



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

BRUNO GROSSELLI LANIA

O USO DOS ÓLEOS DE CAFÉ E GIRASSOL EM FERIDAS CUTÂNEAS: EFEITOS
LOCAIS E SISTÊMICOS

*THE USE OF COFFEE AND SUNFLOWER OILS IN CUTANEOUS WOUNDS:
LOCAL AND SYSTEMIC EFFECTS*

CAMPINAS

2018

BRUNO GROSSELLI LANIA

O USO DOS ÓLEOS DE CAFÉ E GIRASSOL EM FERIDAS CUTÂNEAS: EFEITOS
LOCAIS E SISTÊMICOS

*THE USE OF COFFEE AND SUNFLOWER OILS IN CUTANEOUS WOUNDS:
LOCAL AND SYSTEMIC EFFECTS*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração Clínica Médica.

Thesis presented to the School of Medical Sciences of the University of Campinas as part of the requirements demanded to obtain the title of Doctor of Science, concentration area in Internal Medicine.

ORIENTADOR: PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO
BRUNO GROSSELLI LANIA E ORIENTADA
PELO PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES
FERREIRA VELHO.

CAMPINAS

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES, 01-P-04520/2013; FAPESP, 07/59319-5; FUNADERSP, 015/14, 043/16

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4949-7444>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L27u Lania, Bruno Grosselli, 1987-
O uso dos óleos de café e girassol em feridas cutâneas : efeitos locais e sistêmicos / Bruno Grosselli Lania. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Café. 2. Cicatrização. 3. Ferimentos e lesões. 4. Helianthus. 5. Pele. I. Velho, Paulo Eduardo Neves Ferreira, 1966-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The use of coffee and sunflower oils in cutaneous wounds : local and systemic effects

Palavras-chave em inglês:

Coffee

Wound healing

Wounds and injuries

Helianthus

Skin

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho [Orientador]

Aparecida Machado de Moraes

Patrícia Moriel

Marília Marufuji Ogawa

Rosely Moralez de Figueiredo

Data de defesa: 04-07-2018

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

BRUNO GROSSELLI LANIA

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. PAULO EDUARDO NEVES FERREIRA VELHO**
 - 2. PROFA. DRA. APARECIDA MACHADO DE MORAES**
 - 3. PROFA. DRA. PATRÍCIA MORIEL**
 - 4. PROFA. DRA. MARÍLIA MARUFUJI OGAWA**
 - 5. PROFA. DRA. ROSELY MORALES DE FIGUEIREDO**
-

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 04/07/2018

DEDICATÓRIA

A Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, minha esposa e família, pelo apoio até aqui.

Aos animais, que possibilitaram, com suas vidas, a aquisição de todos os resultados deste estudo.

Tudo posso nAquele que me fortalece

Filipenses 4:13

AGRADECIMENTOS

Na minha dissertação de mestrado, iniciei os agradecimentos da seguinte forma: *“Quando era criança, sonhava em ser cientista e achava que conseguiria descobrir e fazer experiências sozinho, embalado pela inocência infantil ao assistir o programa “O Mundo de Beakman”! Mas aprendi que o sonho só se torna realidade quando sonhado junto.”* Chego agora na etapa mais alta da titulação científica, com a segurança de ter atingido meu sonho e cada vez mais convicto de que ciência de qualidade não se faz sozinho.

A realização de meu sonho, concretizado neste trabalho, só foi possível graças ao empenho, apoio e paciência de pessoas às quais dedico meu agradecimento.

A Deus, pelo dom da vida.

À minha amada Paula, pelo amor, compreensão, apoio e ajuda. Perdão pelas “horas roubadas” desde o namoro até os primeiros anos do nosso casamento, para estar no laboratório ou preparando os artigos e a tese.

A meus pais, pelo esforço que fizeram para me proporcionar a melhor formação possível e pelo exemplo de vida. Graças a vocês, consegui completar meu sonho de me tornar cientista!

A meus irmãos Eduardo, Mariana e Daniel por sempre me apoiarem, aconselhando e torcendo pelo meu sucesso.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho por confiar a mim este desafio, pelos conselhos, orientações. Certamente ensinou-me muito mais do que está registrado nesta tese. Devo agradecer por todas as oportunidades, desde o meu primeiro estágio durante a graduação, do qual nunca mais saí.

À Profa. Dra. Maria Letícia Cintra, pelos ensinamentos não apenas em histologia, mas na ciência como um todo. Sua dedicação e disponibilidade, sempre que precisei, foram muito necessárias para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Lício Augusto Velloso por ter permitido o uso de seu laboratório, viabilizando a realização destes experimentos. Sem sua ajuda, este trabalho não seria possível.

À Profa. Dra. Sarah Monte Alegre, por todo o auxílio prestado nas análises das citocinas e por permitir o uso de seu laboratório, possibilitando a obtenção de boa parte dos resultados desta tese.

Ao Dr. Nilson Borlina Maia, pela colaboração dada ao longo de todo o projeto, tanto na execução do projeto quanto nas discussões realizadas.

À Dra. Joseane Morari, pela disponibilidade em todos os momentos, pela paciência em me ensinar a mesma coisa várias vezes, por fazer o trabalho braçal de bancada quando eu não podia, por me auxiliar, mesmo a contragosto, a sacrificar os animais. Durante o período do meu doutorado você foi minha principal “fonte de discussão” para entender os resultados obtidos; sem isso, este trabalho não teria sido realizado com a mesma qualidade.

À Dra. Amanda Roberta de Almeida, também pela disponibilidade em todos os momentos deste projeto. Obrigado por me auxiliar nas práticas que não sabia realizar, pelas discussões relevantes ao trabalho e, principalmente, por sempre me apoiar cientificamente quando estive sem saber o caminho a seguir.

Aos colegas que me auxiliaram ao longo de todo o doutorado: Luís Felipe, Ana Cláudia, Luzia e Aretuza, do laboratório de Anatomia Patológica; Luciene, Karina, Marina, Gislaire, Tânia, Marilene, do laboratório do Prof. Paulo Velho. Obrigado por tudo, dos ensinamentos teóricos e práticos aos cafés e risadas!

Aos membros da banca de qualificação do doutorado: Profa. Dra. Renata Ferreira Magalhães, Profa. Dra. Rosana Maria Alberici Oliveira, Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck e Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade. As contribuições dadas por todos vocês enriqueceram este trabalho e deram a base para ambas as publicações aqui apresentadas.

Ao Prof. Dr. Leandro Wang Hantao, Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano e Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli, por abrirem as portas de seus laboratórios e permitirem a realização das análises da composição dos óleos de café.

À Capes, por conceder a bolsa de doutorado ao longo do projeto.

À Fapesp e Funadersp, pelo financiamento deste projeto.

RESUMO

Introdução: as feridas são um comum problema de saúde. O uso de plantas medicinais e seus derivados está aumentando e aproximadamente um terço de todos os fitoterápicos tradicionais são destinados ao tratamento de feridas. Os produtos naturais usados nesses tratamentos incluem os óleos vegetais, que são ricos em ácidos graxos essenciais. O café e o girassol, plantas cultivadas em larga escala devido à importância econômica que possuem, geram óleos que também contêm ácidos graxos essenciais. Uma vez em contato com uma superfície ulcerada, os óleos vegetais atingem os vasos sanguíneos e linfáticos, provocando, potencialmente, efeitos locais e sistêmicos.

Objetivos: este estudo avaliou os possíveis efeitos locais e sistêmicos do uso do óleo de girassol e óleos de café, obtidos de grãos crus e torrados, aplicados topicamente em feridas cutâneas de ratos.

Métodos: sobre feridas cirúrgicas circulares, produzidas pela exérese da pele com bisturi do tipo *punch* de 6 mm em ambiente controlado, no dorso de 90 ratos foram aplicados os seguintes tratamentos nos mesmos animais divididos em seis grupos: solução salina (SS) e óleo mineral (OM), OM e óleo de girassol (OG), OM e óleo de café verde (OCV), OM e óleo de café torrado (OCT), OM e borra do óleo de café verde (BOCV) e OM e óleo de café torrado (BOCV). O processo de cicatrização foi avaliado por meio do estudo histológico / morfométrico por microscopia óptica; microscopia de geração de segundo harmônico (SHG) e da quantificação tissular (por q-PCR) e sérica (por Elisa) de fatores que atuam na cicatrização (IL-2, IL-4, IL-12, IL-6, IL-23, IGF-1, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , adiponectina e leptina).

Resultados: Animais tratados com OCT apresentaram cicatrização mais rápida, maior expressão de RNAm de IGF-1, IL-6 e IL-23 nos estágios iniciais de cicatrização; maior expressão de IL-12 nos últimos estágios e níveis séricos mais baixos de IFN- γ . O tratamento com OCV levou a uma expressão mais elevada de RNAm de IL-6 e IL-23 nos estágios iniciais da cicatrização. O tratamento também produziu níveis séricos mais altos de IFN- α durante todo o experimento e menores níveis de IL-4, adiponectina e IFN- γ . A análise de SHG mostrou uma maior densidade de colágeno nos tratamentos com OCT e OCV.

Animais tratados com OG apresentaram maior expressão de RNAm de IGF-1, leptina, IL-6 e IFN- γ e menores níveis séricos de IL-6 do que os animais do grupo controle. A análise de SHG não mostrou diferença na densidade de colágeno entre os animais tratados com OM e OG.

Conclusões: O tratamento tópico com óleos de café levou a ações locais e sistêmicas e à cicatrização mais rápida de feridas em ratos. O tratamento com óleo de girassol induziu efeitos tópicos e sistêmicos. Como o óleo é amplamente utilizado para diminuir o tempo de cicatrização de úlceras, novos estudos são necessários para avaliar a segurança do tratamento e possíveis efeitos indesejados do uso tópico de óleo vegetal para lesões cutâneas.

Palavras-chave: Café; Cicatrização; Feridas; Helianthus; Modelo Animal; Pele; Segurança de Produtos ao Consumidor.

ABSTRACT

Introduction: wounds are a common health problem. The use of medicinal plants and their derivatives is increasing, and approximately one-third of all traditional herbal medicines are intended for wound treatment. Natural products used in these treatments include vegetable oils, which are rich in essential fatty acids. Coffee and sunflower are massively cultivated since its economic importance; the oils obtained from these plants also contain essential fatty acids. Once in contact with an ulcerative surface, the oil reaches the blood and lymphatic vessels, thus eliciting systemic effects.

Objectives: this study evaluated the local and possible systemic effects of sunflower and coffee oils applied topically to rat wounds.

Methods: on circular surgical wounds produced by excision of skin with a 6 mm punch at a controlled environment, in the back of 90 rats the following treatments was applied on the same animals divided into six groups: saline solution (SS) and mineral oil (MO), MO and sunflower oil (SO), MO and green coffee oil (GCO), MO and roasted coffee oil (RCO), MO and green coffee oil grounds (GCOG) or MO and roasted coffee oil grounds (RCOG). The healing process was evaluated by histological / morphometric optical microscopy examination; second harmonics generation (SHG) microscopy and quantification in tissue (by q-PCR) and serum (by ELISA) of factors that act in wound healing (IL-2, IL-4, IL-12, IL-6, IL-23, IGF-1, IFN- α , IFN- γ , TNF- α , adiponectin and leptin).

Results: RCO treated animals presented faster wound healing, higher mRNA expression of IGF-1, IL-6 and IL-23 in early stages of wound healing; higher IL-12 in the later stages; and lower serum levels of IFN- γ . GCO treatment led to higher mRNA expression of IL-6 and IL-23 in the early stages. The RCO treatment also produced higher serum IFN- α levels throughout the experiment and lower levels of IL-4, adiponectin and IFN- γ . The SHG analysis showed a higher collagen density in the RCO and GCO treatments.

SO-treated animals had higher IGF-1, leptin, IL-6 and IFN- γ mRNA expression and lower serum IL-6 levels than the control animals. SHG analysis showed no difference in collagen density between the animals treated with MO and SO.

Conclusion: Topical treatment with coffee oils led to systemic actions and faster wound healing in rats. SO treatment induces topical and systemic effects, lowering IL-6 levels in the serum. As the oil is widely used to shorten ulcer healing time, studies are needed to evaluate the treatment safety and possible undesired effects of topical vegetal oil use for skin lesions.

Key words: Animal Model; Coffee; Consumer Product Safety; Helianthus; Skin; Wound; Wound Healing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema das feridas no dorso dos animais.....	40
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Resumo das citocinas pró-cicatriciais.....	24
Quadro 2. Resumo das citocinas anti-cicatriciais.....	25
Quadro 3. Lista dos diferentes tratamentos em cada grupo.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C. = Antes de Cristo.

AGE = Ácidos graxos essenciais.

AOCS = *American Oil Chemist's Society* - Sociedade Americana dos Químicos de Óleos.

BOCT = Borra do óleo de café torrado.

BOCV = Borra do óleo de café verde.

BSTFA = N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida.

CA = Califórnia.

cm = centímetro.

cDNA = Ácido desoxirribonucleico complementar.

Cemib = Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica.

Ceua = Comissão de Ética no Uso Animal.

CT = *Cycle threshold* – ciclo limiar.

DNA = Ácido desoxirribonucleico.

EFA = *Essential Fatty Acids* - Ácidos graxos essenciais.

EGF = Fator de crescimento epidérmico.

Elisa = Imunoensaio associado a enzimas.

EUA = Estados Unidos da América.

FFNSC = Biblioteca do espectro de massa de sabores e fragrâncias de compostos naturais e sintéticos.

GAPD = Gliceraldeído-fosfato desidrogenase.

GC = Cromatografia gasosa.

GC-MS = Cromatografia gasosa - espectrometria de massas.

GCO = *Green coffee oil* - Óleo de café verde.

GCOG = *Green coffee oil grounds* - Borra do óleo de café verde.

h = Hora.

HE = Hematoxilina e eosina.

IFN = Intérferon.

Ig = Imunoglobulina.

IGF-1 = Fator de crescimento insulina-símile 1.

IL = Interleucina.

Infabric = Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular.

kg = Quilograma.

Laser = *light amplification by stimulated emission of radiation* - amplificação da luz por emissão estimulada de radiação.

m = Metro.

m/z = Unidade de medida arbitraria em espectrometria de massas.

MD-GF = Fatores de crescimento derivados do macrófago.

MEC = Matriz extracelular.

min = Minuto.

mL = Mililitro.

mm = Milímetros.

MN = Mineápolis.

MO = *Mineral oil* – óleo mineral.

MO = Missouri.

NIST = Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos EUA.

nm = Nanômetros.

°C = Graus Celsius.

OCT = Óleo de café torrado.

OCV = Óleo de café verde.

OG = Óleo de girassol.

OM = Óleo mineral.

PA = Pensilvânia.

PCR = Reação em cadeia da polimerase.

qPCR = Reação em cadeia da polimerase quantitativa.

RCO = *Roasted coffee oil* - Óleo de café torrado.

RCOG = *Roasted coffee oil grounds* - Borra óleo de café torrado.

RNA = Ácido ribonucleico.

RNA_m = Ácido ribonucleico mensageiro.

ROS = Espécies reativas de oxigênio.

SO = *Sunflower oil* – óleo de girassol.

SHG = Geração por segundo harmônico.

s = Segundo.

SS = Solução salina.

TCMS = Trimetilclorosilano.

TEWL = *Transepidermal water loss* - Perda de água transepidérmica.

TGF = Fator de crescimento transformador.

TNF = Fator de necrose tumoral.

Unicamp = Universidade Estadual de Campinas.

UV = Ultravioleta.

VEGF-1 = Fator de crescimento vasculoendotelial 1.

μL = Microlitro.

μm = Micrômetro.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. A pele.....	18
1.2. O processo cicatricial	20
1.3. Terapêuticas da cicatrização.....	25
1.4. Produtos naturais para cicatrização	27
1.5. O uso de óleos ricos em ácidos graxos essenciais para tratamento da pele 29	
1.5.1. O uso de óleos de café para tratamento da pele.....	30
1.5.2. O uso de óleo de girassol na pele.....	31
1.6. Segurança no uso de produtos naturais.....	33
2. OBJETIVOS	35
3. METODOLOGIA.....	36
3.1. Obtenção dos cafés para uso cru e para torra	36
3.2. Extração e filtração dos óleos de café cru e torrado	37
3.3. Determinação dos ácidos graxos presentes nos óleos de café	37
3.4. Determinação da composição fenólica dos óleos de café	38
3.5. Óleo de girassol	38
3.6. Experimentação animal.....	39
3.7. Preparo do animal.....	41
3.8. Eutanásia dos animais e coleta de material para análises	42
3.9. Processamento das amostras para histologia	43
3.10. Análise histológica	44
3.11. Microscopia por Geração do Segundo Harmônico (SHG).....	44
3.12. Análise das citocinas no tecido cicatricial - extração de RNA.....	45
3.13. PCR quantitativo (qPCR) – PCR <i>real time</i>	46

3.14.	Validação da eficiência dos genes de interesse.....	47
3.15.	Análise de citocinas no soro por Elisa.....	48
3.16.	Análise estatística.....	49
4.	RESULTADOS.....	50
4.1.	Artigo 1.....	50
4.2.	Artigo 2.....	79
5.	DISCUSSÃO GERAL.....	101
6.	CONCLUSÕES.....	109
7.	BIBLIOGRAFIA.....	110
8.	ANEXOS.....	125
8.1.	Carta de aprovação do Ceua.....	125

1. INTRODUÇÃO

1.1. A pele

A maioria dos organismos vivos conhecidos apresentam uma camada externa que delimita o corpo e o mundo externo. Esta camada é a pele, o maior órgão do corpo humano, composta por complexa estrutura de diferentes tecidos relacionados entre si a fim de poder desempenhar as suas funções. Ela representa cerca de 15% do peso corporal humano e sua composição pode ser considerada heterogênea, apresentando grandes variações ao longo de sua extensão (1).

Entre essas funções, pode-se citar a proteção contra danos físicos (como a radiação), contra patógenos, controle de entrada e saída de substâncias, recepção e transmissão de sinais para outros organismos, assim como perceber o ambiente ao redor (2), perda de calor e umidade e também como um órgão ativo do sistema imune, pois possui o tecido linfoide associado à pele (3).

Este órgão é constituído por epiderme, camada mais superficial composta por subcamadas como os estratos córneo, granular, lúcido, espinhoso, basal (4) (originadas pelo folheto embrionário ectodérmico), possuindo função de revestimento de fato do organismo e controle de temperatura e perda de água, e a lâmina basal, que faz conexão com a derme, camada intermediária que possui função de sustentação mecânica e nutricional (originada pelo folheto embrionário mesodérmico) e por hipoderme, porção mais interna da pele que faz conexão com os órgãos e tecidos adjacentes, com função de proteção térmica, mecânica e de reserva de lipídeos para o organismo (5).

A epiderme é composta por quatro tipos celulares diferentes: os queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Além destes, estão presentes neste tecido os anexos epidérmicos: glândulas sebáceas e sudoríparas, aparato ungueal e folículos pilosos (6).

Os queratinócitos são a maior população (e mais externa) da epiderme, formando um epitélio estratificado, no qual as células mais distantes dos vasos

sanguíneos dérmicos morrem, sofrendo descamação constante (7). Os melanócitos são células derivadas da crista neural e residem na junção dermoepidérmica da pele, possuem aspecto dendrítico e são responsáveis pela produção de melanina, distribuindo-a para os queratinócitos (8). As células de Langerhans são células dendríticas sentinelas presentes na pele; desta forma, atuam como células apresentadoras de antígenos pelos Complexos de Histocompatibilidade Maior do tipo I e II (9). Por último, as células de Merkel são encontradas entre o estrato basal e o tecido conjuntivo da derme, com função neurosecretora e tátil (10).

