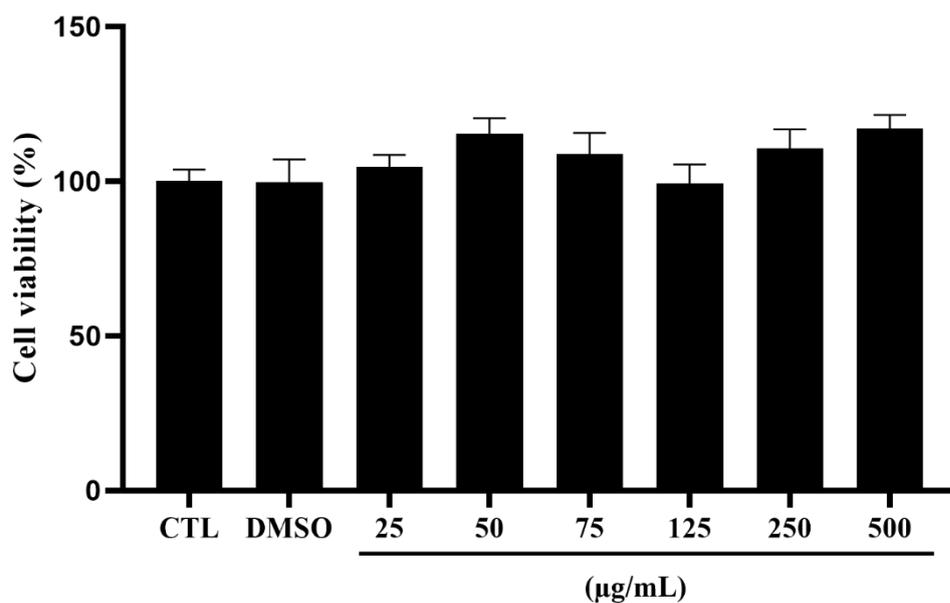
Os anticorpos primários anti-colageno tipo III (Anti-Collagen III, N-Terminal, antibody produced in rabbit, sigma) foram diluídos em PBS-BSA-TW 1%, com a diluição de 1:100. As amostras com o anticorpo primário foram incubadas *overnight* a 4°C. Foi mantida uma amostra privada de anticorpo primário, para prevenir alguma marcação inespecífica pelo anticorpo secundário. As amostras foram incubadas com os anticorpos secundários por 2 horas em temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por 2 h a 37°C com um anticorpo secundário AlexaFluor 488. Por fim, foi realizada a marcação complementar com o corante DAPI, diluído em PBS, durante 40 minutos, visando a marcação individual do núcleo celular. As lamínulas foram montadas com ProLong™ Gold Antifade Mountant com DAPI (Invitro-gen). As análises foram realizadas utilizando um microscópio Axio Scope.A1-Zeiss.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Afim de avaliar a citotoxicidade do OCv em células da linhagem VERO realizou-se o ensaio de viabilidade do utilizando o MTT (thiazolyl blue tetrazolium bromide). As células foram expostas as concentrações de 25, 50, 125, 250 e 500  $\mu\text{g/mL}$  do OCv com o tratamento de 24 horas.

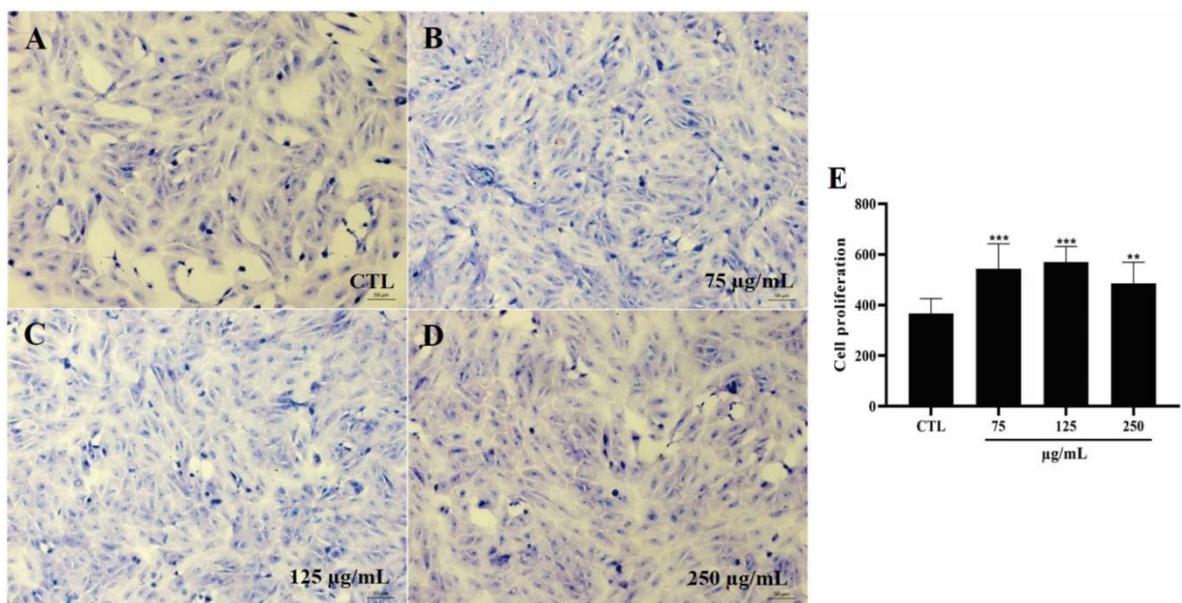
Os resultados obtidos mostraram que o OCv não foi citotóxico nas concentrações testadas no tratamento de 24 horas. Além disso, OCv apresentaram viabilidade semelhante ao DMSO e ao grupo controle (Figura 3). Portanto, nenhum efeito citotóxico dentro da faixa de concentração testada foi detectado.



**Figura 3.** Viabilidade celular de células Vero após tratamento com OCv por 24 horas. Os resultados não mostram efeito citotóxico sob a linhagem celular VERO nas diferentes concentrações testadas. CTL: grupo controle; DMSO: grupo veículo (0,1%). Os resultados são apresentados como a média  $\pm$  SEM de três tentativas independentes (ANOVA e teste post-hoc de Tukey).

## 6.2 ANÁLISE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Foi realizada a contagem de células Vero coradas com Giemsa após tratamento por 24h com as concentrações de 75, 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$  de OCv, este resultado mostrou um aumento na proliferação celular em comparação com células não tratadas (grupo controle) (Figura 4). Observa-se um aumento na proliferação celular após o tratamento.

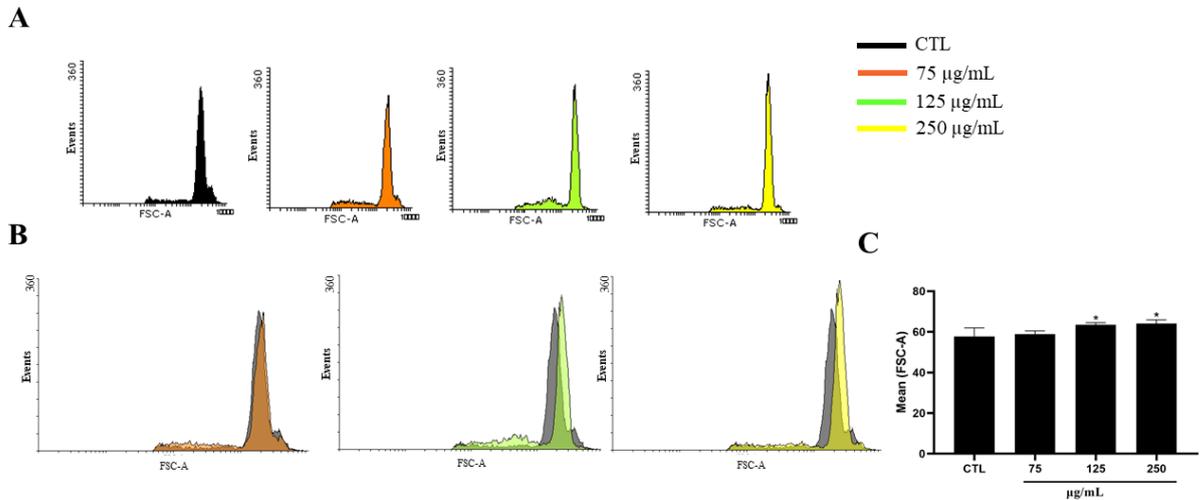


**Figura 4.** Proliferação de células Vero tratadas OCv por 24h. CTL: GRUPO CONTROLE. (B) 75  $\mu\text{g/mL}$ ; (C) 125  $\mu\text{g/mL}$ . (D) 250  $\mu\text{g/mL}$ . Barra de escala=50  $\mu\text{m}$ . E. Contagem média de células  $\pm$  SEM. Os valores refletem as médias obtidas em cinco campos aleatórios para cada um dos três experimentos independentes. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  por ANOVA e teste post-hoc de Tukey.

## 6.3 VOLUME CELULAR

Os dados referentes a análise de volume celular, por citometria de fluxo, teve como objetivo em observar o aumento do tamanho celular induzido pelo referido OCv. Os resultados indicam um aumento no tamanho das células nas concentrações de 125 e 250  $\mu\text{g/mL}$ , tratadas com OCv, quando comparado ao grupo DMSO e controle (Figura 5). Além disso, pode-se

observar uma maior alterações de volume na concentração de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em resposta ao tratamento OCv.