A derme é composta por componentes celulares, a saber: fibroblastos, células endoteliais, células dendríticas, macrófagos, linfócitos entre outras. Além destas células, uma porção muito importante deste tecido é a matriz extracelular (MEC), responsável por muitas das características da pele (6).

Os fibroblastos são as células essenciais, responsáveis por produzir e organizar a MEC assim como por realizar a comunicação entre os diferentes tipos celulares, podendo atuar em processos fisiológicos, fagocíticos e de contração (11-13). Os dendrócitos são divididos em dois subtipos: os do tipo I, que secretam o fator de coagulação XIIIa+, encontrados ao redor dos vasos superficiais e associados aos macrófagos e mastócitos (14) e os do tipo II, que expressam a glicoproteína CD34, sendo encontrados ao redor dos anexos da pele e entre feixes colágenos (15). Os mastócitos, linfócitos T e macrófagos fazem parte do sistema imune da pele, também estão localizados próximos aos vasos sanguíneos e anexos cutâneos e atuam diretamente na defesa e inflamação deste órgão (16).

A MEC dérmica é composta por fibras colágenas, fibras elásticas, substância fundamental e outras proteínas como lamininas, heparan sulfato, nidogênio (ou entactina), fibronectina, tenascina, entre outros. Esses fatores, não são importantes apenas para manter as funções da pele, são também necessários no processo cicatricial (17).

Além destes componentes, a derme possui extensa rede vascular dividida em plexos vasculares horizontais interligados, por vasos comunicantes verticais. Esta rede é responsável pela nutrição da pele e está envolvida diretamente nos processos de regulação térmica, controle da pressão arterial, reações imunológicas e cicatrização (18).

1.2. O processo cicatricial

A manutenção da integridade da pele é vital para os animais se manterem protegidos da desidratação, entrada de patógenos, perda de sangue e outros fatores já citados. Para isso, os animais desenvolveram um mecanismo sofisticado de reparação do tecido lesionado, chamado de cicatrização, na qual ocorre a substituição da derme ulcerada, sendo a re-epitelização da úlcera a finalidade deste processo (19).

As tentativas de intervir no processo da cicatrização de feridas, sejam elas acidentais ou intencionalmente promovidas durante procedimentos cirúrgicos, remontam à antiguidade. A incidência e a prevalência de úlceras agudas e crônicas é alta em todo o mundo (20), repercutindo em elevados custos financeiros (21-23). Embora, no Brasil, não se encontrem dados precisos, alguns trabalhos demonstram que a cronificação de feridas tem grande impacto psicossocial e econômico. Em revisão publicada em 2016, um grupo de estudos da Universidade Federal de Minas Gerais relata que a prevalência de feridas agudas com complicação no Brasil possui valores similares aos encontrados nos Estados Unidos da América (EUA), de 20,8% (24). Alguns estudos indicam que o valor do tratamento de úlceras agudas pode variar de R\$32,00 a R\$1.500,10 por paciente, dependendo da extensão da lesão (25). No caso de úlceras crônicas o custo por paciente é em torno de R\$ 36.629,95, podendo chegar a R\$ 445.664,38 anuais. Em 2010, foi uma das principais causas de afastamento do trabalho no Brasil (26).

Muitas variáveis, tanto de ordem geral como local, influenciam esse longo e complexo processo de cicatrização. Dos fatores gerais, citam-se a idade, o estado nutricional do paciente, a existência de doenças de base, como diabetes, alterações cardiocirculatórias e de coagulação, aterosclerose, disfunção renal, quadros infecciosos sistêmicos e uso de medicamentos. Além deles, interferem também a localização anatômica da lesão, raça, técnica cirúrgica utilizada, entre outros (27).

Para que uma úlcera cutânea apresente cicatrização, ocorre, em nível celular e molecular, uma cascata de eventos que trabalham em sinergia para a re-epitelização e reconstituição do tecido lesado (28).

O processo de cicatrização pode ser dividido, de forma didática, em quatro fases que se sobrepõem: hemostática, inflamatória, proliferativa e de remodelação (29).

Imediatamente após a lesão, é iniciada a fase de coagulação e hemostasia; o principal objetivo do organismo nesta fase é evitar a perda excessiva de sangue. Um segundo objetivo desta fase é prover uma matriz para as células atuantes na fase seguinte da cicatrização. Um dos fatores participantes nesta fase é a oclusão dos vasos sanguíneos locais devido à contração da musculatura lisa. Como somente esta ação não é suficiente para impedir o sangramento por um longo período, a formação do coágulo de fibrina também é importante (29).

A fase inflamatória, depois de iniciada a coagulação hemostática, tem por função estabelecer uma barreira imune, ocorrendo tanto a resposta humoral quanto a celular; este processo pode ser subdividido em duas etapas: fase inicial e fase tardia (30). Inúmeros mediadores químicos são liberados por células inflamatórias e células do próprio tecido. Nos três primeiros dias, predominam a exsudação e ação dos neutrófilos, responsáveis pela fagocitose de bactérias, produtos necróticos e liberação de enzimas líticas. Estas células podem ser ativadas no local da ferida por citocinas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e outras proteínas, como proteases, e do complemento. Além disto, a sobrevivência destas células no local depende da presença de fatores como a interleucina (IL) 2 (19). Após o término de sua ação, estas células devem ser eliminadas do local para o processo continuar; nesta fase, monócitos e macrófagos são recrutados na área da lesão. As células remanescentes e os corpos apoptóticos serão eliminados pelos macrófagos (31), no início da subfase tardia. Os macrófagos aparecem entre 48 a 72 horas após a lesão, continuam o trabalho fagocitário e são importantes nas fases tardias da cicatrização, pois atuam como reguladores do processo, produzindo muitos comunicadores celulares importantes, como os fatores de crescimento teciduais (32). Algumas substâncias irão atuar nesta fase, para realizar a transição do estado latente para o ativo nos macrófagos e monócitos, como o TNF- α e o interferon- γ (IFN- γ). Estas células são responsáveis por sintetizar várias substâncias que irão regular o processo cicatricial, ora atuando como substâncias anti-inflamatórias ora atuando como pró-inflamatórias (33).

Os linfócitos aparecem por último na área cicatricial, aproximadamente três a quatro dias após a lesão tecidual. Estas células são atraídas por vários fatores, como a IL-1, subprodutos da quebra do colágeno, imunoglobulina G (IgG) entre outros (30). As linfocinas, por eles liberadas, como as IL-2, 4, 6 e 12 (34), têm influência na ação dos macrófagos e muitas outras células (27), auxiliando, por exemplo, no acúmulo do colágeno e angiogênese na área cicatricial (35, 36).

Entre as substâncias produzidas por outras células que podem regular o perfil inflamatório está a adiponectina, produzida por adipócitos. Esta adipocina possui ação anti-inflamatória, podendo diminuir a expressão de IL-17, TNF- α e IL-6 (37). Baixos níveis de adiponectina já foram associados com o perfil inflamatório da psoríase (38).

A fase proliferativa é responsável pelo fechamento propriamente dito da lesão. Em humanos ela inicia no terceiro dia após a lesão e pode durar até duas semanas. Pode-se dizer que a fase de proliferação é dividida em re-epitelização, angiogênese e fibroplasia (27).

A re-epitelização começa ainda durante a fase inflamatória, onde os queratinócitos presentes na borda da lesão e ao redor de anexos epidérmicos (caso estes tenham sido preservados) migrarão em direção ao centro da lesão para o fechamento da mesma. Para que isso ocorra, os queratinócitos alteram seu perfil de adesão e diferenciação, tornam-se migratórios, movendo ao longo da MEC provisória, protegem-se contra elementos presentes na área cicatricial, tais como espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteases, proliferam-se para repor as células perdidas e cobrir a área lesionada; assim que a re-epitelização é terminada, estas células retornam ao estado original (19). O pico da proliferação dos queratinócitos ocorre em torno do segundo dia após o ferimento e mantém-se alto por até duas semanas em humanos (39). Vários fatores de crescimento e citocinas promovem a proliferação e migração dos queratinócitos, como o TNF- α , o fator de crescimento insulina-símile-1 (IGF-1) (40) e a leptina, que pode induzir este resultado quando aplicada localmente (41, 42). A adiponectina também pode estar envolvida com a re-epitelização em feridas cutâneas, tanto promovendo a divisão e migração dos queratinócitos, quanto regulando esse processo nas feridas de indivíduos diabéticos (43, 44).

Para que todo o processo cicatricial ocorra de forma satisfatória, é necessário que diversos fatores exógenos à lesão cheguem ao local e assim as células responsáveis por este processo tenham acesso aos nutrientes necessários. Desta forma, a neovascularização é muito importante para o tecido de granulação e a angiogênese também tem início durante a fase inflamatória. Durante a angiogênese, as células endoteliais migram, proliferam-se e formam novos vasos no local da lesão. Ao final da formação da MEC provisória, o número de vasos sanguíneos na lesão decresce por apoptose. Este processo também é mediado por diversos fatores de crescimento como fator de crescimento vasculoendotelial-1 (VEGF-1), fator de transformação do crescimento- β (TGF- β), fator de crescimento epidérmico (EGF), entre outros (40).

A fibroplasia é caracterizada pela migração dos fibroblastos, em que a maioria destas células provém de células progenitoras da derme profunda e da hipoderme, que produzem muitas moléculas (fibronectina, vitronectina, tenascina, proteoglicanos) com função de suporte para a migração destas células (45). Neste início da atuação dos fibroblastos, a produção de colágeno é suprimida e a de fibronectina aumenta, assim como expressam mais receptores para esta última substância (46, 47). Após isso, há a deposição da nova MEC, que substituirá a provisória, com a produção de colágeno (inicialmente do tipo III e após, conforme a cicatriz amadurece, do tipo I). Toda esta diferenciação que ocorre com os fibroblastos também é mediada por citocinas como o IGF-1 e TGF- β (48). O IFN- α é uma substância que pode atuar para regular a nova MEC, possui atividade antifibrótica regulando a síntese e atividade do colágeno, glicosaminoglicanos e colagenase (49).

Outro papel importante desempenhado pelos fibroblastos é o da contração da área cicatricial. Isto pode ocorrer pois estas células podem modificar a expressão dos filamentos de α -actina, transformando-se em miofibroblastos (50). Estas células possuem capacidade de contração e, conseqüentemente, podem diminuir o tamanho da área cicatricial, auxiliando no aumento da tensão do novo tecido. Os fibroblastos devem ser eliminados por apoptose junto com o tecido de granulação, para evitar anormalidades na pele recém-formada (51).

A remodelação é a última fase, dura meses, e é responsável pelo aumento da força de tensão e diminuição do tamanho da cicatriz. Uma das mudanças é a

reestruturação da MEC, na qual a matriz colágena se organiza em agregados mais espessos e ligados, assim como o número de fibroblastos, células inflamatórias e endoteliais decresce e a reabsorção de água permitem aumento da força da cicatriz, diminuindo a sua espessura (52). Paulatinamente, a neovascularização local diminui, de forma que a área vai perdendo o eritema. No final, a área de uma cicatriz não complicada tem cerca de 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e é plana (53). Existem estudos relacionando a força da tensão com a resolução da cicatrização, em que processos cicatriciais submetidos a grandes forças tensionais tendem a gerar cicatrizes hipertróficas e que, ao aliviar a tensão local com a técnica de Z-plastia, por exemplo, houve significativa melhora do resultado em paciente humano, ou suavizando a MEC sobre a qual será formada a cicatriz (54-56). Neste momento, tem-se uma cicatriz madura. É importante lembrar, porém, que a cicatriz continua a se remodelar por um longo período após o ferimento, não podendo ser considerada como estável e finalizada por um período inferior a dois anos (57). Os quadros 1 e 2 abaixo resumem os efeitos de algumas das substâncias presentes na cascata de eventos da cicatrização estudadas nos trabalhos apresentados na seção “Resultados” desta tese, separados como substâncias pró-cicatriciais ou anti-cicatriciais, dependendo do momento em que aparecem no processo.

Quadro 1. Resumo das citocinas pró-cicatriciais, indicando suas ações e locais de produção no organismo.

Citocina	Ação	Produção
IL-2	Aumenta metabolismo dos fibroblastos	Linfócito T
IL-4	Síntese de colágeno	Linfócito T, mastócito, basófilo
IL-6	Inflamação, fibroblastos, re-epitelização,	Neutrófilo, macrófago, fibroblasto
IL-23	Estimula células epiteliais, endoteliais e fibroblastos	Neutrófilo, células dendríticas
IGF-1	Fibroblastos, produção de MEC, migração de queratinócitos	Macrófago, fibroblasto, queratinócito
Leptina	Proliferação queratinócitos	Adipócitos

Quadro 2. Resumo das citocinas anti-cicatriciais, indicando suas ações e locais de produção no organismo.

Citocina	Ação	Produção
Adiponectina	Diminui a proliferação de queratinócitos	Adipócitos
IL-12	Anti-angiogênico, estimula TNF e IFN	Macrófagos, neutrófilos células dendríticas,
IFN- α e γ	Ativa macrófagos e neutrófilos, retarda síntese de colágeno	Linfócito T, macrófago
TNF-α	Lentifica se aumentada	Macrófago, linfócito T

Todo este conhecimento acerca da biologia da cicatrização tem grande importância médica para o tratamento e resolução de feridas cutâneas. Qual o melhor momento e a escolha da forma de intervenção no ferimento são condutas que devem ser tomadas levando em consideração aspectos como a facilidade do tratamento para o paciente, adesão do paciente ao tratamento, tamanho da lesão, idade do paciente, custo total, entre outros (53).

1.3 Terapêuticas da cicatrização

Existem várias formas de tratar a pele lesionada. A escolha dos profissionais (médicos, dermatologistas ou não, e enfermeiros) dependerá de como é a ferida, se foi feita cirurgicamente ou decorrente de acidente, para que todo o processo cicatricial ocorra da melhor forma possível (58). Entre as diferentes abordagens existentes, está o emprego de diferentes tipos de curativos.

O uso de curativos remonta da antiguidade, tendo relatos de mais de 4.000 anos de idade do uso de tecidos de linho em ferimentos, até a gaze de algodão ser produzida no final do século XIX. Entre os relatos médicos mais antigos está o Papiro de Edwin Smith, texto de medicina egípcia datado do século XVII A.C., onde há a

descrição do uso de tecidos de linho e emplastro para o tratamento de feridas abertas (59).

Para que a cicatrização ocorra de forma satisfatória, dois aspectos devem sempre ser considerados: a umidade e a quantidade de oxigênio disponível na lesão. O conhecimento de que manter a ferida úmida e fechada melhora o resultado do processo cicatricial já foi comprovada (60, 61). Em 1948 o “efeito de câmara úmida” foi descrito para tratamento de úlceras cutâneas (62) e em 1950 um novo trabalho foi publicado com os resultados de um estudo que mostrou a eficácia do uso de curativos semi-oclusivos para o tratamento de feridas pequenas (63). Após 12 anos, em 1962 foi publicado outro trabalho no qual os autores provaram resultados até 30% melhores na resolução de feridas tratadas com curativos oclusivos quando comparados com feridas abertas (“tratamento seco”) (64).

O curativo funciona como substituto do epitélio perdido por ferimento. Como explicado anteriormente, o processo cicatricial é complexo e dependente de muitos fatores. Assim o curativo possuirá diversas funções, tais como prover meio ótimo para o processo cicatricial acontecer de forma rápida e impedir a entrada de micro-organismos, substâncias cáusticas e novos traumas no local, principalmente durante as fases iniciais.

Além disso, um curativo ideal deve ser adaptável ao formato da ferida e do local da mesma no organismo (por exemplo, áreas de articulação como joelho e cotovelo), ser capaz de absorver exsudatos da lesão sem deixá-la seca, prover pressão para ocorrer hemostasia e prevenir vazamentos. Mais ainda, deverá eliminar a dor, sustentar o tecido cicatricial e os adjacentes, promover a re-epitelização e ter remoção e aplicação fáceis, minimizando a perda de novos tecidos durante sua troca. Para que possa realizar sua função, o material de que é feito também deverá ser pensado e idealmente inerte, ter boa relação custo / benefício (53, 58, 65, 66). Estas características podem aumentar a adesão dos pacientes ao tratamento proposto pelos profissionais da saúde para sua recuperação.

Deve-se considerar que a utilização de recursos para otimizar a cicatrização e reparação tecidual é um processo multifatorial e de caráter multidisciplinar (67), que precisa levar em conta os seguintes parâmetros: o paciente saber qual o melhor tratamento, os profissionais de saúde terem conhecimento do

assunto e possibilidade de escolher o melhor tratamento, as instituições de saúde públicas e privadas, que lidam com recursos financeiros, e a indústria, que pesquisa, desenvolve e produz materiais e produtos para cicatrização, e espera ver seus produtos difundidos no mercado (68).

A importância de manter o local úmido é alta, principalmente para evitar a dessecação, formação de crostas, concreções e até escaras. Para que a migração dos queratinócitos ocorra, é necessário que o ambiente esteja úmido; se isto não ocorrer, as células migrarão através de camadas mais profundas da ferida, onde haja umidade que permita este movimento. Além disso, a umidade permite também que as citocinas e fatores de crescimento exerçam sua função, servindo como solvente destas substâncias e permitindo que estas alcancem as diferentes células do local (69).

Em relação ao oxigênio, embora este seja necessário para a migração e mitose celular, a hipóxia acelerará a angiogênese. A migração dos queratinócitos e a formação do tecido de granulação são inibidas sob altas concentrações de oxigênio. Desta forma, é importante manter uma baixa tensão de oxigênio, fator que induz a produção de fatores de crescimento derivados do macrófago (MD-GF) (70).

As características ideais para o tratamento das lesões podem ser atingidas com diferentes tipos de curativos.

1.4 Produtos naturais para cicatrização

Por ser uma área com grande interesse econômico mundial, muitas pesquisas são realizadas no campo da cicatrização e dos curativos, mesmo que já existam diversos produtos para esta finalidade. Muito há para se pesquisar, não só buscando aperfeiçoar tais recursos, como também torná-los acessíveis a maior número de pessoas, uma vez que feridas agudas na pele ocorrem em qualquer classe social. Isto pode ser atingido mediante o desenvolvimento de tecnologias de baixo custo, igualmente eficientes, que aproveitem matérias-primas encontradas na região, pois um dos desafios para o profissional e paciente é o elevado custo de tais recursos (26).

O uso de produtos naturais para tratamentos diversos começou como medicina popular e data, nos Estados Unidos da América, da época colonial (71). Neste país, atualmente há um aumento no uso de tratamentos naturais para diversas condições, havendo inclusive maior número de consultas de medicina alternativa do que atendimento médico primário (72). Embora muitas pessoas ainda vejam o uso de produtos naturais com ceticismo, é importante lembrar que muitos dos medicamentos disponíveis hoje em dia são derivados da observação dos resultados do uso destes produtos (73).

O uso de medicamentos alternativos / naturais no Brasil para tratamento de feridas ainda é comum nos dias de hoje, tanto pelo conhecimento tradicional como pelo alto custo de diversos tratamentos como curativos de hidrogel, hidrocoloides, entre outros (74). Além disso, conta muito o fato do país possuir a maior biodiversidade do planeta em biomas como a Amazônia e o cerrado (considerado a savana com maior biodiversidade do planeta). O país contém cerca de 20% da diversidade total de plantas no mundo, o que contribui para explicar o grande número de plantas sendo usadas e pesquisadas para os mais diversos fins medicinais (75).

Um estudo realizado por Silva e colaboradores, no qual os moradores da comunidade rural de Engenho Cuieiras (Pernambuco) foram perguntados a respeito da utilização de plantas medicinais para usos em geral. Os pesquisadores relatam que a população citou 71 espécies diferentes de plantas para tratamento de moléstias abrangendo diversos órgãos e sistemas do corpo humano (76).

Por conta disso, são realizados muitos estudos científicos sobre o uso de diferentes plantas e seus derivados; estudos de revisão apontam que entre o período de 2011 e 2013 foram publicados mais de 10.000 artigos nesta área do conhecimento (77) e que, entre 1988 e 2016, foram publicados mais de 34.000 artigos nesta área, levando em consideração apenas trabalhos realizados no Brasil ou por brasileiros (75).

Para tratamento de problemas cutâneos, foram realizados muitos estudos com diferentes produtos naturais não apenas no Brasil; como exemplos, pode-se citar: ameixa-silvestre (78), pinheiro-de-alepo (79), extrato de semente de uva (80), babosa (81, 82), mel (83), jabuticaba (84), copaíba, barbatimão (85), óleo de arroz (86, 87), óleo de girassol (88, 89), café (90, 91), cafeína (92), entre outros.

1.5. O uso de óleos ricos em ácidos graxos essenciais para tratamento da pele

Os óleos cujos usos para problemas dermatológicos são amplamente disseminados são ricos em ácidos graxos essenciais (AGE).

Para tratamento de feridas, os ácidos graxos mais importantes são o ácido linolênico e o ácido linoleico, uma vez que não podem ser sintetizados pelo nosso organismo devido à falta da enzima δ -9 dessaturase; por isso, são chamados de essenciais (93).

O ácido linolênico é encontrado em grande quantidade na camada epidérmica, sendo importante no controle da permeabilidade epidérmica; pode promover a quimiotaxia e angiogênese no local da lesão, podendo acelerar o processo cicatricial local (93, 94).

Sobre o ácido linoleico, este possui efeito quimiotático sobre os macrófagos, regulando a produção de colagenase local e possui efeito antibiótico sobre *Staphylococcus aureus* (93, 95, 96).

Numa extensa revisão bibliográfica realizada por Ferreira e colaboradores, foi investigada a produção científica nacional acerca do uso de AGE de utilização tópica em feridas cutâneas, tanto em modelos animais, cultura de células e pacientes humanos. No período compreendido entre 1970 e 2006, conseguiram encontrar apenas nove pesquisas relacionadas ao assunto. Nestes trabalhos, foram utilizados nove diferentes produtos comerciais para mesma finalidade, todos referidos pelos usuários como AGE, sendo dois dos estudos com óleo de girassol (OG) e nenhum com óleo de café. A maior parte dos estudos analisados nesta revisão indicou melhora dos ferimentos quando tratados com o AGE, mesmo com diferentes metodologias aplicadas (93).

O efeito destes óleos ricos em AGE também foi estudado levando em consideração o consumo na alimentação e a consequente resposta apresentada na pele dos animais; ficou evidenciado neste estudo que o consumo de diferentes tipos

de óleos (de girassol, de peixe e linhaça) podem piorar a cicatrização, influenciando no perfil inflamatório e na deposição de colágeno na área da ferida (89).

1.5.1. O uso de óleos de café para tratamento da pele

Uma das motivações para a realização deste trabalho foi o uso popular da borra do café, produto da preparação da bebida e originado a partir da torrefação e moagem do fruto, em feridas cutâneas agudas. Partindo desta ideia, foram utilizados produtos derivados do café, como o óleo de café cru, óleo de café torrado e suas borras (resíduo da prensa de filtração do óleo) com finalidade de acelerar a cicatrização de feridas agudas.

O uso de café para fins medicinais no Brasil data do século XIX, em torno de 1850, momento em que a planta tornou-se um dos principais produtos de exportação e o país o maior produtor mundial deste fruto (97).

Este fruto (*Coffea arabica*) contém polifenóis, incluindo o ácido clorogênico, antocianinas, ácido ferúlico, ácido quínico, diterpenos como o cafestol e caveol, tocoferóis e muitos ácidos graxos, substâncias com ações antioxidante e anti-inflamatória e com potencial para proteção da pele contra queimaduras solares, fotoenvelhecimento, entre outros (98, 99).

O óleo de café verde já foi descrito como alvo da indústria farmacêutica e cosmeceutica devido à sua composição, como os ácidos graxos e triacilgliceróis. Entre os ácidos graxos, pode-se citar o ácido linoleico e o palmítico (presente na pele) (91). Como esta molécula está presente no estrato córneo da pele, o uso do óleo de café verde poderia contribuir para a função de barreira e hidratação da pele, aumentando a quantidade de ácidos graxos presentes na pele (100). Este óleo estimulou (em cultura de fibroblastos) a produção de colágeno, elastina, glicosaminoglicanos, TGF- β 1 de maneira dose-dependente (99). Outro estudo relatou que o uso deste óleo acarretou uma ligeira diminuição da perda de água transepidermica (TEWL), evidenciando compatibilidade de uso na pele (101). Também foram descritas melhoras como menor pigmentação de áreas com manchas, menores rugas e linhas

de idade / expressão amenizadas com o uso de um produto comercial derivado do café (102).

Outros produtos derivados do café também foram avaliados quanto à eficácia de seu uso na pele. Um estudo realizado com extrato da borra de café torrado em camundongos encontrou que o uso desta substância diminui a TEWL, a espessura da epiderme, quantidade de rugas e o eritema decorrente da exposição à radiação ultravioleta B (UV-B); desta forma, o extrato poderia diminuir o fotoenvelhecimento induzido pelos raios UV-B (103). A cafeína, uma das principais moléculas associadas ao café, também foi alvo de estudos. Neste caso, a cafeína foi aplicada em cultura de queratinócitos, suprimindo a proliferação e migração destas células, o que é prejudicial para a cicatrização (92), embora esta molécula seja antioxidante. Devido à inibição da proliferação de queratinócitos, existem estudos sobre a possibilidade de utilizar a cafeína para supressão de tumores epiteliais (104-106).

Estes dados demonstram que o uso de derivados de café para problemas dermatológicos é de interesse da comunidade científica. Como o Brasil é o maior produtor mundial de café (107), a quantidade disponível para fabricação de um produto dermatológico é alta e a obtenção desta matéria prima seria rápida. Além disso, poderia ser um uso para grãos rejeitados pela indústria cafeeira, podendo ser fonte de renda alternativa para os produtores (100).

1.5.2. O uso de óleo de girassol na pele

Este tratamento tópico já foi descrito como forma de melhorar e prevenir úlceras cutâneas em pacientes e o resultado obtido mostrou que o AGE, em produto à base de OG, manteve a hidratação e a elasticidade da pele (108).

Em outro estudo foi relatado o caso de uma paciente que apresentou necrose da ferida cirúrgica e o tratamento com óleo de girassol (OG) na pele da paciente demonstrou efetividade assim como foi a escolha feita pelos profissionais envolvidos na recuperação da paciente para que ela pudesse continuar o tratamento da lesão em casa, sem necessidade de comparecer ao serviço hospitalar para esta finalidade (109).

Um experimento realizado para comparar os efeitos do uso do OG na (formulação do Dersani®) com *Laser* arseneto de gálio-alumínio evidenciou que o uso do óleo foi melhor para a revascularização do leito da ferida assim como aumentou, nos primeiros dias, o número de fibroblastos na região cicatricial (110).

Outro relato de caso demonstrou a eficiência do uso do OG para tratamento de lesões cutâneas em três pacientes, que tinham deficiência de AGE como resultado de má absorção crônica de nutrientes. Os autores relatam que após tratamento por duas semanas com aplicação tópica do óleo, os níveis de ácido linoleico presentes na lecitina epidérmica aumentaram, a TEWL diminuiu significativamente e as lesões cutâneas melhoraram. No mesmo estudo, os pesquisadores comparam os resultados do uso de OG com o uso de óleo de oliva, rico em ácido oleico, demonstrando que o último tratamento não melhorou a condição das lesões dos pacientes (111).

O uso do OG como tratamento tópico também foi pesquisado utilizando-se carneiros como organismo modelo. Neste trabalho, os autores evidenciam que esta terapêutica foi capaz de acelerar a cicatrização nos dias sete e 21 após a realização das feridas, em que a área cicatricial foi diminuída e o desenvolvimento do tecido de granulação do leito da lesão ocorreu também de forma mais rápida, assim como toda a área da lesão, no último ponto de coleta de dados do estudo, estava re-epitelizada (112).

Na revisão feita por Ferreira e colaboradores sobre o uso de AGE em feridas (93), são citados dois estudos que utilizaram o OG como fonte dessas substâncias. Um dos artigos revisado foi feito com pacientes curados de hanseníase e o objetivo era comparar a microbiota de feridas crônicas nestes pacientes e foi demonstrado que, *in vivo*, o tratamento com este óleo tem efeito antimicrobiano, o que pode ser benéfico para a cicatrização de feridas crônicas, embora o mesmo resultado não tenha sido encontrado *in vitro* (113). No outro artigo citado na revisão, o experimento foi feito utilizando ratos como organismo modelo para avaliar a cicatrização em feridas agudas, comparando o uso de OG com TCM. Os autores evidenciaram neste estudo que o uso de ambos os óleos foram capazes de melhorar o processo cicatricial comparando com o grupo, embora em ambos os tratamentos os animais tenham desenvolvido fibrose no leito da ferida, sendo pior o resultado quando os animais foram tratados com TCM (114).

1.6. Segurança no uso de produtos naturais

Embora o uso de produtos naturais para diversas finalidades médicas seja de domínio popular há muito tempo e o uso de tratamentos alternativos seja cada vez maior no mundo, é necessário ter cautela no uso destes produtos (74, 115).

Uma das grandes dificuldades do uso de tratamentos fitoterápicos é não conseguir fornecer sempre a mesma quantidade dos diferentes princípios ativos em todos os usos, uma vez que a expressão de diversos genes e o metabolismo dos seres vivos pode ser influenciado pelo meio ambiente. Por exemplo, o estresse hídrico enfrentado por plantas num ano com baixos índices pluviométricos altera a qualidade de frutos e outros produtos vegetais. Este fato pode ser observado não apenas para produtos com finalidades médicas, mas também para produtos de consumo alimentar cotidiano.

Na revisão sobre uso de AGE citada anteriormente, é possível perceber que nenhum dos estudos procurou por possíveis efeitos sistêmicos oriundos do uso dos óleos, assim como não foram feitos estudos sobre a segurança no uso destes materiais (93).

Muitos pacientes usam produtos naturais para tratamento de diversas condições de saúde, mas a maioria não conhece potenciais efeitos colaterais adversos que possam ser desencadeados (72). Não é pelo fato do produto ser natural que o uso deste é seguro para qualquer pessoa e situação (116). Alguns profissionais da área da saúde, denominados naturopatas, tratam seus pacientes usando a medicina alternativa complementar; o risco desses tratamentos é que muitas vezes a indicação de uma terapia alternativa está mais embasada no conhecimento popular do que em conhecimentos científicos (117). Como são poucos os artigos científicos publicados com resultados do uso de produtos naturais em humanos (a maioria é realizada em modelos animais ou *in vitro*), a quantidade de informação a respeito da segurança e possível toxicidade desses medicamentos é escassa (77).

Desta forma, este trabalho buscou mostrar possíveis efeitos locais e sistêmicos derivados do uso tópico de produtos naturais comuns no Brasil e usados,

principalmente no caso do óleo de girassol, como opção terapêutica por muitos profissionais no país.

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos locais e sistêmicos, a partir da aplicação tópica na pele lesionada de ratos, dos óleos vegetais derivados do café e do girassol, ricos em ácidos graxos essenciais.

3. METODOLOGIA

Nesta seção da tese estão detalhadas as técnicas utilizadas para os dois artigos publicados que compõem os resultados deste trabalho. A metodologia foi a mesma para as duas publicações, de forma que esta seção não será dividida por artigo, por este motivo.

3.1. Obtenção dos cafés para uso cru e para torra

O café (*Coffea arabica*) utilizado como matéria prima para extração de óleo foi adquirido diretamente do produtor e posteriormente encaminhado para torrefação e extração do óleo. Tal procedimento foi necessário pois o sistema de comercialização e escala utilizada pelas torrefações são muito maiores do que o volume de 12 sacas necessárias para obtenção dos óleos utilizados no trabalho descrito no artigo 1.

Além do uso de misturas para a formação de *blend*, o café ofertado no mercado normal não tem o controle de lotes comprados pelas torrefações, não garantem a safra do produto (tempo de pós-colheita), exige uma compra de no mínimo 20 sacas e não garantem ou especificam as condições de armazenamento. Para se ter um controle desses fatores, optou-se pela compra no produtor e posterior industrialização.

Foram adquiridas 12 sacas já beneficiadas por um produtor de Varginha, Minas Gerais, sendo seis encaminhadas para torrefação e utilizadas para obtenção de material para os tratamentos com óleo de café torrado e borra de filtro de café torrado. As demais foram direcionadas diretamente para a extração e produziram o óleo e a borra de filtro de café cru.

A torração do café foi feita em torrador Lilla Opus (Companhia Lilla de Máquinas, Guarulhos, SP, Brasil) com resfriamento a água e ventilação forçada para seis sacas, para garantir um volume de matéria prima homogêneo, sem contaminações de outros lotes processados anteriormente ou posteriormente nos silos de passagem da indústria.

O tratamento de torração utilizado foi o convencional aplicado para a produção de café para bebida interna, com um rendimento de 0,79 de café cru/torrado, que resultaram num total de 285kg de café torrado para extração de óleo de café torrado.

3.2. Extração e filtração dos óleos de café cru e torrado

O equipamento utilizado foi uma prensa do tipo “Expeller” (Máquinas Piratininga Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil) adaptada para extração do óleo de grãos de café tanto cru como torrado. A máquina foi readaptada para receber moega, bandejas coletoras e vasos em aço inoxidável apropriados para obtenção de óleo para uso no experimento, sem contaminação de outras matérias primas ou óleos extraídos, garantindo ainda assim um produto de qualidade e possível de ser repetido em posterior industrialização.

As seis sacas de café cru e as seis de café torrado geraram, respectivamente, 23 e 38 kg de óleo bruto. Esse volume foi compatível com o volume mínimo necessário de 20 kg para operar o filtro do tipo prensa. O filtro prensa horizontal de fechamento manual foi especialmente construído para a filtragem a alta pressão e obtenção de óleo límpido, além da separação da borra de filtro com alto teor de matéria não saponificável de potencial interesse para utilização em tratamentos.

3.3. Determinação dos ácidos graxos presentes nos óleos de café

As composições dos ácidos graxos presentes nos óleos de café foram analisadas pelo Prof. Dr. Leandro Wang Hantao e Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli, do Instituto de Química da Unicamp, por cromatografia gasosa seguindo a metodologia descrita pela *American Oil Chemists' Society* (AOCS) (118). As condições de análise foram as seguintes: cromatógrafo de capilaridade a gás (AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM - Agilent, Santa Clara, CA, EUA) e coluna

capilar DB-23 AGILENT, com fase (50% cianopropil)-metilpolisiloxano, 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 μm . As condições de operação do cromatógrafo foram as seguintes: taxa de fluxo da coluna = 1.00 mL/min; velocidade linear = 24 cm/s; temperatura de detecção = 280 °C; temperatura do injetor = 250 °C; temperatura da coluna = 110 °C por 5 min, rampa de 110 °C até 215 °C a 5 °C/min e 215 °C por 34 min; gás carreador = hélio; volume injetado = 1,0 μL .

3.4. Determinação da composição fenólica dos óleos de café

A composição fenólica dos óleos de café foi analisada pelo Prof. Daniel Barrera Arellano, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, por cromatografia gasosa - espectrometria de massas (GC-MS). Aliquotas de 100 μL das amostras dos óleos foram derivatizadas com 500 μL de solução de N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida com trimetilclorosilano (BSTFA + TCMS) 99:1 (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) a 60 °C por 3 h. A diluição da amostra derivatizada foi de 1:10. A coluna utilizada foi TR-5 de 7 m \times 32 mm (diâmetro = 0,25 μm). O volume injetado foi de 1 μL usando injetor do tipo “*split/splitless*” (1:50) com fechamento por 3 min. A porta de injeção foi mantida a 280 °C, e as linhas de transferência do espectrômetro de massas foram mantidas a 300 °C. Em todas as análises, a temperatura da coluna foi programada para aumentar de 60 °C até 240 °C por 3 °C.min⁻¹. A fonte de ionização foi mantida a 250 °C e 70 eV, e a variação de escaneamento foi definida de 40 a 600 unidades m/z (intervalo de escaneamento = 0.064 s). A identificação dos picos foi realizada comparando com as bibliotecas de espectros NIST 2010 (NIST – Gaithersburg, MD, EUA) e FFNSC (Chromaleont – Messina, Itália) (119, 120).

3.5. Óleo de girassol

O óleo de girassol usado no trabalho 2 é um produto comercializado no país e foi adquirido pronto para o uso.

A composição química deste óleo, de acordo com a bula disponibilizada pelo fabricante, é a seguinte: óleo de girassol clarificado, triglicerídeos de ácidos cáprico e caprílico, lecitina, palmitato de retinol, acetato de tocoferol e alfa-tocoferol (Dersani®, Saniplan, Rio de Janeiro) (93).

3.6. Experimentação animal

Foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciências Animais de Laboratório (Cemib) da Unicamp, 90 fêmeas de ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* linhagem NTacUnib:SD (*Sprague Dawley*), com idade média de 7 semanas e peso entre 220 a 270g. Estes animais possuem área de superfície corporal total média de 0,0356 m² (121) enquanto a humana é de 1,6 m² para mulheres e 1,9 m² para homens (122).

O experimento foi autorizado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (Ceua) da Unicamp, de acordo com a Lei Federal 6.638. O protocolo de autorização é nº 2929-1. Todos os profissionais envolvidos no tratamento diário dos animais empregaram técnicas para minimizar possíveis sensações de dor e estresse dos animais. Os experimentos foram realizados seguindo recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, do *International Council for Laboratory Animal Science* e as diretrizes internacionais para publicação de estudos com modelo animal *Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments* (123).

Os animais foram alojados e identificados em gaiolas individuais fabricadas em polipropileno e aço galvanizado, adequadas para o tamanho da espécie (0,2 x 0,36 x 0,12m), com cama de maravalha, água e ração fornecidos *ad libitum* e substituídos diariamente. Os animais permaneceram cinco dias em aclimatação no biotério, com ciclo de 12/12 h claro/escuro, antes do início dos experimentos.

Após o período de adaptação, os animais foram preparados para o início do experimento, onde foram separados aleatoriamente em grupos de 15 animais, conforme indica o quadro abaixo. Em cada grupo, cinco animais foram sorteados para serem eutanasiados nos dias 2, 4 e 10 após início do tratamento.

Respeitando-se o sentido crânio-caudal, em todos os animais foram feitas quatro feridas do lado esquerdo, designadas como "A", "B", "C" e "D" e outras quatro feridas do lado direito "E", "F", "G" e "H" (figura 1). O lado esquerdo recebeu sempre o produto de "Controle" ou "Testemunha" e o direito o "Tratamento" a ser estudado.

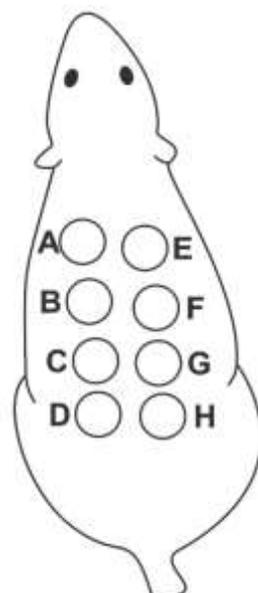


Figura 1: esquema das feridas realizadas no dorso dos animais.