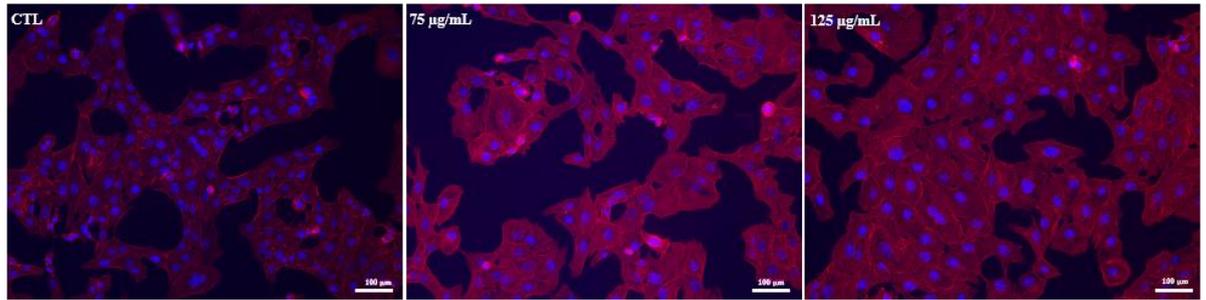


**Figura 5.** Volume celular após tratamento com OCv por 24 h. A. Histograma de cada grupo experimental. B. Histograma de sobreposição demonstrando alterações no tamanho das células nos grupos tratados com 125 e 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de OCv em comparação com o grupo controle. C. Representação gráfica do crescimento celular aumentado. \* $p < 0,05$  (ANOVA e teste post-hoc de Tukey).

#### 6.4 MARCAÇÃO FLUORESCENCIA DIRETA POR FALOIDINA

Para avaliar os efeitos da OCv na organização do citoesqueleto das células, analisamos células da linhagem Vero coradas com faloidina, conjugada com fluorescencia, para visualizar a (F) -actina filamentososa. O núcleo das células do grupo controle e dos grupos tratados com o OCv foram marcados com DAPI (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI).

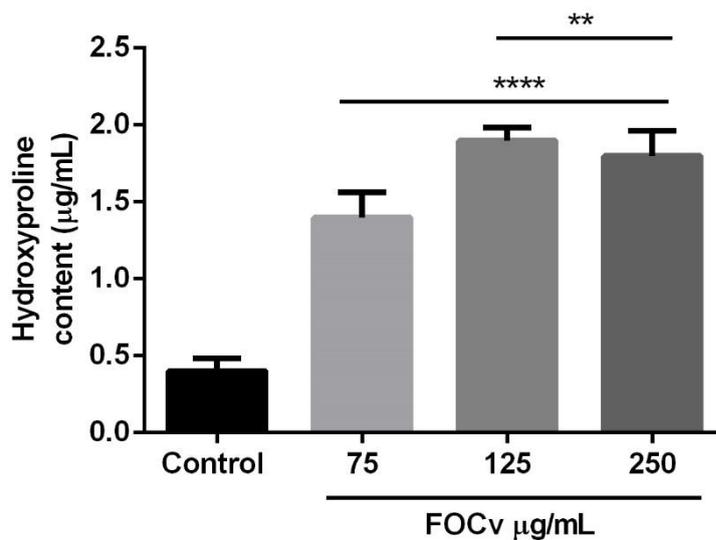
A fluorescencia nos grupos tratados com 75 e 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 horas foi mais intensa quando comparados ao grupo controle, indicando que o OCv induziu aumento na produção de filamentos de actina no interior das células da linhagem Vero (F Figura 6).



**Figura 6.** Marcação fluorescente direta da F-actina em células da linhagem vero com o marcador fluorescente Alexa-Fluor 564-Phalloidin (vermelho). Os núcleos foram corados com DAPI (azul). I. As imagens estão sobrepostas com ambas as marcações. CTL: células não tratadas. B. 75 µg/mL OCv por 24 h. C. 125 µg/mL OCv por 24 h. A. Barra de escala = 100 µm.