O quadro 3 mostra a distribuição das feridas e dos tratamentos recebidos para cada grupo de animais.

Quadro 3. Tratamentos aplicados em cada grupo de estudo.

	Lado Esquerdo (Controle)	Lado Direito (Tratamento)
Grupo 1	Solução salina	Óleo mineral
Grupo 2	Óleo mineral	Óleo de girassol
Grupo 3	Óleo mineral	Óleo de café cru
Grupo 4	Óleo mineral	Borra do óleo de café torrado
Grupo 5	Óleo mineral	Borra do óleo de café cru
Grupo 6	Óleo mineral	Borra do óleo de café torrado

Os óleos e borras de café utilizados neste projeto foram cedidos pela empresa Linax Óleos Essenciais e Destiladores (Votuporanga, São Paulo), o óleo mineral utilizado foi Óleo Mineral Frasco 100 mL (Rioquímica, São José do Rio Preto, São Paulo) e o óleo de girassol foi o Dersani (Saniplan, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro).

3.7. Preparo do animal

Para receber o tratamento especificado e evitar estresse, cada animal foi conduzido para uma sala separada dos demais, onde foi anestesiado intraperitonealmente com quetamina 50mg.kg^{-1} , xilazina $7,0\text{ mg.kg}^{-1}$ e diazepam $2,0\text{ mg.kg}^{-1}$. Após a anestesia, as regiões paravertebrais e escapulares foram completamente tricotomizadas e desinfetadas com solução de 2% de digliconato de clorexidina para assepsia da área onde seriam produzidas as feridas.

Na área tricotomizada foram feitas quatro feridas paravertebrais do lado direito e outras quatro do lado esquerdo. As úlceras distavam cerca de 1 cm entre elas.

Para uma melhor homogeneidade dos ferimentos tanto entre os oito ferimentos de cada animal como entre todos os animais estudados, utilizou-se um bisturi circular descartável (*punch*) com 6 mm de diâmetro para corte na forma de disco em toda a profundidade da pele. O fragmento cutâneo em forma de disco era levantado por pinça e toda a espessura excisada com tesoura. Desta forma, a ferida realizada nos animais, todos saudáveis, foi produzida cirurgicamente com aço esterilizado em ambiente controlado com apenas um movimento incisional.

Imediatamente após os ferimentos serem produzidos, o animal recebeu a primeira aplicação tópica do produto específico para cada ferida como estipulado no Quadro 3, que foi coberta com uma gaze em cada lado do animal, para evitar mistura dos diferentes tratamentos aplicados no mesmo animal, assim como para evitar que o animal lambesse as feridas. A gaze foi presa por fita microporosa e reforçada

externamente com esparadrapo impermeável. Para controlar a dor dos animais, foi disponibilizado paracetamol (200 mg.kg^{-1}) na água do bebedouro.

Em cada ferida foi aplicado 0,1 mL do tratamento correspondente utilizando, para este fim, seringa de 1,0 mL. Desta forma, era possível disponibilizar sempre a mesma quantidade de tratamento para todos os animais, com menor risco de diferenças entre os grupos.

Diariamente, os ferimentos foram limpos com solução salina, os tratamentos repetidos com os respectivos tratamentos e os curativos substituídos até o dia determinado para a eutanásia. Para os curativos diários, os animais não foram anestesiados para que não houvesse interferência no metabolismo hepático, uma vez que todos os animais aceitaram todos os procedimentos sem agressividade e foram tolerantes à manipulação. Caso houvessem crostas, estas eram retiradas caso o procedimento fosse realizado sem a necessidade de força excessiva, evidente quando os animais apresentavam sinais de dor como espasmos musculares, vocalização e movimentos antálgicos. Na impossibilidade de retirar a crosta, o tratamento era aplicado entre esta, elevando-a com pinça, e a ferida, para que o óleo atingisse a área cicatricial.

O dorso dos animais foi fotografado com câmera digital para avaliação posterior; cada ferida também foi fotografada, isoladamente, utilizando-se lupa digital. Estas imagens foram analisadas por dois pesquisadores, um biólogo e um dermatologista, considerando os critérios de quantidade de área cicatrizada, profundidade da lesão e velocidade de cicatrização.

3.8. Eutanásia dos animais e coleta de material para análises

Após sorteio para eutanásia nos dias 2, 4 ou 10, os animais foram anestesiados intraperitonealmente com tiopental ($85,0 \text{ mg.kg}^{-1}$), fotograficamente documentados e o sangue foi coletado por punção cardíaca.

O sangue coletado foi centrifugado imediatamente para obtenção de soro, utilizado na dosagem das substâncias relacionadas com a cicatrização.

A pele das áreas tricotomizadas da região dorsal foram excisadas até a fáscia, separando-se as metades proximais, com duas feridas de cada lado (lado que recebeu o controle e lado que recebeu o tratamento, conforme o quadro 3) para fixação em formol a 10% e posterior preparo das lâminas para avaliação histopatológica.

Novas biopsias com *punchs* de mesmo diâmetro foram feitas nos quatro pontos das biopsias anteriores, na porção caudal da pele excisada, a fim de se evitar coleta de pele íntegra ao redor da área cicatricial; este procedimento foi realizado para que a amostra utilizada contivesse somente tecido cicatricial, sem fragmentos de pele não lesionada que pudesse interferir na análise. Cada um dos quatro fragmentos retirados foram imediatamente identificado e armazenado em recipiente contendo nitrogênio líquido, sendo conservados em biofreezer a -80°C no final do período do experimento, até a extração do RNAm das substâncias associadas à inflamação.

3.9. Processamento das amostras para histologia

Os fragmentos obtidos da pele com as feridas da porção proximal, foram conservados em formol a 10%, em frascos individuais, devidamente identificados, para a elaboração das lâminas para a análise histológica.

Após um dia em formol, as peças histológicas foram manipuladas para separar as diferentes feridas que foram usadas nas lâminas. Uma ferida do lado que recebeu controle (ferida A) e uma ferida que recebeu o tratamento (ferida E) foram armazenadas para eventual necessidade de reprocessar o material. As feridas B e F foram utilizadas para a confecção das lâminas.

Estas feridas foram cortadas longitudinalmente no centro da área cicatricial, de forma a deixar exposto o meio do leito da lesão a fim de possibilitar melhor análise microscópica. O fragmento de pele abrangendo toda a ferida, obtido por uma seção longitudinal, foi processado, em autotécnico, para exame histológico, incluído em parafina, cortado em micrótomo rotativo com espessura de 3 µm e corado pelo método de hematoxilina e eosina (HE).

3.10. Análise histológica

Os cortes histológicos foram analisados de forma qualitativa e quantitativa, de maneira cega, isto é, sem que o avaliador (médico patologista) conhecesse, no momento da leitura, a que grupo pertenciam os espécimes.

Para a avaliação subjetiva (qualitativa e semi-quantitativa) consideraram-se os seguintes aspectos: espessura / natureza da crosta e presença / espessura / extensão do epitélio regenerativo.

No tecido que preenchia a ferida (leito ulceroso), contendo células, vasos, fibrina, colágeno jovem e colágeno maduro, foram estimados: o edema, grau de congestão, a quantidade e qualidade das células inflamatórias, a quantidade das células estromatosas, dos vasos neoformados e das fibras colágenas maduras. A cavidade formada no experimento foi avaliada considerando-se a porcentagem de preenchimento, relativamente à pele normal adjacente.

Após avaliação dos resultados da análise qualitativa, foi realizada a análise objetiva por contagem das células presentes na derme (em reparação), para comparação entre os grupos. A avaliação morfométrica da celularidade dérmica foi realizada nas amostras de pele dos animais do dia 10, utilizando-se um microscópio Olympus, com graticula morfométrica com 30 cicloides, fixada na ocular. Todas as células (inflamatórias mononucleares, endoteliais ou estromatosas, a saber, fibroblastos, miofibroblastos e dendríticas) que tocavam cada um dos cicloides eram contadas, sendo o procedimento repetido em dez campos aleatórios, aumento de 400X, em todas as amostras do estudo.

3.11. Microscopia por Geração do Segundo Harmônico (SHG)

O sistema experimental utilizado neste projeto foi o disponibilizado pelo Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (Infabic), instalado no Instituto de Física Gleb Wataghin da Unicamp. É um microscópio invertido Olympus

IX-81 com dois fótons, equipado com *scanner* FV300, *Laser* de argônio FV-5 COMB2 para fluorescência e para geração de segundo harmônico (SHG) Titânio-safira (Ti:safira).

A possibilidade de utilizar este equipamento nas aquisições de imagens permite algumas vantagens em relação a outros equipamentos ópticos convencionais, tais como: maior resolução de imagens em três dimensões em relação à lâmpada de mercúrio, reconstrução de imagens tridimensional, maior visualização em profundidade do tecido a ser observado, e possibilidade de utilizar várias técnicas de aquisição de imagens simultaneamente.

A fluorescência acontece por um fenômeno onde elétrons do fluoróforo absorvem fótons com energia proveniente de uma fonte (lâmpada ou feixe de *Laser*) e passam de um estado fundamental (baixa energia) para um estado excitado (alta energia). Neste estado, o fluoróforo passa por uma mudança em sua conformação e pode interagir com uma série de moléculas ao seu redor. Com isso a energia deste estado excitado é dissipada e o elétron passa para um estado de menor energia, (não o estado fundamental). A diferença de energia entre o estado excitado e o estado de menor energia é emitida em forma de um fóton (124).

A técnica de microscopia de fluorescência consiste justamente em captar este fóton que é emitido e com ele gerar uma imagem. Estes procedimentos permitem maiores detalhamentos de estruturas (125).

As imagens foram adquiridas, utilizando *Laser* de argônio a 488 nm e Ti:safira 890 simultaneamente, óleo de imersão e objetiva 40x, com resolução de dois micrômetros por pixel. As mesmas foram iluminadas com o *Laser* até que o sinal SHG aparecesse, quando iniciou-se a aquisição das imagens (126).

Estas imagens foram analisadas com o *software ImageJ* (127), usando o parâmetro de entropia para densidade do colágeno depositado na lesão.

3.12. Análise das citocinas no tecido cicatricial - extração de RNA

Foi feita extração de RNA total das amostras de pele congeladas à -80°C, segundo método do reagente Qiazol (Qiagen, EUA). Para a produção do DNA complementar (cDNA), utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), sendo a concentração final do cDNA de 3,0 µg. Este cDNA foi diluído segundo a concentração necessária para a amplificação eficiente de cada gene, sendo esta eficiência verificada segundo método descrito abaixo.

3.13. PCR quantitativo (qPCR) – PCR *real time*

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o sistema TaqMan™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que é constituído por um par de *primers* e uma sonda marcada com um fluoróforo. Foram utilizados *kits* TaqMan™ *assays* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para todos os genes, a saber: IL-2 (Rn00587673_m1), IL-4 (Rn01456866_m1), IL-6 (Rn01410330_m1), IL-12 (Rn00575112_m1), IL-23A (Rn00590334_g1), adiponectina (Rn00595250_m1), IGF-1 (Rn00710306_m1), IFN- α (Rn01400027_g1), IFN- γ (Rn00594078_m1), leptina (Rn00565158_m1), e TNF- α (Rn00562055_m1).

O gene *GAPD* Rat (4352338E), foi escolhido como controle endógeno da reação. Ele serve para normalizar a expressão do gene de interesse nas diferentes amostras. A sonda *GAPD* está marcada com o fluoróforo VIC®, enquanto os *primers* para os alvos estão marcados com o fluoróforo FAM®.

Antes de se iniciarem os experimentos de quantificação relativa da expressão de qualquer gene, realizou-se a validação do sistema gene alvo, por exemplo, adiponectina ou leptina, com o controle endógeno *GAPD Rat*. Verificou-se que as eficiências de amplificação dos genes foram próximas a 100%. Esse passo é essencial para que o controle endógeno possa ser utilizado para normalizar os valores de expressão relativa do gene de interesse (128).

3.14. Validação da eficiência dos genes de interesse

A validação consistiu na amplificação, tanto com os *primers* dos genes de interesse quanto com o do controle endógeno, dos cDNAs de triplicatas de concentrações diferentes (diluições seriadas) de uma amostra escolhida aleatoriamente. Em seguida, foi construída uma curva padrão a partir do logaritmo da concentração das amostras pelo CT (*Threshold Cycle*: ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (*Threshold*), o qual é definido arbitrariamente). Nessa curva, foram obtidos os valores da inclinação (*slope*) da curva e da confiabilidade das réplicas (R2). Dessa forma, a eficiência do um sistema foi calculada pela da fórmula: $E = 10^{(-1/slope)} - 1$. Para exemplificar, a placa de validação dos genes adiponectina, leptina e *GAPD*, foram feitas triplicatas de uma amostra de cDNA de hepatócito de rato em sete concentrações diferentes (diluições seriadas de 5x).

Após o cálculo das eficiências de amplificação de cada gene de interesse e do controle endógeno, foi construído um gráfico de dispersão, o qual tem por finalidade definir qual é a amplitude de concentrações para as quais o sistema é eficiente. Para a construção do gráfico, foram utilizados os mesmos valores de logaritmo da concentração das amostras no eixo X, e a diferença entre as médias dos CT do controle endógeno e as médias dos CT do gene de interesse, para cada concentração no eixo Y. A seguir, obteve-se uma linha de tendência para estes valores, a qual possui uma equação de reta que permite verificar o valor da inclinação desta reta. Para que um sistema seja considerado eficiente, o valor da inclinação deve ser menor que 0,1 (quanto mais próximo de zero for este valor, menor é a inclinação da curva e, portanto, mais constante é a diferença entre as médias dos CT do gene de interesse e do controle endógeno). Os pontos no gráfico, correspondentes às concentrações, que estiverem mais próximos à linha de tendência, são considerados validados (o sistema tem 100% de eficiência nestas concentrações).

Também para exemplificar, a concentração de amostra validada como eficiente para os genes adiponectina, leptina e *GAPD* foi de 40,0 ng de cDNA (129).

Para a quantificação relativa dos genes em estudo, as reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata a partir de: 6,25µL de *TaqMan Universal*

PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) 2x, 0,625µL da solução de *primers* e sonda, 1,625 µL de água e 4,0 µL de cDNA (40ng de cDNA), sendo que no controle negativo, foi adicionado 4,0 µl de água ao invés do cDNA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os valores da expressão gênica relativa foram obtidos pela análise dos resultados no programa *7500 System SDS Software* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e os valores finais apresentados nos artigos estão em *fold change*, que representam quantas vezes os genes estão mais ou menos expressos em relação ao grupo controle (que, em todos os casos, está normatizado como o valor 1, a linha pontilhada presente nos gráficos) (128).

3.15. Análise de citocinas no soro por Elisa

Esta análise consiste na técnica de imunoensaio sanduíche quantitativo. Um anticorpo monoclonal específico para a substância alvo foi pré-adicionado em uma microplaca ainda na fábrica. As amostras, controles e padrões foram pipetados para os poços e se a substância em estudo estivesse presente seria ligada pelo anticorpo imobilizado. Depois de lavar as substâncias não ligadas, um anticorpo policlonal com enzima ligada, específica para a substância, foi adicionado aos poços. Após uma lavagem para remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado, uma solução de substrato foi adicionada aos poços. A enzima de reação produz um produto azul que fica amarelo quando a “solução de bloqueio” foi adicionada. A intensidade de medição de cor está em proporção com a quantidade de substância alvo ligado na etapa inicial. Os valores da amostra foram então lidos a partir da curva padrão.

Para as reações realizadas neste projeto, foram usados *kits* comerciais de Elisa Quantikine (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) para as substâncias IL-2, IL-4, IL-12, IL-6, IGF-1, IFN-α, IFN-γ e TNF-α; para as substâncias leptina e adiponectina foram usados *kits* comerciais da empresa Millipore (St. Charles, MO, EUA).

As placas dos dez *kits* foram analisadas no leitor de microplaca BioRad 680, (BioRadLaboratories, Hercules, CA, EUA), nos comprimentos de onda de 490 e 570nm, conforme recomendação dos fabricantes.

3.16. Análise estatística

As análises estatísticas dos dados obtidos ao longo dos trabalhos foram realizadas no *software GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) por análise de variância (Anova) com pós-teste de Bonferroni com significância de 5%.

4. RESULTADOS

A revista PLoS One é de livre acesso e segue as diretrizes do *Creative Commons*, em que suas publicações são liberadas para uso amplo e irrestrito, desde que sejam citados corretamente e o crédito seja dado tanto aos autores quanto à revista. Assim, não há necessidade de autorização da revista para publicação do artigo dentro desta tese.

4.1. Artigo 1

21/12/2017 Gmail - Publication Date Notification: (pone.0188779) Topical use and systemic action of green and roasted coffee oils and ground oils in ...



Bruno Grosseili Lania <bruglania@gmail.com>

Publication Date Notification: (pone.0188779) Topical use and systemic action of green and roasted coffee oils and ground oils in a cutaneous incision model in rats (<i>Rattus norvegicus albinus</i>)

1 mensagem

noreply@apexcovantage.com <noreply@apexcovantage.com>
Para: bruglania@gmail.com

8 de dezembro de 2017 11:19

Dear Author,

We're pleased to announce that your manuscript "Topical use and systemic action of green and roasted coffee oils and ground oils in a cutaneous incision model in rats (*Rattus norvegicus albinus*)" has a scheduled publication date of Dec 13, 2017. Your article will remain under a strict press embargo until 2 PM Eastern Time (US) on the date of publication.

Please note that publication dates may change; this is not a frequent occurrence, but can happen due to unforeseen technical issues. If you are planning a press release, and have *not* already coordinated the publication date with the journal, please contact them as soon as possible.

PLOS routinely tracks the media coverage our articles receive; however, we aren't always able to capture all of it. Therefore, if you discover or produce news content about your article that you would like to be added, please let us know. To submit a media link, fill out the online form found on the Related Content tab of your paper. The coverage you submit will be posted pending staff approval.

Be ready to respond to comments from readers

We encourage you to sign up for a PLOS Journals account if you have not yet done so; this is independent of the manuscript submission and peer review system. When your paper is published, you will be able to comment on the paper and respond to any reader comments. We hope that you and your co-authors will participate as widely as possible, as your contributions will be valuable to the community. To register and find out more information please go to <https://community.plos.org/registration/new>

Discover how many people have downloaded your paper

As time passes, we encourage you to explore the "Metrics" tab, where comprehensive and transparent information about the reach and usage of the article is available. This information includes article-usage statistics (page views and PDF downloads), citations from the scholarly literature, comments, sharing on social networks, and blog posts. Further information about PLOS' program of article-level metrics is available here: <http://article-level-metrics.plos.org/>

Questions about your publication?

Please feel free to contact the journal office and they will be happy to help.

We thank you again for your support and contribution to PLOS.

Regards,

PLOS Production

This is an auto generated message by ProTrak. Please do not reply to this email.

Topical use and systemic action of green and roasted coffee oils and ground oils in a cutaneous incision model in rats (*Rattus norvegicus albinus*) (130)

Authors list:

Bruno Grosselli Lania^{1,¶,*}; Joseane Morari^{2,¶}; Aglécio Luis de Souza^{3,&}; Marilene Neves da Silva^{1,¶}; Amanda Roberta de Almeida^{1,¶}; Gislaine Veira-Damiani^{1,¶}; Sarah Monte Alegre^{3, 4,&}; Carlos Lenz César⁵; Lício Augusto Velloso^{2, 4,¶}; Maria Letícia Cintra^{6,¶}; Nilson Borlina Maia^{7,¶}; Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho^{1, 4,¶}

- 1- Laboratory of Applied Research in Dermatology and Bartonella Infection, – School of Medical Sciences – University of Campinas. Campinas, Sao Paulo, Brazil.
- 2- Cell Signaling Laboratory and Obesity and Comorbidities Research Center - School of Medical Sciences – University of Campinas. Campinas, Sao Paulo, Brazil.
- 3- Metabolism Laboratory – Internal Medicine - School of Medical Sciences – University of Campinas. Campinas, Sao Paulo, Brazil.
- 4- Clinical Medicine Department – School of Medical Sciences – University of Campinas. Campinas, Sao Paulo, Brazil
- 5- National Institute of Photonics Applied to Cell Biology (INFABIC) – Gleb Wataghin Institute of Physics – University of Campinas. Campinas, Sao Paulo, Brazil.
- 6- Pathological Anatomy Department - School of Medical Sciences – University of Campinas. Campinas, Sao Paulo, Brazil.
- 7- Aromatic Plants Division - Agronomic Institute of Campinas. Campinas, Sao Paulo, Brazil.

* Corresponding author: bruglania@gmail.com (BGL)

¶ These authors contributed equally to this work.

& These authors also contributed equally to this work.

Key words: coffee; skin; wound; wound healing, animal model.

Abstract

Introduction: Wounds are a common health problem. Coffee is widely consumed and its oil contains essential fatty acids. We evaluated the local (skin) and systemic effects associated with the topical use of coffee oils in rats.

Methods: Punch skin wounds (6 mm) incisions were generated on the backs of 75 rats. Saline (SS), mineral oil (MO), green coffee oil (GCO), roasted coffee oil (RCO), green coffee ground oil (GCGO) or roasted coffee ground oil (RCGO) were topically applied to the wounds. Healing was evaluated by visual and histological/morphometric optical microscopy examination; second harmonics generation (SHG) microscopy, wound tissue q-PCR (values in fold-change) and blood serum (ELISA, values in pg/mL).

Results: RCO treated animals presented faster wound healing (0.986 vs. 0.422), higher mRNA expression of IGF-1 (2.78 vs. 1.00, $p = 0.01$), IL-6 (10.72 vs. 1.00, $p = 0.001$) and IL-23 (4.10 vs. 1.2, $p = 0.05$) in early stages of wound healing; higher IL-12 (3.32 vs. 1.00, $p = 0.05$) in the later stages; and lower serum levels of IFN- γ (11.97 vs. 196.45, $p = 0.01$). GCO treatment led to higher mRNA expression of IL-6 (day 2: 7.94 vs. 1.00, $p = 0.001$ and day 4: 6.90 vs. 1.00, $p = 0.01$) and IL-23 (7.93 vs. 1.20, $p = 0.001$) in the early stages. The RCO treatment also produced higher serum IFN- α levels throughout the experiment (day 2: 52.53 vs. 21.20; day 4: 46.98 vs. 21.56; day 10: 83.61 vs. 25.69, $p = 0.05$) and lower levels of IL-4 (day 4: 0.9 vs. 13.36, $p = 0.01$), adiponectin (day 10: 8,367.47 vs. 16,526.38, $p = 0.001$) and IFN- γ (day 4: 43.03 vs. 196.45, $p = 0.05$). The SHG analysis showed a higher collagen density in the RCO and GCO treatments ($p = 0.05$).

Conclusion: Topical treatment with coffee oils led to systemic actions and faster wound healing in rats. Further studies should be performed are necessary to assess the safety of topical vegetal oil use for skin lesions.

Introduction

Acute wounds are a common health problem that affects 11 million people and results in hospitalization of approximately 300,000 people hospitalized in the United States [1]. Aging, obesity, diabetes, cardiovascular disorders, sensory

neuropathies, and autoimmune diseases delay wound healing. In 2009, chronic wounds affected 6.5 million people and had an annual cost of approximately \$25 billion dollars in the United States [2].

Typically, acute wound healing is a well-organized process that lead to predictable tissue repair, with platelets, keratinocytes, immune surveillance cells, microvascular cells, and fibroblasts playing key roles in the restoration of tissue integrity [3]. These processes can be didactically divided into four overlapping stages: homeostasis, inflammation, proliferation and remodeling. Studies have shown that during this process, several pro-, and anti-inflammatory factors are produced either locally or systemically, including leptin [4], interleukin (IL)2, IL-4, IL-6, and insulin-related growth factor (IGF)-1 as pro-healing substances (important during initial healing stages); adiponectin, IL-12, interferon (IFN)- α , and IFN- γ [5] as anti-healing factors (important at later healing stages); and tumor necrosis factor (TNF)- α , which has a varying effect depending on its concentration [6].

For years, plants have been used in traditional medicine to treat a wide range of human diseases [7]. Nevertheless, biomaterials for tissue engineering are extremely expensive, and they require heavy expenses beyond the reach of most patients in developing countries. Therefore, medicinal plants could be useful for primary health care because they are inexpensive, safe, and effective natural products compared with synthetic drugs [8]. Although effective wound dressing may not be available, treatments that incorporate fresh homemade coffee powder have long been recognized as a traditional medicinal practice [9]. In addition, the use of green coffee oil in the cosmetic and pharmaceutical industries is increasing because of its composition, hydration properties and ability to improve the skin barrier [10].

Coffee is one the most consumed plants in the world and Brazil is the largest coffee producer and exporter, with an estimated production of more than 56 thousand 60-kg bags only in the 2016-2017 crop [11]. According to a study conducted by Oliveira and colleagues, approximately 1/5 of the total production results in defective beans, that are not suitable for beverage-use [12]. As an alternative, these beans could be used for medicinal and cosmetic applications [13].

The aim of this study is to evaluate the local and systemic actions of different types of topically – applied coffee oils.

Materials and Methods

Seventy-five female Sprague-Dawley rats (strain NTacUnib:SD), with a median age of 7-week were obtained from the University of Campinas Breeding Center (*CEMIB*). The study was approved by the University of Campinas Institutional Animal Care and Use Committee (*CEUA* protocol number 2929-1) and was performed in accordance with the Brazilian College for Animal Experimentation and the International Council for Laboratory Animal Science (*ICLAS*) guidelines.

The sample size (15 animals per group, five for each analysis point) was pre-determined by the *CEUA*, which limits the number of animals in each group.

The animals were housed in individual polypropylene cages under the following conditions: 22°C, 12:12-hour artificial light-dark cycle and *ad libitum* access to food and drinking water. After random selection, the rats were anesthetized (ketamine 50 mg/kg-1, xylazine 7.0 mg/kg-1, and diazepam 2.0 mg/kg-1). Using 6.0 mm punches [14, 15], we produced four wounds on the left side and four on the right side of the back of each animal. The animals were randomly divided into 5 groups of 15 animals as follows: Group 1 – the lesions were only cleaned with saline solution (SS) on the left side and treated with mineral oil (MO) on the right side; Group 2 – the lesions were treated with MO on the left side and green coffee oil (GCO) on the right side; Group 3 – the lesions were treated with MO on the left side and roasted coffee oil (RCO) on the right side; Group 4 – the lesions were treated with MO on the left side and green coffee oil grounds (GCOG) on the right side; Group 5 – the lesions were treated with MO on the left side and roasted coffee oil grounds (RCOG) on the right side. Immediately after the wounds were produced, the first product application was performed on each lesion. The animals in Groups 2, 3, 4 and 5 were treated with topical MO on the left side wounds, the same considered as treatment on Group 1, to assess whether the coffee oils had a systemic effect on the animal. The lesions on each side were covered with different gauzes reinforced with tape to avoid admixtures of the different oils applied to the same animal. The animals had access to water with paracetamol to help control the pain. The wounds were cleaned with SS, the topical application of oils was repeated, and the bandages were replaced daily until the established euthanasia dates.

Sample collection

After random selection for euthanasia on days 2, 4, or 10 (five animals each day), the rats were anesthetized with thiopental (85.0 mg/kg-1). Photographs were taken, and blood was immediately collected to measure healing-related substances using ELISA. Skin sections of the shaved dorsal areas of two wounds on each side were excised to the fascia, with the proximal halves separated, for histological analysis.

Clinical evaluation

During the daily handling of each animal, the rate of wound contraction, the reduction of the erythema and edema, and the re-epithelization were visually assessed by comparing the lesions with each other and with previously taken photos.

Wound area

Wounds were photographed on days two, four and 10 after surgical intervention with a constant focal length. The unhealed areas were quantified by the "number of pixels". The reduction relative to the topographic opposite (on the left side) was determined for each wound treated (on the right side). In this way, the proportion of the treated wound that remained unhealed after the experiment began could be quantified in relation to the control side of the same animal. This proportion was considered 100% on day zero [16].

Histology

Sections of the euthanized animals were stained with hematoxylin and eosin (H&E) were blindly evaluated for the qualitative analysis, we evaluated the type of cells that made up the inflammatory environment. All animals presented fibroblasts and endothelial cells as well as few lymphomononuclear cells amid collagen bundles (mature granulation tissue). For the morphometric analysis (carried out in ten x 400 random fields and aided by an eyepiece with cycloids grid coupled to the ocular lens), all nuclei abutting the cycloids were counted on sections of the euthanized animals obtained on day 10 and the results were recorded as the arithmetical average, as previously described [17].

SHG analysis

Nonlinear imaging was used to evaluate the collagen organization of the skin via the second harmonic generation (SHG) technique. Images from wound areas were acquired from the National Institute of Photonics Applied to Cell Biology (INFABIC) using a microscope (Zeiss Axio Observer.Z1 LSM780; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with 512 × 512 pixels spatial resolution each. The sample was excited by a MaiTai Ti:Sapphire laser (Spectra Physics, Santa Clara, CA, USA) at a frequency of 800 nm and a 10x objective. For quantitative image analyses, we used the optical density tool in ImageJ (NIH, available from <http://rsb.info.nih.gov/ij>). Inside the wound, we selected the central area of the wound as the specific region of interest (ROI), and this box was used for all images.

RNA extraction

Samples of the healed area of the skin were obtained using 6 mm punches in the same location of the original lesions to avoid collecting normal skin, with samples collected from the two lesions on the control side and two lesions on the treated side closest to the animal's tail.

The wounds were homogenized in 1 mL of TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and the total RNA was obtained following the manufacturer's instructions. A High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used to reverse transcribed three micrograms of total mRNA.

Real-time PCR

For the PCR assay, each well contained 40 ng of cDNA, 0.5 µl of the specific primer, 5.0 µl of TaqMan Universal Master Mix (4369016, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and RNase -free water to a 10 µl final volume according to the manufacturer's recommendation. TaqMan PCR Master Mix Gene expression analyses were performed on a Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Rat Gapdh was used as the reference gene for all samples. The reference gene and the specific primers were purchased from Applied Biosystems and consisted of the following: adiponectin (Rn00595250_m1) IL-2 (Rn00587673_m1), IL-4 (Rn01456866_m1), IL-6 (Rn01410330_m1), IL-12 (Rn00575112_m1), IL-23 (Rn00590334_g1), IFN-α (Rn01400027_g1), IFN-γ (Rn00594078_m1) and IGF-1(Rn00710306_m1),. The average of the control group

(MO) on each treatment day (day 2, 4 or 10) was used as the calibrator sample for all groups. The PCR efficiency was calculated before the start of the experiments, and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was used to calculate gene expression [18].

ELISA

Serum was obtained by centrifuging of whole blood samples (10 min, 4°C, 3.500 RPM). This trial used the Quantitative Sandwich Enzyme Immunoassay Technique. Quantikine ELISA kits for IL-4, IL-12, IL-6, IGF-1, IFN- α and IFN- γ , were purchased from R&D Systems Minneapolis, MN, USA, and for leptin and adiponectin were purchased from Millipore, St. Charles. All plates were analyzed using a Bio-Rad 680 microplate reader, (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), at 450 nm and 570 nm wavelengths according to the manufacturer's recommendations.

Coffee oils extraction

The coffee oil was purchased wholesale from a trader of raw coffee beans produced by farmers in the region of Varginha, MG, Brazil.

Half of the beans were roasted in a Lilla -Coffee Roaster with capacity of 6 bags (60 kg/bag) of coffee beans (Lilla Inc, Guarulhos, SP, Brazil) following the typical method of producing coffee for domestic consumption in Brazil, and the beans were then processed at the cold -expeller press to extract the roasted coffee oil.

The second half was directly processed in the same press expeller. A Piratininga coffee -press adapted to extract coffee oil was used (Maquinas Piratininga Jaboatao dos Guararapes, PE, Brazil). Both oils were filtered in the filter press equipment. The green and roasted coffee grounds kept by the filter were used in the GCGO and RCGO treatments in this study.

Coffee oils composition

The essential fatty acids composition of the green and roasted coffee oils were analyzed by gas chromatography following the methodology described by the American Oil Chemists' Society (AOCS) [19]. The analysis conditions were as follows: capillary gas chromatograph (CGC), AGILENT 6850 SERIES GC SYSTEM (Agilent, Santa Clara, CA, USA); and capillary column, DB-23 AGILENT, with a (50% cyanopropyl)—methylpolysiloxane phase, 60 m length, 0.25 mm \varnothing int and 0.25 μ m

film. The operating conditions of the chromatograph were as follows: column flow rate = 1.00 mL/min; linear velocity = 24 cm/s; detector temperature = 280 °C; injector temperature = 250 °C; oven temperature = 110 °C for 5 min, 110 °C—215 °C at 5 °C/min, and 215 °C for 34 min; carrier gas = helium; and volume injected = 1.0 µL.

The phenolic composition of the oils was analyzed via gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). Aliquots of 100 µL of the oil samples were derivatized with 500 µL of N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, Trimethylchlorosilane (BSTFA + TCMS) solution (99: 1) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) at 60 °C for 3 h. The dilution of derivatized sample was 1:10. The column set consisted of aTR-5 at 7 m × 32 mm ($d_f = 0.25 \mu\text{m}$). The volume injected was 1 µL using a split/splitless injector (1:50) with a closed purge for 3.0 min. The injection port was kept at 280 °C, and the MS transfer lines were kept at 300 °C. For all runs, the oven temperature programming was set to increase from 60 °C to 240 °C at 3 °C min⁻¹. The MS ionization source was maintained at 250 °C and 70 eV, and the scan range was set from m/z 40-600 units (scanning interval, 0.064 s). Peak identification was performed by matching against the NIST 2010 (NIST – Gaithersburg, MD, USA) and the FFNSC (Chromaleont – Messina, Italy) spectra libraries [20, 21].

Statistical analysis

Two-way analyses of variance (2-way ANOVAs) and Bonferroni post-tests were used at a significance level of 5% using GraphPad Prism software.

Results

Clinical evaluation

The visual evaluation performed during the daily manipulation of each animal (for performing treatment renewal, taking photographs and changing dressing) indicated that if the wound was kept moist for a longer period, the wounds healed better [22], which was noticeable in the control group animals as shown in Fig. 1. The wounds on the right side, which received MO, show more advanced healing than the wounds on the left side, which were only cleansed with saline. A significant improvement in the Group 3 animals treated with RCO was noticeable compared with that of the other groups. In this group, more effective wound healing was observed starting on the

second and third days. The GCGO and RCGO treatments induced the formation of crusts at the wound site, which led to worsened cicatrization. Therefore, these groups could not be analyzed. Fig. 2 depicts representative images of Groups 1-5.



Fig. 1: Representative image of the wounds on a control group animal. The wounds on the left were only cleansed daily with saline whereas the wounds on the right were treated with MO. This photograph was taken 10 days after the wounding procedure. Bar = 1 cm



Fig. 2: Representative image of wound treated with MO (G1), GCO (G2) and RCO (G3). Wound healing was faster in G3, although significant differences were not observed among the groups.

Wound area

The ulcer areas measurement results (shown in Table 1) show that the wounds treated with RCO presented a higher healing speed (b) of the corresponding derivative. The second-degree derivative of the curves displays the effect, showing a two-fold faster healing process for the RCO treatment compared with the control group. The scarring area, however, was occasionally difficult to measure because of the presence of crusts that were not removed with the delicate cleansing. The crusts that persisted were not removed; therefore, the histological evaluations were the most relevant parameters.

Table 1. Wound area.

Treatment	Area Healed		Polynomial Regression Coefficients		Healing speed *
	25%	50%	A	B	
G1 MO	4.72	7.7	-5.9	0.422	0.422
G2 GCO	4.9	8.5	-2.8	0.622	0.622
G3 RCO	3.9	6.7	-3.7	0.986	0.986

Wound area healed, polynomial regression coefficients and healing speed of Groups 1-3. * Second-degree derivative

Histology

Initially we analyzed the samples subjectively. On day 2, wound re-epithelialization had begun and higher cellularity and noticeable deposition of young collagen were observed in the animals treated with GCO and RCO. On day 4 (proliferation phase), the re-epithelialization was more pronounced in the GCO and RCO -treated animals. Cellularity was already lower in animals treated with GCO and RCO, and wound filling was greater in the control group animals. On day 10 (remodeling phase), the animals exhibited complete wound re-epithelialization. Fig. 3 displays representative histological images on days 2, 4 and 10.

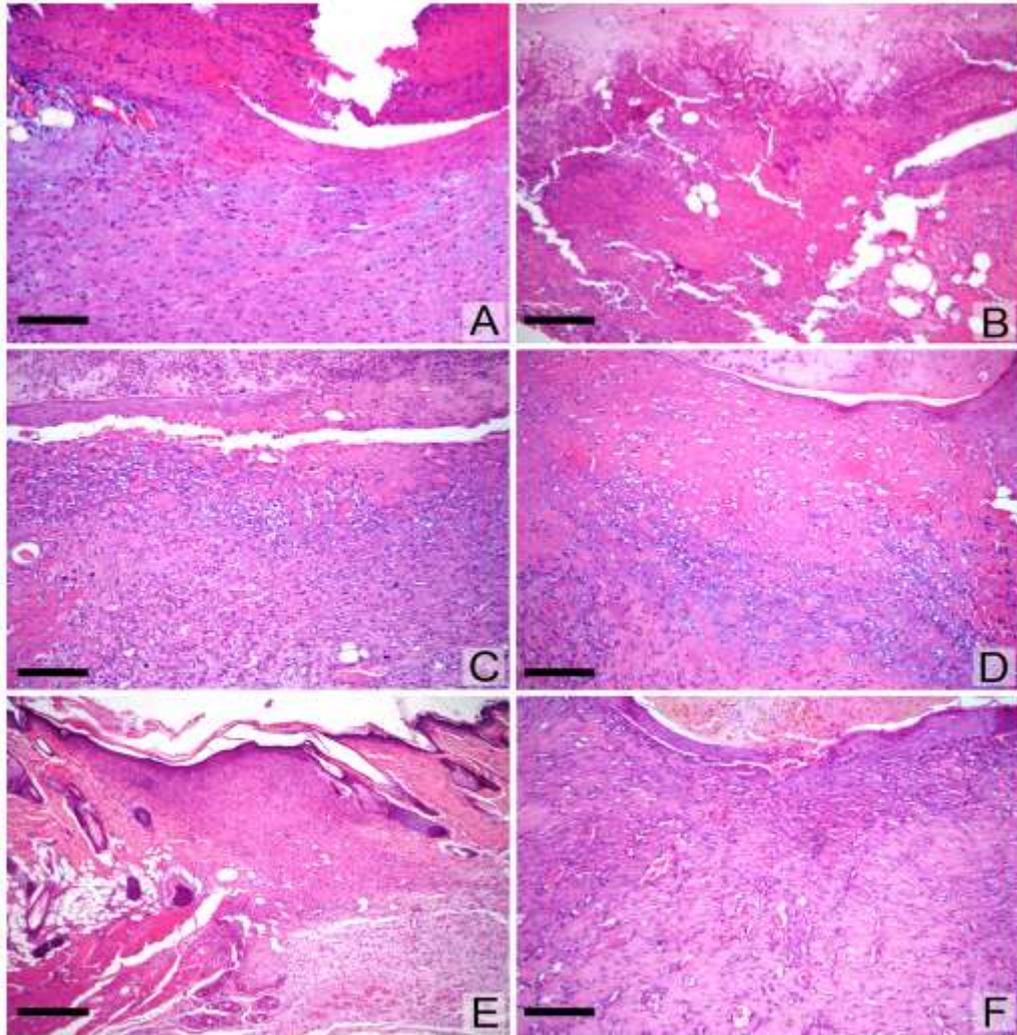


Fig. 3: Comparative histological analyses between the animals showing faster (A, C, E, F) and slower (B, D) healing . Incipient cellular connective tissue on the 2nd day after injury (A); only necrotic-inflammatory material at the base of the ulcer in the other animal (B). Granulation tissue with collagen fibers deposited on the 4th day (C) and only slightly increased cellularity (D). Granulation tissue extensively collagenized on the tenth day, with almost complete re-epithelialization and discrete unevenness of the cicatricial area (E, F). [H&E, original magnification x120 (A-D, F), x50 (E). Bar= 110 μ m (A-D,F); 250 μ m (E)].