## 6.5 QUANTIFICAÇÃO DE HIDROXIPROLINA

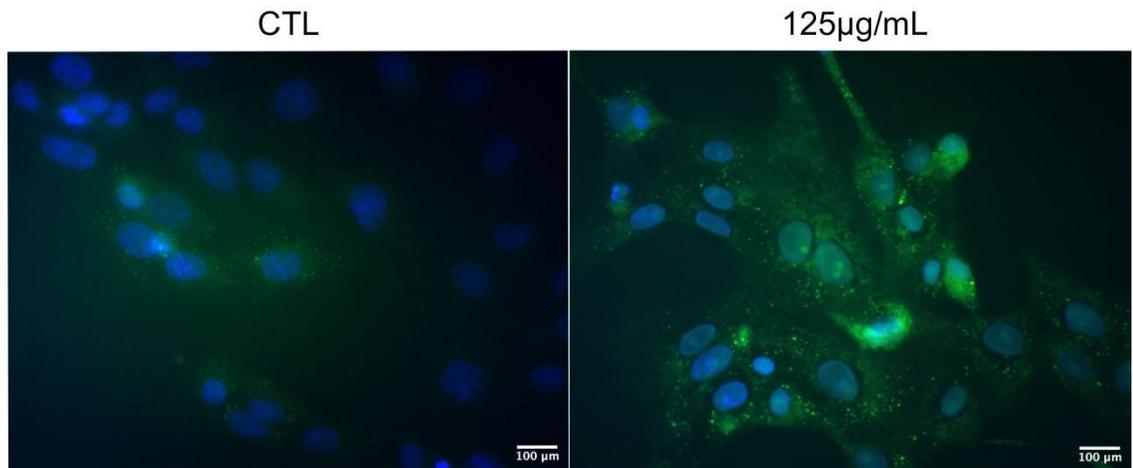
Os resultados do ensaio de hidroxiprolina demonstraram um aumento dos níveis de hidroxiprolina no tratamento de 24h com OCv nas concentrações de 75, 125 e 250 µg/mL em comparação o ao grupo controle, observados na Figura 7.



**Figura 7.** Análise da quantificação do conteúdo de Hidroxiprolina nas células da linhagem Vero tratadas com o OCv. Os controles são células não tratadas. \*\*\*\* $p < 0,0001$  versus controle; \*\* $p < 0,01$  versus 75 µg/mL (ANOVA e teste post-hoc de Tukey).

## 6.6 IMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

A imunofluorescência mostrou o aumento da presença do colágeno tipo III em células da linhagem Vero tratadas com 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com o OCv. Os núcleos das células do grupo controle e dos grupos tratados com OCv foram marcados com DAPI (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI). Observou-se que a fluorescência verde, correspondente ao anticorpo anti colágeno tipo III, é mais intensa no grupo tratado, de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de OCv, em relação ao grupo controle. Indicando que o OCv induziu um aumento na produção de colágeno tipo III recém-formado no interior das células (Figura 8).



**Figura 8.** Microscopia de fluorescência das células linhagem Vero coradas com anticorpo anticolágeno III (verde) após tratamento com OCv 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 24 h. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). Barra de escala = 100  $\mu\text{m}$ .

## 7. DISCUSSÃO

No presente estudo, testamos o efeito do óleo do *Caryocar villosum* (OCv) em células de linhagem VERO (like-fibroblastos) para avaliar a sua ação e correlacioná-la com a resposta a cicatrização a nível celular. Nós avaliamos a citotoxicidade, a proliferação celular, a morfologia das células e componentes da matriz extracelular.

Estudos demonstraram que diferentes drogas e bioprodutos induzem a ativação de fibroblastos (El-Ghalbzouri et al, 2002; Blakaj e Bucala, 2012; Marinho et al, 2013; Addis et al, 2020 Ning et, 2022).

O OCv demonstra diversos indícios importantes no que diz respeito a um possível efeito potencial cicatrizante a nível celular. Este óleo demonstrou um potencial como efeito cicatrizante a partir de características celulares importantes a cerca da cicatrização, alterações morfológicas e fisiológicas nas células vero que inclui o efeito de proliferação celular e alterações no padrão do citoesqueleto, alterando a geometria da célula e aumento na presença de colágeno. Essas observações indicam claramente uma atividade estimuladora por parte do óleo testado referente a proliferação de fibroblasto.

O OCv não demonstrou citotoxicidade para as células da linhagem vero, corroborando com os resultados demonstrados no trabalho de Yamagushi e colaboradores 2017, indicando que o OCv é seguro à aplicabilidade em estudos com células em cultivo celular, já que nenhuma concentração testada foi capaz de causar um percentual significativo de morte celular.

Durante a fase proliferativa do processo da cicatrização ocorre o início da reepitelização; onde primeiramente as células migram para a região da lesão. E ocorre a proliferação dos fibroblastos, o qual é importante para que haja o aumento da densidade celular no “leito da ferida”. Estes eventos são de suma importância para que ocorra a fibroplasia, ou seja, a síntese componentes da matriz extracelular, em especial o colágeno e a formação de tecido de granulação; isto garante que as mesmas possam fornecer adequadamente elementos fisiológicos necessários para os processos posteriores (Landén et al, 2016; Dorante e Ayala, 2019; Rodrigues et al, 2019; Roussele et al, 2019; Addis et al, 2020; Moretti et al, 2022).

A partir dos resultados cerca do ensaio de proliferação celular; podemos demonstrar que o OCv ao aumentar a proliferação das células, contribui para a fase proliferativa (taxa de espessura de células e consequentemente a reepitelização da área lesionadas). Isto não só por acelerar o preenchimento do leito da lesão por células fibroblásticas, como também por poder contribuir ao processo de fibroplasia, com o objetivo de garantir o suprimento e a deposição

adequada de moléculas da MEC.