As previously stated, the animals treated with GCGO and RCGO showed worse wound healing (Fig. 4) compared with the control animals, and they presented crusts and a persistent non-healed area.

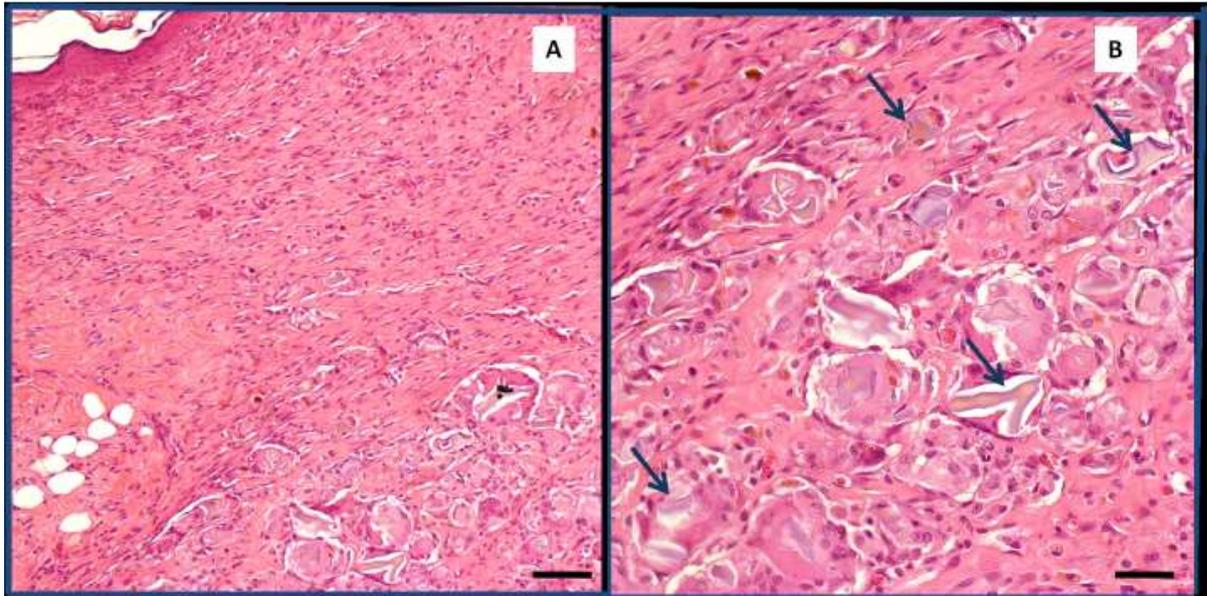


Fig. 4: Representative image of wound treated with coffee ground oils. On the 10th day of coffee ground oil treatment, the inflammatory process persisted within the depth of the dermis under the scar. Several foreign body giant cells (arrows) contain various forms of blue-brown material. [H&E, original magnification x100 (A) and x400 (B)]. Bar = 15 μm (A) and 20 μm (B)

Fig.5 depicts the cell count results observed for the wounded dermis area of all groups at day 10 after surgery. General statistically significant differences were observed between the treatment sides (left is the control and right is the treatments, $p = 0.001$), although statistically significant differences were not observed among the treatments.

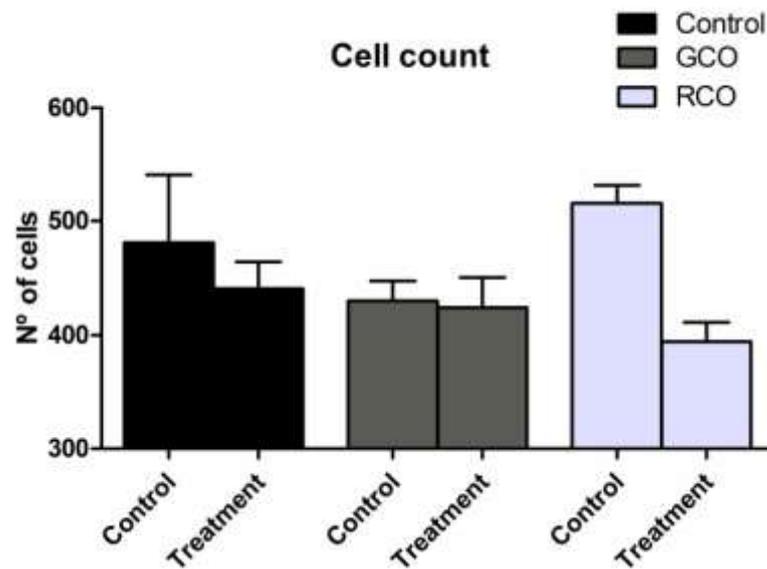


Fig. 5: Wound site cellularity. Number of cells in the wound bed sites of the control and treatment sides of each group.

SHG

Statistically significant differences in collagen density were observed between the controls on the left side ($4,404.83 \pm 1,011.74$ vs. $35,840.57 \pm 8,940.17$, $p = 0.05$). SS applied with MO (control group) presented lower values compared with MO applied with RCO, and the wounds treated with GCO had higher collagen densities than the control wounds ($14,853.77 \pm 9,034.13$ vs. $70,089.94 \pm 30,071.20$, $p = 0.05$). The Fig. 6 displays representative SHG images of wounds treated with MO, GCO and RCO.

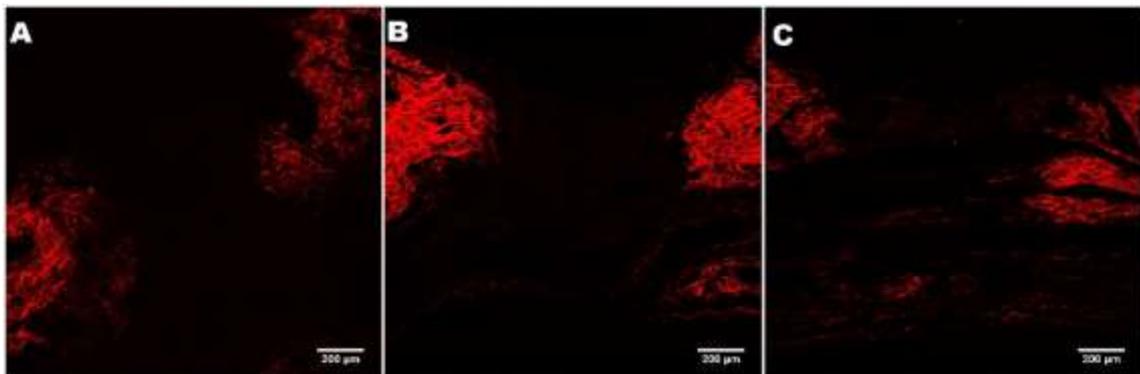


Fig. 6: Representative images of wounds used in the SHG analysis. Image A (control group); B (GCO group); and C (RCO group). All images were taken with a 10x objective lens.

Real-time PCR

The real-time PCR results are presented as the fold change in expression relative to that of the control group (MO treatment).

We found that the GCO treatment increased the levels of IL-6 mRNA at the wound site throughout the experiment, especially on days 2 (7.94 ± 0.18 -fold change vs. 1.00 ± 0.18 in the control) and 4 (6.90 ± 3.35 -fold change vs. 1.00 ± 0.21 of the control group and 0.75 ± 0.44 of the RCO group) and increased the levels of IL-23 mRNA on day 4 (7.93 ± 5.13 -fold change vs. 1.20 ± 0.30 of the control group). Animals treated with RCO had higher levels of IL-6 mRNA on day 2 (10.72 ± 3.05 -fold change vs. 1.00 ± 0.18 in the control group), IL-23 on day 4 (4.10 ± 3.9 -fold change vs. 1.20 ± 0.30 in the control group), IGF-1 on day 4 (2.78 ± 1.00 -fold change vs. 1.00 ± 0.1 in the control group) and IL-12 on day 10 (3.32 ± 0.76 -fold change vs. 1.00 ± 0.10 in the control group). The other cytokines did not have statistically significant results. The results of the cytokine analysis of the tissue samples are shown in Fig. 7.

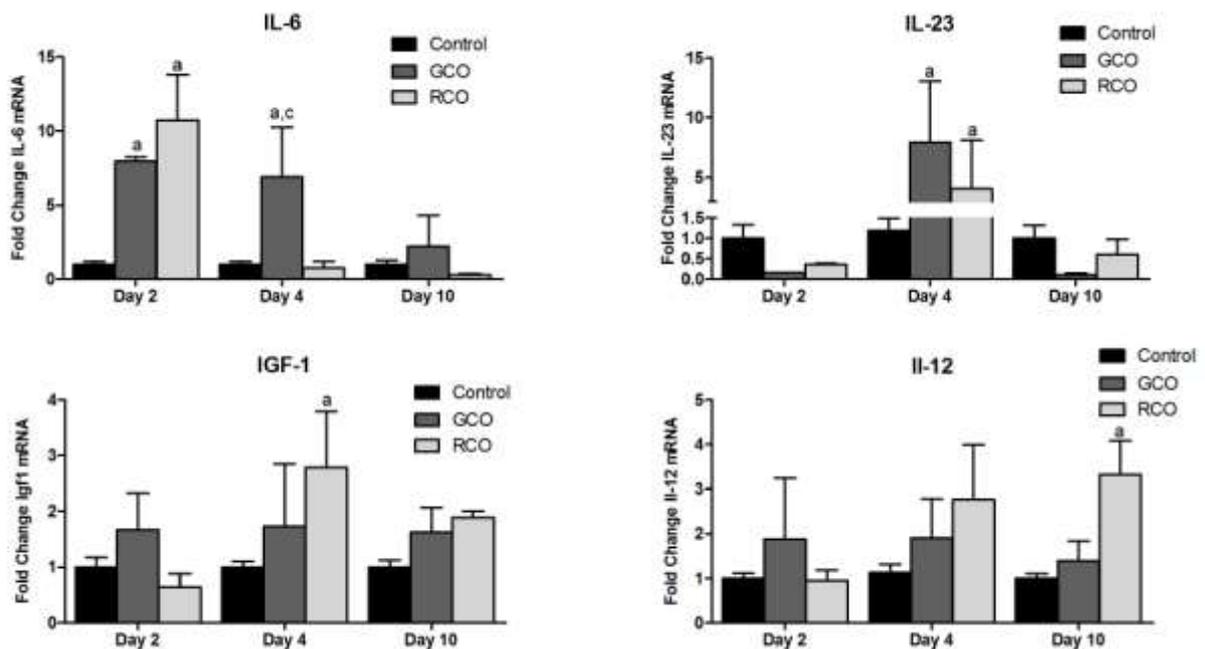


Fig. 7: qPCR results for IGF-1, IL-6, IL-12 and IL-23. The letters above the bars represent a statistically significant difference between the group represented by the bar and the group represented by the letter as follows: a = control; b = GCO; c =RCO; d =GCGO; and e = RCGO. The p-values are as follows: IGF-1, $p = 0.01$; IL-12, $p = 0.05$; IL-6, $p = 0.001$ for RCO and $p = 0.01$ for GCO; IL-23, $p = 0.001$ for GCO, $p = 0.05$ for RCO and $p = 0.05$ for GCO vs. RCO.

The IGF-1, IL-6 and IL-23 (beneficial for wound healing, mainly in early stages) results are consistent with the improved healing observed in animals treated with RCO and GCO in this study. A positive IL-12 (anti-inflammatory, important at later stages) result was observed on day 10 in the RCO treatment.

ELISA

ELISA tests were performed to assess whether the topical application of oils could induce a systemic response.

The animals treated with RCO and GCO had lower systemic levels of IFN- γ on day 4 compared with that of the control animals (43.03 ± 5.79 , 11.97 ± 11.63 and 196.45 ± 119.44 pg/mL, respectively), and the RCO treatment also reduced the levels of IL-4 on day 4 (0.9 ± 0.9 pg/mL vs. 13.36 ± 3.88 pg/mL) and adiponectin on day 10 ($8,367.47 \pm 1,302.80$ pg/mL vs. $16,526.38 \pm 1,858.37$) compared with that of control. This treatment also increased the systemic levels of IFN- α throughout the entire experiment compared with that of the control (day 2, 52.53 ± 2.77 pg/mL vs. 21.20 ± 2.57 ; day 4, 46.98 ± 2.40 vs. 21.56 ± 1.74 ; day 10, 83.61 ± 15.08 vs. 25.69 ± 9.80).

Fig. 8 shows the cytokines levels that had a statistically significant response.

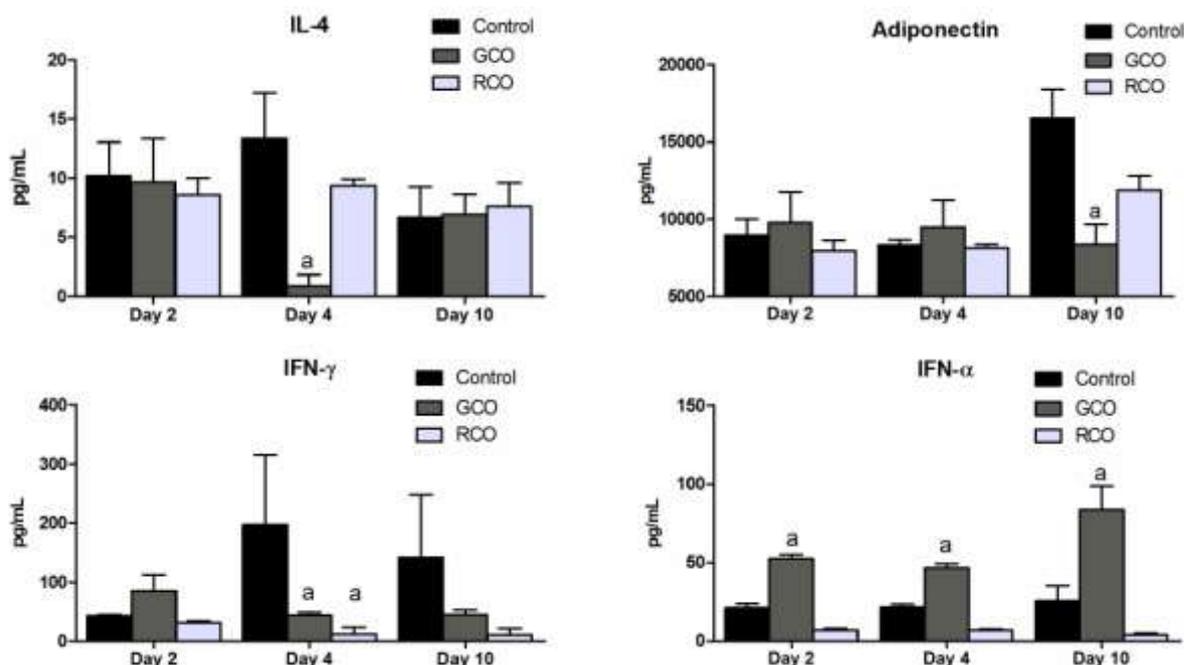


Fig. 8: Graphs representing the ELISA results for IL-4, adiponectin, IFN- γ and IFN- α . The p-values are as follows: IL-4, $p = 0.01$; adiponectin, $p = 0.001$; IFN- γ , $p = 0.01$ for RCO and $p = 0.05$ for GCO and IFN- α , $p = 0.05$.

The circulating levels of IL-4 (beneficial for wound healing in initial stages) found in the GCO-treated animals are consistent with a better healing outcome. IFN- α , IFN- γ and adiponectin are cytokines important at later stages of healing and represent anti-inflammatory substances. The IFN- γ (for RCO and GCO) and adiponectin (for GCO) levels were consistent with the improved outcome found with these treatments. However, animals had higher systemic levels of IFN- α in the GCO treatment throughout the experiment.

Coffee oil composition

The complete essential fatty acids compositions of the green and roasted coffee oils are detailed in Table 2. The fatty acids observed at high percentages were linoleic, palmitic, oleic and stearic acids in both oils. Statistically significant differences for the presence of these compounds were not observed.

Table 2. Essential fatty acid compositions of GCO and RCO.

Compound	% in GCO	% in RCO
C14:0	0.13	0.12
C15:0	0.04	0.03
C16:0	34.8	32.2
C16:1	0.04	0.04
C17:0	0.14	0.13
C18:0	7.79	8.45
C18:1	9.29	10.53
C18:2 trans	-	0.03
C18:2	41.86	42.4
C18:3	1.47	1.52
C20:0	2.99	3.06
C20:1	0.33	0.33
C22:0	0.84	0.87
C24:0	0.3	0.31

GCO, green coffee oil; RCO, roasted coffee oil.

Differences were observed in the phenolic composition of these oils. The main compounds of the GCO are listed in Table 3, and they consisted of hexadecanoic acid (trimethylsilyl ester), 9,12-octadecadienoic acid (methyl ester), 9,12-octadecadienoic acid (trimethylsilyl ester) and hexadecanoic acid. Additionally, 29.7% of the compounds were not identified.

Table 3. Phenolic composition of the GCO.

Compound Name	Molecular formula	Area (%)
Cyclohexanone, 2-methyl	C ₇ H ₁₂ O	0,09
1H-Pyrrole, 2,5-dihydro	C ₄ H ₇ N	0,27
Caffeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	1,46
Tetradecanoic acid, trimethylsilyl ester	C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si	0,13
Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	6,6
Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	29,54
9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	15,62
9,12-Octadecadienoic acid, trimethylsilyl ester	C ₂₁ H ₄₀ O ₂ Si	12,3
Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	C ₂₁ H ₄₄ O ₂ Si	1,01
Docosanoic acid	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	0,36
Eicosanoic acid, trimethylsilyl ester	C ₂₃ H ₄₈ O ₂ Si	1,36
Di-n-octyl phthalate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	0,94
9-Octadecenoic acid (Z)	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	0,62
Unidentified compounds	-	29,7

The main compounds of the RCO as identified by GC-MS was hexadecanoic acid (trimethylsilyl ester), 9,12-octadecadienoic acid (methyl ester), hexadecanoic acid, octadecanoic acid and unidentified compounds (47.20%) as shown in Table 4.

Table 4. Phenolic composition of the RCO.