Ademais, o OCv induziu o aumento dos filamentos de actina nas células (devido a observação de uma marcação mais forte nos grupos tratados). Os filamentos de actinas são componentes do citoesqueleto e estão relacionados a processos celulares que envolvem movimentação celular, em especial o processo de migração celular, importante para processo de cicatrização, que ocorre na fase proliferativa (Fernandez *et al.*, 2024).

Nos resultados adquiridos a partir dos ensaios de hidroxiprolina e imunofluorescência, constatamos que o OCv é capaz de induzir a produção de colágeno. Durante a cicatrização de feridas, o colágeno é importante na determinação da arquitetura, auxíla no suporte do tecido lesionado no processo de cicatrização, afim de fornecer uma sustentação para o local da lesão. A síntese de colágeno é alterada sob diversas condições e esta proteína contribui pra a produção e para a contração da MEC, durante a fase proliferativa e de remodelação do processo de cicatrização (Birk et al, 1990; Bainbridge, 2013; Jiang e Rinkevich, 2021; Moretti et al, 2022).

Estudos anteriores demonstraram que outros óleos de origem vegetal possuem efeito modulador e ativador de fibroblastos (Gonçalves e Marcondis, 2010; Bainbridge, 2013; Jiang e Rinkevich, 2021; Moretti et al, 2022). Essa ativação pode estar diretamente associada ao estímulo da produção de colágeno pelo OCv devido ao aumento da proliferação de fibroblastos.

Juntos, achados deste estudo demonstram a ação do OCv nas células de linhagem Vero possuem uma atuação relevante para o processo de cicatrização; tendo em vista que a proliferação dos fibroblastos, associados a sua capacidade de sintetizar colágeno tem implicações críticas para o processo de cicatrização, no caso deste estudo a nível celular.

A ação do OCv foi promissor em termos de reparo tecidual. Tomados em conjunto os resultados de aumento da proliferação celular, alteração no padrão de citoesqueleto e o aumento da produção de colágeno demonstra que a ação do OCv nas células de linhagem vero pode contribuir positivamente para o processo de cicatrização, como mostrado nesse estudo *in vitro*.

## 8. CONCLUSÃO

O óleo do *Caryocar villosum* demonstrou um alto potencial de atuação para a resolução no processo de cicatrização de feridas no modelo utilizado de células Vero (like-fibroblasto) *in vitro*. O mesmo promoveu a proliferação de células fibroblásticas, mudanças morfológicas e ao aumento na produção de colágeno. Podemos inferir que o OCv por possuir uma combinação de vários compostos bioativos, contribuirá significativamente para novas oportunidades em estratégias terapêuticas que visam estimular o processo de cicatrização de feridas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDIS R, CRUCIANI S, SANTANIELLO S, BELLU E, SARAIS G, VENTURA C, MAIOLI M, PINTORE G. Fibroblast proliferation and migration in wound healing by phytochemicals: evidence for a novel synergic outcome. *Int J Med Sci* **2020**, *17*, 1030-1042.

ALMEIDA M.R; DARIN J D C.; AISSA A F; GOMES T D U H. MERCADANTE AZ.; ANTUNES LMG; BIANCHI ML. Antigenotoxic effects of piquiá (*Caryocar villosum*) in multiple rat organs. *Plant Foods for Human Nutrition*, *67*: 171–177, 2012

BAINBRIDGE, P. Wound healing and the role of fibroblastos. **Journal of wound care**, v. 22, n. 8, Ago., 2013.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 1, Mar., 2005.

BARON JM; GLATZ E; PROKSCH E. Optimal Support of Wound Healing: **New insights. Dermatology** 236:593–600, 2020.

BARRETO GP, BENASSI MT, MERCADANTE AZ. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by mul-tivariate analysis to free radical scavenger activity. **J Braz Chem Soc**. 2009, *20*, 1856–61.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 1ª ed. Livros Técnicos e Científicos: Rio de Janeiro, 1978.

BRAGA, P.F.; Chemical characteristics of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás-Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.29(4):771-77.2009.

BIRK DE; FITCH JM; BABIARZ J; DOANE KJ; LINSENMAYER TF. Collagen

fibrillogenesis in vitro: interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. **Journal of Cell Science** 95, 649-657, 1990

CAÑEDO-DORANTES, L. & CAÑEDO-AYALA, M. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive. **International Journal of Inflammation**, v. 2019, p. 1-15, Jun., 2019.

CÁRDENO A; SOTO MA; LA PAZ SM; BERMÚDEZ B, FRANCISCO J.G. MURIANA FJG; La Lastra CA. Squalene targets pro- and anti-inflammatory mediators and pathways to modulate over-activation of neutrophils, monocytes and macrophages. *Journal of Functional Food*. 14:779-790, 2015. **Centro de Pesquisas econômicas da Amazônia**, v.6, n.5. p. 1-51, 2017.