Compound Name	Molecular formula	Area (%)
2,4-Decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	0,12
1H-Pyrrole, 2,5-dihydro	C ₄ H ₇ N	0,04

Caffeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	1,29
Tetradecanoic acid, trimethylsilyl ester	C ₁₇ H ₃₆ O ₂ Si	0,1
Hexadecanoic acid, methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	0,04
Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	9,08
Hexadecanoic acid, trimethylsilyl ester	C ₁₉ H ₄₀ O ₂ Si	17,19
9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	14,37
Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	8,81
Docosanoic acid	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	1,06
α-Springene	C ₂₀ H ₃₂	0,57
Tetratetracontane	C ₄₄ H ₉₀	0,08
2,6,10,14-Tetramethylheptadecane	C ₂₁ H ₄₄	0,05
Unidentified compounds	-	47,2

Discussion

On day 2 (inflammation phase) the vessels were congested. A greater number of dilated vessels at this stage corresponded to faster healing because neutrophils and monocytes are attracted to the wound site [23]. On day 4 (proliferation phase), the vessels were no longer highly dilated, but their cells began to proliferate. Collagen was observed in greater quantities on day 4 for wounds showing earlier healing.

On day 10 (initial remodeling phase): Some animals still had remnants of young collagen (the same as the second day) that had not yet been replaced by the mature, thick fibers. A considerable area of the cavity formed in the experiment was already filled; however, the central area was still depressed relative to the adjacent normal skin [14].

The results summarized in Fig. 5 shows that the group treated with RCO had a lower cell count, although the difference was not significant. This finding could be explained by the low number of animals used in each group.

As the wound healing process advances, fibroblasts should produce and deposit collagen into the extracellular matrix. SHG microscopy is a non-linear imaging technique that provides morphological information on biological tissues. Collagen fibers produce a good SHG signal [24]. SHG has been used for the study of the distribution, orientation and quantification of collagen in different tissues, diseases such as tumors, scars and for the evaluation of skin photodamage. In the RCO-group, the lesions treated with MO, had a higher collagen density compared with the control group; and in the GCO-group, the lesions treated with MO presented a similar result. This finding might suggest a systemic effect of roasted coffee oil when topically applied to animal skin.

As previously stated, the wound healing response is regulated by a large quantity of cytokines secreted by the associated cells [25]. Of the cytokines analyzed in our study, IGF-1, IL-4, IL-6, IL-23 are pro-inflammatory substances that are important at the initial stages of wound healing, whereas adiponectin, IL-12, IFN- α and IFN- γ are anti-inflammatory substances that are important at later stages of wound healing.

Adiponectin is secreted from adipocytes and is a metabolic regulator of lipids and glucose [26]. A study using a mouse model found that when adiponectin is directly injected into the wound edge, accelerated wound healing occurred [27]. Our results showed that the use of GCO decreases the level of circulating adiponectin compared with the control group. In another study on adiponectin's role in wound healing, the authors found that it suppressed keratinocyte differentiation and proliferation and induced apoptosis [28]. The use of RCO and GCO reduced the serum adiponectin levels during all time points of our study, which is consistent with the results found in the histological evaluation and the results of the study performed by Kawai and colleagues. However, further studies on the action of adiponectin in skin wound healing are necessary to clarify its role. We found that treatment with GCO can increase the levels of IFN- α produced by the animals on days 2, 4 and 10 because it was detected in serological analysis by ELISA throughout the treatment period. IFN- α plays a key role in innate immune responses and primes the immune system for

subsequent adaptive immune responses. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) are the major source of IFN- α [29] and represent a rare population of circulating cells that specialize in the production of large amounts of type I IFNs [30]. pDCs have recently been identified as a major IFN- α inducer in wounded mouse and human skins, and these cells may be able to distinguish self-DNA from skin cells injured at the wound site, which lead to increased IFN mRNA expression via the Toll-like Receptor (TLR)-7 and TLR9 endosomal pathways and skin reepithelialization [30].

The use of GCO and RCO decreased the systemic level of IFN- γ on day 4 compared with the other treatments. IFN- γ exerts regulatory functions to limit the tissue damage associated with inflammation [29]. A study performed by Tanno and collaborators found that skin wound healing in rats was enhanced by inducing the early-phase production of IFN- γ . In that group, the IFN- γ roles may have differed between the early (activate macrophage phagocytosis and promote VEGF production) and late stages (inhibit TGF- β) [31].

IGF-1 is a growth factor produced by fibroblasts and other epithelial cells, and it plays an important role in re-epithelialization and granulation tissue formation during the wound healing process [32]. One of its roles is vascular endothelial insulin/IGF-1 signaling in the homeostasis of the skin vasculature and in neovascularization on the skin during wound healing [33]. Because of the role of IGF-1 in angiogenesis, promoting high levels in the early stages of the wound healing process is important. In this study, we found higher levels of IGF-1 mRNA expressed in the skin of the animals treated with RCO on day 4 of treatment compared with that of the control animals.

IL-6 plays an important role at the beginning of the inflammatory response and act as a chemotactic factor for leucocyte recruitment. Butzelaar and colleagues found that lower levels of this cytokine in the early stage of skin wound healing could lead to hypertrophic scar formation [34]. Our group found higher levels of IL-6 mRNA expressed at the wound site in the animals treated with GCO on days 2 and 4 and with RCO on day 2, and the RCO-treated animals showed better wound healing among all groups of this experiment. None of the animals in our study had hypertrophic scars, which is consistent with the results found by other researchers. Another study stated that IL-6 deficiency can lead to hyper-inflammatory macrophage activation, which

could produce a chronic wound state because of the destruction of the newly formed tissue [35].

IL-12 is a cytokine primarily produced by monocytes, macrophages and dendritic cells and is likely involved in the development of cell-mediated immunity [36]. This cytokine induces IFN- γ synthesis [37], and a previous study demonstrated that the administration of additional IL-12 on acute skin wound sites increased the local metabolic rate, which benefited the healing process [38]. The results of this study suggest that the topical use of RCO in wounds may have promoted the local synthesis of IL-12 without interfering with its systemic levels.

The relatively recently discovered IL-23 cytokine is involved in the pathogenesis of psoriasis (an injection of this cytokine can lead to psoriatic lesions formation on the skin), and it is related to the IL-12 and Th17 responses [39]. Our study found higher levels of IL-23 mRNA in GCO and RCO-treated animals on day 4. One of the possible actions of this cytokine is the hyperproliferation of keratinocytes (a sign of psoriasis). This result is consistent with the IL-12 data and may indicate possible crosstalk among these substances in skin cell proliferation [40].

The differences observed between the GCO and RCO-treated animals could be associated with the phenolic composition of these oils, because statistically significant differences in the fatty acid composition were not observed. Our results showed higher quantities of hexadecanoic acid and trimethylsilyl ester in the GCO and higher quantities of octadecanoic acid in RCO. The percentage of unidentified compounds (29,7% in GCO and 47,20% in RCO) was an interesting finding. Several studies have focused on the efficacy of using coffee oil for improving skin, and green beans have generally been used as the source [10, 13]. Further studies are needed to detail the total composition of these oils.

Conclusions

In summary, the results presented here encourage the use of RCO on skin wounds. Both coffee oils (GCO and RCO) produced systemic effects as observed in the serum cytokine levels and SHG analysis results. Further studies may identify the most active molecules and the mechanisms of action.

Acknowledgements

This study was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) under grant number PIPE - 2007/59319-5 and the Fundo de Apoio a Dermatologia de Sao Paulo (FUNADERSP) (grant numbers 015/2014 and 043/2016). Authors BGL, NBM and PENFV have a pending patent request (deposition number BR 10 2012 029163 0 at the National Institute of Industrial Property – INPI and Patent Cooperation Treaty number PCT/BR2013/000459) on the use of coffee oil in different compositions for topical application on skin.

We acknowledge the assistance provided by Prof. Carla Beatriz Grespan Bottoli, Ph.D. (NovaCrom – Liquid Chromatography Laboratory, Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemistry - University of Campinas), Fernanda F. G. Dias, Ph.D.; Luiz F. O. Miron, and Prof. Leandro Wang Hantao (IQ-UNICAMP) in the GC-MS analyses. Which were funded by FAPESP under grant n. 2015/05059-9; Prof. Daniel Barrera-Arellano (Fats and Oils Laboratory, Food and Technology Department, Faculty of Food Engineering, University of Campinas) with the fatty acid composition analyses.

References

1. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM. Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1: Normal and Chronic Wounds: Biology, Causes, and Approaches to Care. *Adv Skin Wound Care*. 2012;25(7):304-14. doi: 10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0. PubMed PMID: 22713781; PubMed Central PMCID: PMC3428147.
2. Järbrink K, Ni G, Sönnnergren H, Schmidtchen A, Pang C, Bajpai R, et al. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Syst Rev*. 52016.

3. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-46. Epub 1999/09/02. doi: 10.1056/nejm199909023411006. PubMed PMID: 10471461.
4. Nascimento AP, Costa AM. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br J Nutr*. 2006;96(6):1069-77. Epub 2006/12/22. PubMed PMID: 17181882.
5. MacLeod AS, Mansbridge JN. The Innate Immune System in Acute and Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016;5(2):65-78. Epub 2016/02/11. doi: 10.1089/wound.2014.0608. PubMed PMID: 26862464; PubMed Central PMCID: PMC4742992.
6. Ashcroft GS, Jeong MJ, Ashworth JJ, Hardman M, Jin W, Moutsopoulos N, et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*. 2012;20(1):38-49. Epub 2011/12/14. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00748.x. PubMed PMID: 22151742; PubMed Central PMCID: PMC3287056.
7. Dawid-Pac R. Medicinal plants used in treatment of inflammatory skin diseases. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013;30(3):170-7. Epub 2013/11/28. doi: 10.5114/pdia.2013.35620. PubMed PMID: 24278070; PubMed Central PMCID: PMC3834722.
8. Gupta A, Upadhyay NK, Sawhney RC, Kumar R. A poly-herbal formulation accelerates normal and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(6):784-90. Epub 2009/01/09. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00431.x. PubMed PMID: 19128249.
9. Yuwono HS. The New Paradigm of Wound Management Using Coffee Powder. *Global Journal of Surgery*. 2014;2(2):25-9. doi: 10.12691/js-2-2-2.
10. Wagemaker TAL, Brazil UoSPFoPSoRPRP, Portugal ULRCiBHTCL, Rijo P, Portugal ULRCiBHTCL, Rodrigues LM, et al. Integrated approach in the assessment of skin compatibility of cosmetic formulations with green coffee oil. *International Journal of Cosmetic Science*. 2016;37(5):506-10. doi: 10.1111/ics.12225.

11. Agriculture USDo. Coffee: World Markets and Trade. Report. USDA website: 2017 12/2016. Report No.
12. Oliveira LS, Franca AS, Camargos RR, Ferraz VP. Coffee oil as a potential feedstock for biodiesel production. *Bioresour Technol.* 2008;99(8):3244-50. Epub 2007/08/19. doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.074. PubMed PMID: 17697777.
13. Ribeiro H, Faculty of Pharmacy RIfMaPSiU, University of Lisbon, Portugal, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa APGP, 1649-003 Lisboa, Portugal Fax: 351 217937703, Marto J, Faculty of Pharmacy RIfMaPSiU, University of Lisbon, Portugal, Raposo S, et al. From coffee industry waste materials to skin-friendly products with improved skin fat levels. *European Journal of Lipid Science and Technology.* 2017;115(3):330-6. doi: 10.1002/ejlt.201200239.
14. Pirila E, Parikka M, Ramamurthy NS, Maisi P, McClain S, Kucine A, et al. Chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen promote wound healing in ovariectomized rats: effects on matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and laminin-5 gamma2-chain. *Wound Repair Regen.* 2002;10(1):38-51. Epub 2002/05/02. PubMed PMID: 11983005.
15. Dorsett-Martin WA, From the Department of Surgery DoPS, School of Medicine, The University of Mississippi Medical Center, Jackson, Mississippi. Rat models of skin wound healing: A review. *Wound Repair and Regeneration.* 2017;12(6):591-9. doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.12601.x.
16. Gomes FP. Capítulo 14: Experimento com animais. *Curso de Estatística Experimental.* 1: Editora Nobel; 1981.
17. Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *Journal of Microscopy.* 1977;111(2):219-23. doi: 10.1111/j.1365-2818.1977.tb00062.x.
18. de Moura RF, Nascimento LF, Ignacio-Souza LM, Morari J, Razolli DS, Solon C, et al. Hypothalamic stearoyl-CoA desaturase-2 (SCD2) controls whole-body energy expenditure. *Int J Obes (Lond).* 2015. Epub 2015/09/24. doi: 10.1038/ijo.2015.188. PubMed PMID: 26392016.

19. Society AOC, Firestone D. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society: AOCS press; 1994.
20. Hantao L, Toledo B, Ribeiro F, Pizetta M, Pierozzi C, Furtado E, et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography combined to multivariate data analysis for detection of disease-resistant clones of Eucalyptus. *Talanta*. 2013;116:1079-84. doi: 10.1016/j.talanta.2013.08.033. PubMed PMID: WOS:000328176000156.
21. Poole C. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. *Journal of Chromatography a*. 2013;1296:2-14. doi: 10.1016/j.chroma.2013.01.097. PubMed PMID: WOS:000320821300002.
22. Bloom H. 'CELLOPHANE' DRESSING FOR SECOND-DEGREE BURNS. *The Lancet*. 1945;246(6375):559. doi: 10.1016/S0140-6736(45)91274-8.
23. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75-81. Epub 1997/04/04. PubMed PMID: 9082989.
24. Cicchi R, Kapsokalyvas D, De Giorgi V, Maio V, Van Wiechen A, Massi D, et al. Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *J Biophotonics*. 2010;3(1-2):34-43. Epub 2009/09/23. doi: 10.1002/jbio.200910062. PubMed PMID: 19771581.
25. Bryan D, Walker KB, Ferguson M, Thorpe R. Cytokine gene expression in a murine wound healing model. *Cytokine*. 2005;31(6):429-38. Epub 2005/08/17. doi: 10.1016/j.cyto.2005.06.015. PubMed PMID: 16102971.
26. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;423(6941):762-9. Epub 2003/06/13. doi: 10.1038/nature01705. PubMed PMID: 12802337.
27. Salathia NS, Shi J, Zhang J, Glynn RJ. An in vivo screen of secreted proteins identifies adiponectin as a regulator of murine cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol*. 2013;133(3):812-21. Epub 2012/10/26. doi: 10.1038/jid.2012.374. PubMed PMID: 23096717; PubMed Central PMCID: PMC3572451.

28. Kawai K, Kageyama A, Tsumano T, Nishimoto S, Fukuda K, Yokoyama S, et al. Effects of adiponectin on growth and differentiation of human keratinocytes--implication of impaired wound healing in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374(2):269-73. Epub 2008/07/22. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.045. PubMed PMID: 18639522.
29. Mikita N, Ikeda T, Ishiguro M, Furukawa F. Recent advances in cytokines in cutaneous and systemic lupus erythematosus. *J Dermatol.* 2011;38(9):839-49. Epub 2011/07/20. doi: 10.1111/j.1346-8138.2011.01237.x. PubMed PMID: 21767292.
30. Gregorio J, Meller S, Conrad C, Di Nardo A, Homey B, Lauerma A, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med.* 2010;207(13):2921-30. doi: 10.1084/jem.20101102. PubMed PMID: 21115688.
31. Tanno H, Kawakami K, Ritsu M, Kanno E, Suzuki A, Kamimatsuno R, et al. Contribution of Invariant Natural Killer T Cells to Skin Wound Healing. *Am J Pathol.* 2015;185(12):3248-57. Epub 2015/10/16. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.08.012. PubMed PMID: 26468976.
32. Talebpour Amiri F, Fadaei Fathabadi F, Mahmoudi Rad M, Piryaee A, Ghasemi A, Khalilian A, et al. The Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 Gene Therapy and Cell Transplantation on Rat Acute Wound Model. *Iran Red Crescent Med J.* 2014;16(10). doi: 10.5812/ircmj.16323. PubMed PMID: 25558384; PubMed Central PMCID: PMC4270678.
33. Aghdam S, Eming S, Willenborg S, Neuhaus B, Niessen C, Partridge L, et al. Vascular endothelial insulin/IGF-1 signaling controls skin wound vascularization. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2012;421(2):197-202. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.134. PubMed PMID: WOS:000304220200007.
34. Butzelaar L, Schooneman DP, Soykan EA, Talhout W, Ulrich MM, van den Broek LJ, et al. Inhibited early immunologic response is associated with hypertrophic scarring. *Exp Dermatol.* 2016;25(10):797-804. Epub 2016/06/02. doi: 10.1111/exd.13100. PubMed PMID: 27249786.
35. Das LM, Rosenjack J, Au L, Galle PS, Hansen MB, Cathcart MK, et al. Hyperinflammation and skin destruction mediated by rosiglitazone activation of macrophages

in IL-6 deficiency. *J Invest Dermatol*. 2015;135(2):389-99. Epub 2014/09/04. doi: 10.1038/jid.2014.375. PubMed PMID: 25184961; PubMed Central PMCID: PMC4291681.

36. Gerber SA, Cummings RJ, Judge JL, Barlow ML, Nanduri J, Johnson DE, et al. Interleukin-12 preserves the cutaneous physical and immunological barrier after radiation exposure. *Radiat Res*. 2015;183(1):72-81. Epub 2015/01/08. doi: 10.1667/rr13802.1. PubMed PMID: 25564716; PubMed Central PMCID: PMC4306454.

37. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):133-46. Epub 2003/02/04. doi: 10.1038/nri1001. PubMed PMID: 12563297.

38. Li J, Bower AJ, Vainstein V, Gluzman-Poltorak Z, Chaney EJ, Marjanovic M, et al. Effect of recombinant interleukin-12 on murine skin regeneration and cell dynamics using in vivo multimodal microscopy. *Biomed Opt Express*. 2015;6(11):4277-87. Epub 2015/11/26. doi: 10.1364/boe.6.004277. PubMed PMID: 26600994; PubMed Central PMCID: PMC4646538.

39. Meglio PD, Nestle FO. The role of IL-23 in the immunopathogenesis of psoriasis. *F1000 Biol Rep*. 2010;2. doi: 10.3410/b2-40. PubMed PMID: 20948793.

40. Bollag WB, Hill WD. CXCR4 in Epidermal Keratinocytes: Crosstalk within the Skin*. *J Invest Dermatol*. 2013;133(11):2505-8. doi: 10.1038/jid.2013.271. PubMed PMID: 24129780; PubMed Central PMCID: PMC3966191.

4.2. Artigo 2

21/12/2017

Gmail - Submission Confirmation for PONE-D-17-44392 - [EMID:3c347f8764a9cba2]



Bruno Grosse Lania <bruglania@gmail.com>

Submission Confirmation for PONE-D-17-44392 - [EMID:3c347f8764a9cba2]

1 mensagem

PLOS ONE <em@editorialmanager.com>
 Responder a: PLOS ONE <plosone@plos.org>
 Para: Bruno Grosse Lania <bruglania@gmail.com>

20 de dezembro de 2017 14:14

PONE-D-17-44392
 Topical essential fatty acid oil on wounds: local and systemic effects
 PLOS ONE

Dear Mr Lania,

Thank you for submitting your manuscript entitled 'Topical essential fatty acid oil on wounds: local and systemic effects' to PLOS ONE. Your assigned manuscript number is PONE-D-17-44392.

We will now begin processing your manuscript and may contact you if we require any further information. You will receive an update once your manuscript passes our in-house technical check; you can also check the status of your manuscript by logging into your account at <http://pone.edmgr.com/>. If you have any inquiries or other comments regarding this manuscript please contact plosone@plos.org.

PLOS is considering offering a service where we would post your manuscript to a preprint server (like arXiv or bioRxiv) while it continues on its way through our editorial process. If this service were offered today, would you participate and allow us to post your manuscript?

Yes, I would allow you to post my manuscript. <http://surveys.plos.org/s3/ponePreprintInterest?answer=YesAllow>

No, I would not allow you to post my manuscript. <http://surveys.plos.org/s3/ponePreprintInterest?answer=DoNotAllow>

Thank you for your support of PLOS ONE.