CHISTÉ RC, FREITAS M, MERCADANTE AZ, FERNANDES E. 2012. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chem.** **135**, 1740–9, 2012.

CHITTURI P, LEASK A. The role of positional information in determining dermal fibroblast diversity. **Matrix Biol.** 2024 Apr;128:31-38. doi: 10.1016/j.matbio.2024.02.009. Epub 2024 Feb 28. PMID: 38423396.

CLARK, R. A. F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. **J InvestDermatol**, v. 11, n. 4, p. 647-661, Out., 1993.

CLARK, R. A. Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin alpha (v) beta3. **Exp Cell Res**, v. 232, n.1, p. 118–126, Abr, 1997.

CLEMENT, C. R. Piquia In: CLAY, J. W. & CLEMENT, C. R. Selected Species and Strategies To Enhance Income Generation from Amazonian Forests. **FAO**: Rome, p. 108–114, 1993.

CURRENT, F. L. Concepts in soft connective tissue wound healing. **Br J Surg**, v. 70, p. 133–140, Mar., 1985.

CRIOLLO-MENDOZA MS, CONTRERAS-ANGULO LA, LEYVA-LÓPEZ N, GUTIÉRREZ-GRIJALVA EP, JIMÉNEZ-ORTEGA LA, HEREDIA JB. Wound Healing Properties of Natural Products: Mechanisms of Action. *Molecules*, 2023, 28, 598.

DE FIGUEIREDO PRL; OLIVEIRA IB; SANTANA NETO JB; DE OLIVEIRA JA; RIBEIRO LB ; VIANA GSB ; ROCHA TM; LEAL LKAM; KERNTOPF MR; FELIPE CFB; COUTINHO HDM; MENEZES IRA. Caryocar coriaceum Wittm. (Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. **Journal of Ethnopharmacology** 191: 87–94, 2016.

DE OLIVEIRA MLM ; PINHEIRO DCSN; TOME AR; MOTA EF; VERDE IAL; PINHEIRO FGM; CAMPELLO CC; MORAIS SM. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of Caryocar coriaceum Wittm. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**. 129: 214-219, 2010.

DESMOULIÈRE, A.; REDARD, M.; DARBY, I. et al. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. **Journal Pathology**. v. 146 p. 56–66, 1995.

DINIZ, M. B.; DINIZ, M. J. T.; SILVA, A. L. F.; BARRIOS, M. L. C.; LIMA, E. B. F. DORANTES LC; AYALA MC Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation*. 2019: Article ID 3706315, 1-15, 2019.

EL-HAMOLY T, ABD EL-RAHMAN SS, AL-ABYAD M. Potential effects of ursodeoxycholic acid on accelerating cutaneous wound healing. **PLOS ONE** 14(12): e0226748, 2019.

EMING SA, MARTIN P. & TOMIC-CANIC M Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med* 6, 265sr6, 2014.

ENGLER, A. J.; SEN, S.; SWEENEY, H. L.; DISCHER, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 677–89, Ago., 2006.

FERREIRA, M. Radioterapia pré e pós-operatória na cicatrização de anastomoses colônicas

em ratos avaliada mediante estudo tensiométrico, histológico e da morfometria do colágeno. Curitiba, 2004. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Fernandez MK, Sinha M, Zidan M, Renz M. Nuclear actin filaments - a historical perspective. **Nucleus**. 2024 Dec;15(1):2320656. doi: 10.1080/19491034.2024.2320656. Epub 2024 Feb 21. PMID: 38384139; PMCID: PMC10885181.

DARNELL J. Integrating cells into tissues. In: **Molecular Cell Biology**. New York, NY: WH Freeman & Co, 2000; 968-1002.

GALUPPO, S. C. GAILIT, J.; CLARKE, C.; NEWMAN, D.; TONNESEN, M. G.; MOESSON, M. W. Documentação do uso e da valorização do óleo do Piquiá (*Caryocar villosum*) e do leite do Amapá-doce (*Brosimum parinarioides*) para a Comunidade de Piquiatuba, Floresta Nacional do Tapajós: estudos físicos, químicos, fitoquímicos e farmacológicos. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, p. 108, 2004.

GARNIER, “Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization,” *Matrix Biology*, 2018.

GONÇALVES E.M.; MARCONDES MCCG. Leucine affects the fibroblastic Vero cells stimulating the cell proliferation and modulating the proteolysis process. **Amino Acids**. 38:145–153, 2010.

GUIDONI M; FIGUEIRA MM; RIBEIRO GP; LENZ D; GRIZOTTO PA; PEREIRA TMC; SHEREN R; BOGUSZ S; FRONZA M. Development and evaluation of a vegetable oil blend formulation for cutaneous wound healing. **Archives of Dermatological Research**. 311:443–452, 2019.

GUILLAMAT-PRATS R. The Role of MSC in Wound Healing, Scarring and Regeneration. **Cells** 2021, 10, 1729-1744.

HINZ, B. The role of myofibroblasts in wound healing, **Current Research in Translational Medicine**, v. 1, p. 1-7, 2016.

HUMPHREY, J. D.; DUFRESNE, E. R.; SCHWARTZ, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 15 , p. 802–812, 2014.

JIANG D; RINKEVICH Y. Distinct fibroblasts in scars and regeneration . *Current Opinion in Genetics & Development*. 70:7–14, 2021.

KENDALL, R. T. & FEGHALI-BOSTWICK, C. A. Fibroblasts in fibrosis: Novel roles and mediators. **Front. Pharmacol.** v. 5, n. 123, Mai., 2014.

LANDÉN NX, LID, STÅHLE M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell Mol Life Sci* **2016**, 73, 3861–3885.

LOUREIRO, A. A.; SILVA, M. F.; ALENCAR, J. C. **Essências madeireiras da Amazônia**. Vol. 1. INPA. Patrocínio da Superintendência da Zona Franca de Manaus – SUFRAMA: Manaus, 245 p., 1979.

LUJANO OLAZABA O, FARROW J, MONKKONEN T. Fibroblast heterogeneity and functions: insights from single-cell sequencing in wound healing, breast cancer, ovarian cancer and melanoma. **Front Genet**. 2024 Mar 8;15:1304853. doi: 10.3389/fgene.2024.1304853. PMID: 38525245; PMCID: PMC10957653.

M. PASPARAKIS, I. HAASE, AND F. O. NESTLE, “Mechanisms regulating skin immunity and inflammation,” **Nature Reviews Immunology**, vol. 14, no. 5, pp. 289– 301, 2014.

MAAROUF, M.; MAAROUF, C. L.; YOSIPOVITCH, G.; SHI, V.Y. The impact of matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep.**, v. 10542, n. 9, p. 1-15, Jul, 2019.

MARIANO,S; BRAIT, J.D.D.A; FARIA, F.P.D; SILVA, S.M.D; OLIVEIRA, S.L.D;

BRAGA, P.F.; Chemical characteristics of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás-Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.29(4):771-77.2009.

MARINHO PC; FERREIRA RN; de CARVALHO JJ. Evaluation of Therapeutic Intervention with a Natural Product in Cutaneous Wound Healing: The Use of Capybara Oil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Volume 2013, Article ID375671.

MARTINS, R. L. & GRIBEL, R. Polinização de *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (*Caryocaraceae*) uma árvore emergente da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 37-45, Mar., 2007.

MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, v. 204, p. 442–444, 1997.

MATOS, F. J. A. (2008), **Plantas Medicinais: Guia de Seleção e Emprego de Plantas Usadas em Fitoterapia no Nordeste do Brasil**. (3ª ed.) Imprensa Universitária, Fortaleza, Brazil, p. 394

MCKEE, T. J.; PERLMAN, G.; MORRIS, M.; KOMAROVA, S. V. Extracellular matrix composition of connective tissues: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep.**, v. 10542, n. 9, p. 1-15, Jul, 2019.

MERCADANTE, A. Z.; ANTU INES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. Antigenotoxic effects of piquiá (*Caryocar villosum*) in multiple rat organs. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, p. 171–177, 2012.

MIRANDA. P. H. OLIVEIRA; MACIEL, P. M. C.; ALBUQUERQUE Y. A. P., SILVA M. S.; SARAIVA R. A. Perfil químico e atividades biológicas do gênero *Caryocar*: Uma revisão de literatura. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v.7, n.1, p.131-152, 2019.

MORETTI L; STALFORT J; BARKER TH; ABEBAYEHU D. The interplay of fibroblasts, the extracellular matrix, and inflammation in scar formation. *J. Biol. Chem.* 298: 1-27, 2022.  
Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat. Rev.Mol. Cell Biol**, v. 3, p. 349–363, 2002.

ROUSSELLE, P. M. EINKE JM; SORG H. Wound Repair and Regeneration *Eur Surg Res* 49:35–43 ,2012.

PAZYAR N, YAGHOOBI R, RAFIIE E, METRABIAN A, FEILY A. Skin Wound Healing and Phytomedicine: a review. *Skin Pharmacol Physiol* **2014**, 27, 303–310.

PETROV, V. V.; FAGARD, R. H.; LIJNEN, P. J. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta 1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. **Hypertension**,v. 39, p. 258–263, 2002.

REINKE JM; SORG H. Wound Repair and Regeneration *Eur Surg Res* 49:35–43 ,2012.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, Jan., 2011.

RIGONATO, V. D. & ALMEIDA, M. G. Cerrado: a fitofisionomia e a interrelação com as populações tradicionais. **Revista Cerrados**, v. 2, n.1, p. 1-16, 2004.

RITTIÉ L. Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. **J Cell Commun Signal** 2016, 10, 103–120.

RODRIGUES M; KOSARIC N; C BONHAM CA; GURTNER GC. Wound healing: a cellular perspective **Physiol Rev** 99: 665–706, 2019

ROWAN MP, CANCIO LC, ELSTER EA, BURMEISTER DM, ROSE LF, NATESAN S, CHAN RK, CHRISTY R.J, CHUNG KK. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care* **2015**, 19, 243-255.

ROXO M; PEIXOTO H; WITTERAUES P; LIMA E; WINK M. Piquiá Shells (Caryocar villosum): A Fruit by-Product with Antioxidant and Antiaging Properties in *Caenorhabditis elegans*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Volume 2020, Article ID 7590707, 19 page.

P. ROUSSELLE, M. MONTMASSON, AND C. GARNIER, “Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization,” **Matrix Biology**, 2018.

SCHULTZ, G. S., DAVIDSON, J. M., KIRSNER, R. S.; BORNSTEIN, P. HERMAN, SHRIVASTAVA A; MISHRAA AK, ALIA SS, AHMADB A, ABUZINADAHC MF, KHANA NA. In vivo models for assesment of wound healing potential: A systematic review. **Wound Medicine** 20: 43-53, 2018.

SCHULTZ, G. S., DAVIDSON, J. M., KIRSNER, R. S.; BORNSTEIN, P. HERMAN, I. M. Dynamic reciprocity in the wound microenvironment. **Wound Repair Regen**, v. 19, p. 134–148, Abr., 2011.

SHANMUGARAJAN TS.; SELVAN NK.; UPPULURI VNVA. Development and characterization of squalene -loaded topical agar -based emulgel scaffod: wound healing potential in full-thickness burn model. **The International Journal of Lower Extremity Wounds** 20: 364–373, 2021.

SHRIVASTAVA A; MISHRAA AK, ALIA SS, AHMADB A, ABUZINADAHC MF, KHANA NA. In vivo models for assesment of wound healing potential: A systematic review. **Wound Medicine** 20: 43-53, 2018.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Fibroblasts-a diverse population at the center of it all. **Int. Rev. Cell Mol. Biol.** 2009, 276, 161–214.

THEOCHARIDIS G, CONNELLY JT. Minor collagens of the skin with not so minor functions. **J Anat.** 2019 Aug;235(2):418-429. doi: 10.1111/joa.12584. Epub 2017 Feb 2. PMID: 31318053; PMCID: PMC6637451.

TOMASEK, J. J.; GABBIANI, G.; HINZ, B.; CHAPONNIER, C.; BROWN, R. A. TRACY LE.; MINASSIAN R A.; CATERSON E.J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. **Advances in Wound Care**, v. 5, n. 3, p. 119–136, 2016.

TRACY, L. E.; MINASIAN, R. A.; CATERSON, E. J. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. **Advances in Wound Care**, v. 5, n. 3, p. 119– 136, 2016.

VASTANO, B. J. T. & BARBOSA, A. P. Propagação vegetativa do piquiá (*Caryocar villosum* Pers.) por estaquia. **Acta Amazonica**. v. 13, p. 143-148. 1983.

WERNER, S.; KRIEG, T.; SMOLA, H. Keratinocyte-fibroblast interactions in woundhealing. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 5, p. 998–1008, 2007.

WILKINSON HN, HARDMAN MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. **Open Biol** 2020, 10, 200223.

XAVIER WKS, MEDEIROS BJ, LIMA CS, FAVACHO HA, DE AGUIAR ANDRADE EH, NEYVA R, ARAÚJO M.. Topical anti-inflammatory action of *Caryocar villosum* oil (Aubl) Pers. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 1, 62, 2011.

YAMAGUCHI KK, LAMARÃO CV, ARANHA ES, SOUZA ROS, OLIVEIRA PDA, VASCONCELLOS MC, LIMA ES, VEIGA-JUNIOR VF. 2017. HPLC-DAD profile of phenolic compounds, cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of the amazon fruit *Caryocar villosum*. **Química Nova** 40, 483–90, 2017



**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

S586e SILVA LOPES, IZABELLA CARLA.  
Efeito do óleo da espécie vegetal *Caryocar villosum* em  
linhagem de células vero in vitro / IZABELLA CARLA SILVA  
LOPES, IZABELLA CARLA SILVA LOPES. — 2024.  
43 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Instituto de Ciências Biológicas, Mestrado Profissional em Ensino  
de Biologia, Belém, 2024.

1. Processo de Cicatrização. 2. *Caryocar villosum*. 3.  
Fibroblastos. 4. Matriz extracelular.. 5. Biodiversidade da  
amazônia. I. Título.

CDD 611.018

---