Kind regards,
 PLOS ONE

Topical essential fatty acid oil on wounds: local and systemic effects

Effects of essential fatty acid oil on wounds

Lista de autores: Bruno Grosselli Lania^{1,¶,*}; Joseane Morari^{2,¶}; Amanda Roberta de Almeida^{1,¶}; Marilene Neves da Silva^{1,&}; Gislaine Veira-Damiani^{1,&}; Karina de Almeida Lins^{1,&}; Carlos Lenz César^{3,&} Lício Augusto Velloso^{2, 4,&}; Nilson Borlina Maia^{5,&}; Maria Letícia Cintra^{6,¶}; Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho^{1, 4,¶}

1 – Laboratório de pesquisa aplicada à dermatologia e infecção por Bartonella – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, Brasil.

2 – Laboratório de Sinalização Celular e Centro de Pesquisa em Obesidade e Comorbidades - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, Brasil.

3 – Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular – Instituto de Física Gleb Wataghin, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, Brasil.

4 – Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, Brasil.

5 – Departamento de Plantas Aromáticas – Instituto Agrônomo de Campinas. São Paulo, Brasil.

6 – Departamento de Anatomia Patológica. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. São Paulo, Brasil.

Autor correspondente: bruglania@gmail.com (BGL)

¶: Esses autores contribuíram igualmente para o trabalho.

&: Esses autores também contribuíram igualmente para o trabalho.

Palavras-chave: Cicatrização. Feridas. Helianthus. Modelo animal. Pele. Segurança de produtos ao consumidor.

Resumo

Introdução: O uso de plantas medicinais e seus derivados está aumentando, e aproximadamente um terço de todos os fitoterápicos tradicionais são destinados ao tratamento de feridas. Os produtos naturais usados nesses tratamentos incluem óleos vegetais, que são ricos em ácidos graxos essenciais. Uma vez em contato com uma superfície ulcerativa, o óleo atinge os vasos sanguíneos e linfáticos, provocando efeitos sistêmicos.

Objetivo: Este estudo avaliou os possíveis efeitos locais e sistêmicos de ácidos graxos essenciais (óleo de girassol) aplicados topicamente em feridas de ratos.

Métodos: Feridas incisionais cutâneas de espessura total (6 mm) foram produzidas utilizando-se bisturi circular no dorso de 30 ratos. Solução salina (SS), óleo mineral (MO) ou ácido graxo essencial (AGE) foram aplicadas topicamente. A cicatrização foi avaliada após 2, 4 e 10 dias (n = 5 por grupo) por exame visual e histológico / morfométrico, microscopia de segunda geração harmônica (SHG) e quantificação de citocinas e fatores de crescimento no tecido cicatricial (PCR em tempo real) e no soro (Elisa).

Resultados: animais tratados com MO / AGE apresentaram maior expressão de RNAm de IGF-1, leptina, IL-6 e IFN- γ e menores concentrações séricas de IL-6 que animais controle (SS / MO). A análise de SHG não mostrou diferença na densidade de colágeno entre os animais tratados com MO e AGE.

Conclusão: O tratamento com AGE induz efeitos tópicos (observados pelo IGF-1, leptina, IL-6 e IFN- γ) e sistêmicos, diminuindo a concentração de IL-6 no soro. Como o óleo é amplamente utilizado para encurtar o tempo de cicatrização da úlcera, estudos são necessários para avaliar a segurança do tratamento e possíveis efeitos indesejáveis.

Introdução

O processo de cicatrização envolve quatro fases altamente integradas e sobrepostas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação tecidual [1]. A

complexidade molecular do processo de reparo da ferida deriva do fato de que ele é modulado por centenas de genes envolvidos como fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatória e na sinalização de citocinas [2]. A pele é agora reconhecida como um órgão endócrino, que pode produzir hormônios, expressar diferentes receptores e modular a produção local de citocinas [3].

Estratégias baseadas em plantas e drogas à base de plantas são abordagens alternativas para o tratamento de feridas, principalmente nos países em desenvolvimento, devido à sua simplicidade e baixo custo [4, 5]. Quase 65% da população mundial usou plantas como agentes medicinais nas modalidades de cuidados primários de saúde e aproximadamente um terço de todos os medicamentos fitoterápicos tradicionais são destinados ao tratamento de feridas ou doenças da pele, em comparação com apenas 1-3% dos medicamentos modernos [2].

Em relação aos extratos de plantas medicinais, os óleos são usados principalmente para fins de tratamento da pele, especialmente aqueles ricos em ácidos graxos essenciais (AGE), porque esses compostos (como o ácido linoleico) são necessários para manter a integridade epidérmica e a barreira de água da pele [6]. O óleo de semente de girassol contém lipídios de composição semelhante ao estrato córneo [7] e é um dos óleos mais aplicados que podem ser usados em uma dieta regular [8]. Entretanto, a segurança desses óleos deve ser testada, pois podem induzir uma resposta inflamatória [9]. Nos hospitais brasileiros, é comum a aplicação de gases incorporados ao AGE nas feridas (como úlceras de pressão) [6].

Avaliamos os efeitos sistêmicos locais e possíveis da aplicação tópica de um óleo rico em AGE em feridas cutâneas de ratos.

Materiais e métodos

Trinta ratos Sprague-Dawley fêmeas (linhagem NTacUnib: SD), com idade média de sete semanas, foram obtidas no Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade de Campinas (CEUA) sob o protocolo número 2929-1 e foi conduzido de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e do Conselho Internacional de Ciência Animal

de Laboratório (ICLAS). Para seguir as recomendações da *International Animal Care and Use Centre* (IACUC) de utilizar o menor número possível de animais por grupo e avaliar a ação sistêmica do óleo de AGE aplicado topicamente (Saniplan, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), utilizamos um modelo em que os animais do grupo controle receberam dois animais. tratamentos [10]: solução salina (SS) como controle e óleo mineral (OM) como tratamento. O grupo de tratamento também recebeu dois tratamentos: OM como controle e óleo de AGE como tratamento. O conteúdo químico deste óleo é o seguinte, de acordo com o fabricante: ácido cáprico, ácido caprílico, ácido caproico, ácido láurico, ácido linoleico, lecitina, palmitato de retinol, acetato de tocoferol e alfa-tocoferol [11].

Os animais foram alojados em gaiolas individuais de polipropileno com livre acesso a alimentos e água. A temperatura ambiente foi fixada em 22 ° C e a iluminação foi ajustada em um ciclo artificial claro-escuro de 12:12 horas. Os ratos foram anestesiados com uma combinação de quetamina a 50 mg.kg⁻¹, xilazina a 7,0 mg.kg⁻¹ e diazepam a 2,0 mg.kg⁻¹. Usando *punchs* de biópsia de 6,0 mm, produzimos oito feridas nas costas de cada animal: quatro no lado esquerdo e quatro no lado direito, paravertebrais. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 15 animais: grupo 1 - controle (SS / OM) em que as feridas só foram limpas com solução salina (SS) no lado esquerdo e tratadas com óleo mineral (OM) à direita e grupo 2 (OM / AGE) no qual as lesões foram tratadas com OM à esquerda e com AGE à direita (fig. 1). Após as feridas terem sido produzidas, os animais receberam o tratamento específico para cada lesão. As lesões foram cobertas com gaze e fita para evitar a mistura dos diferentes óleos aplicados ao mesmo animal. Todos os animais foram acompanhados após o procedimento até o final da anestesia, para avaliar como eles acordariam e receberiam comida e água. Para diminuir / controlar a dor, os animais tiveram acesso a água com paracetamol (200 mg.kg⁻¹) *ad libitum* nos dois primeiros dias e foram avaliados duas vezes ao dia para sinais de desconforto (baixa ingestão de água e alimentos, excesso de vocalização, peso, expressões faciais [12]). Todas as feridas foram limpas diariamente com SS, os tratamentos foram reaplicados, e os curativos foram substituídos até os animais serem eutanasiados.

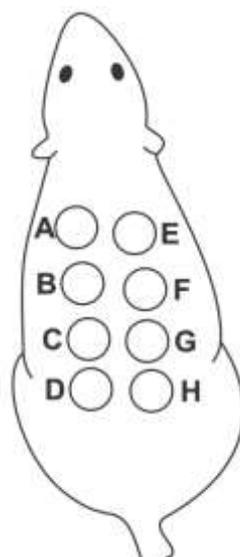


Figura 1: Esquema das feridas produzidas no dorso de cada animal.

As lesões do lado esquerdo (A-D) receberam o tratamento controle: SS no grupo 1 e OM no grupo 2. Lesões no lado direito (E-H) receberam o tratamento: OM no grupo 1 e AGE no grupo 2.

Coleta das amostras

Após a seleção aleatória para eutanásia por punção cardíaca nos dias 2, 4 e 10 (cinco animais por dia), os ratos foram anestesiados com tiopental a $85,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ e lidocaína a 10 mg.ml^{-1} (para confirmar a profundidade anestesia, os animais tiveram sua taxa de respiração e falta de resposta a estímulos) [13, 14] fotografias das lesões foram feitas a altura fixa e o sangue foi imediatamente coletado para análises sorológicas por Elisa. Fragmentos de pele da área da ferida foram extirpados à fáscia e bissectados: metade para análises histológicas (feridas mais próximas da cabeça do animal, duas para cada tipo de tratamento) e a outra metade para análises de PCR em tempo real (qPCR) (feridas mais próximas da cauda do animal).

Avaliação clínica

Durante os cuidados diários, a taxa de contração da ferida, diminuições no eritema e edema e re-epitelização foram avaliadas visualmente através da comparação das lesões entre si e com as fotos tiradas anteriormente.

Histologia

Cortes de pele corados com hematoxilina e eosina (HE) de todos os animais foram avaliados por dermatopatologista para análise qualitativa das células inflamatórias, como fibroblastos, células endoteliais e células linfomononucleares, em meio a feixes de colágeno (tecido de granulação maduro). Para a morfometria (realizada em dez campos aleatórios com aumento total de 400x usando uma ocular com grade de cicloides acoplada à lente), foram contados todos os núcleos limítrofes dos cicloides e os resultados foram registrados como o número médio de células na área cicatrizada, como descrito anteriormente [15].

Análise por geração de segundo harmônico (SHG)

Utilizamos imagens não-lineares para avaliar a densidade de colágeno na pele através da técnica de SHG. As imagens das áreas das feridas foram obtidas no Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC) usando um microscópio Zeiss Axio Observer.Z1 LSM780 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com 512 × 512 pixels de resolução espacial. Um laser MaiTai Ti: Sapphire (Spectra Physics, Santa Clara, CA, EUA) foi usado para excitar as amostras a 800 nm com uma lente objetiva de 10x. Para análises quantitativas de imagens, usamos a ferramenta de densidade óptica ImageJ (disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij>). O centro da ferida foi selecionado como a região de interesse específica (ROI), e a mesma caixa (com a mesma área) foi usada em imagens obtidas de animais eutanasiados no dia 10.

Extração de RNA

Amostras de pele cicatrizada foram obtidas com punções de 6 mm do mesmo tamanho e na mesma localização da lesão original para evitar a coleta de pele normal.

Amostras de pele foram homogeneizadas em 1 mL de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e o RNA total foi obtido de acordo com as instruções do fabricante. Utilizou-se um *kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para transcrever reversamente tres microgramas de RNAm total.

PCR em tempo real

Para realizar a PCR, foram utilizados 40 ng de cDNA, 0,5 µl de *primer* específico, 5,0 µl da *Taqman Universal Master Mix* (4369016, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e água livre de RNase em um volume final de 10 µl. As análises de expressão do gene *TaqMan* foram realizadas em um sistema de PCR em tempo real *Step One Plus™* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O gene de referência foi GAPDH de rato (4352338E, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os *primers* do gene alvo foram adquiridos da *Applied Biosystems* e incluíram os seguintes: adiponectina (Rn00595250_m1), leptina (Rn00565158_m1), IL-2 (Rn00587673_m1), IL-4 (Rn01456866m1), IL-6 (Rn01410330m1), IL-12 (Rn00575112m1).), IFN- α (Rn01400027_g1), IFN- γ (Rn00594078_m1), IGF-1 (Rn00710306_m1) e TNF- α (Rn00562055_m1). A média do grupo controle (OM) em cada dia de tratamento (dia 2, 4 ou 10) foi utilizada para calibrar todos os grupos. A eficiência da PCR foi calculada antes das experiências, e o método 2-DDCT foi usado para calcular a expressão gênica [16].

Elisa

As amostras de soro de todos os animais foram obtidas por centrifugação de sangue total (10 min, 4 ° C, 3.500 RPM). Foram utilizados *kits* de Elisa *Quantikine Quantitative Sandwich Enzyme Immunoassay* para IL-2, IL-4, IL-12, IL-6, IGF-1, IFN- α , IFN- γ e TNF- α (R & D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e para leptina e adiponectina (Millipore, St. Charles, MO, EUA). Todas as placas foram analisadas usando um leitor de microplacas BioRad 680 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) em comprimentos de onda de 450 e 570 nm, de acordo com as recomendações dos fabricantes.

Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism. Foram realizadas análises de variância (*Anova two-way*) e pós-teste de Bonferroni com nível de significância de 5% para determinar diferenças estatisticamente significantes.

Resultados

Avaliação clínica

Durante o tratamento diário (troca de curativos, limpeza e reaplicação dos tratamentos), os animais foram visualmente avaliados para avaliar o processo de cicatrização da ferida.

Ao longo do experimento, as feridas tratadas com OM e AGE cicatrizaram melhor que as tratadas com SS. Como esperado, o AGE proporcionou um melhor resultado clínico do que o OM. Na Fig. 2 abaixo mostramos imagens representativas da pele excisada dos animais com as feridas.

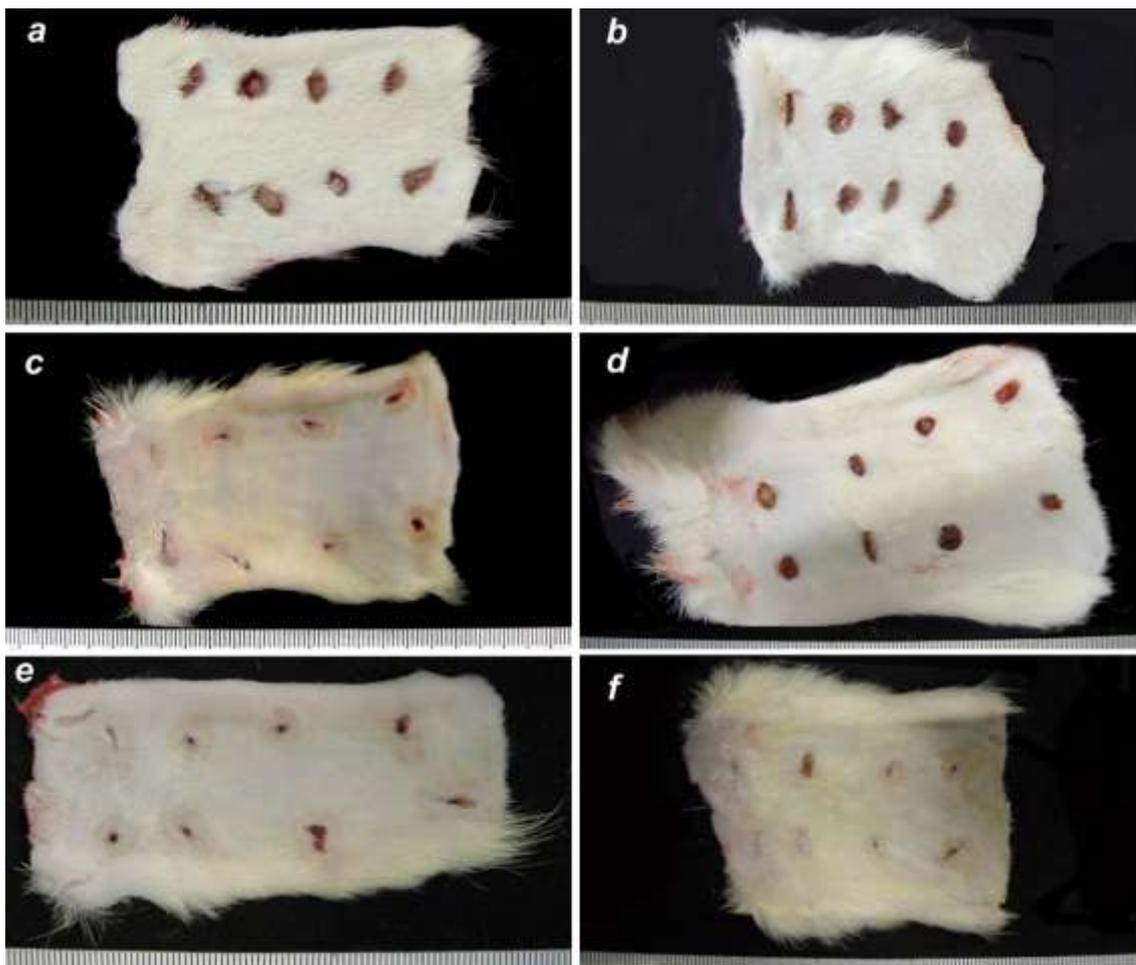


Fig. 2: Feridas por *punch*, pele das costas dos ratos. Comparação das feridas dos animais do grupo 1 e do grupo 2, respectivamente (a, b: dia 2; c, d: dia 4; e, f: dia 10). O tratamento que cada lesão recebeu está de acordo com a fig.1. Escala em milímetros.

Histologia

A Fig. 3 mostra menos densidade celular nas feridas tratadas com AGE em comparação com aquelas tratadas com OM no grupo controle. Esse resultado é consistente com a avaliação clínica descrita acima.

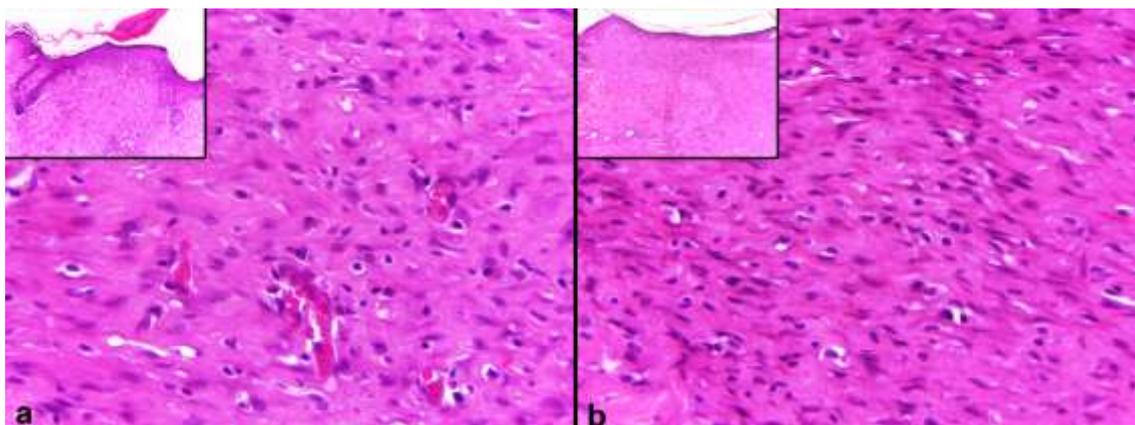


Fig. 3: Visão histológica comparativa das lesões tratadas com AGE (a) e lesões controle - OM (b) no dia 10. Completa re-epitelização e uma baixa quantidade de tecido de granulação celular são observadas com deposição evidente de colágeno (HE, aumento original x500 e x120 [detalhes]).

Embora o número de células estromais e inflamatórias tenha diminuído (correspondendo a uma densidade de colágeno relativamente maior) no leito da ferida no dia 10 no grupo 2 em comparação com o grupo controle (Fig. 4), os lados e grupos não diferem.

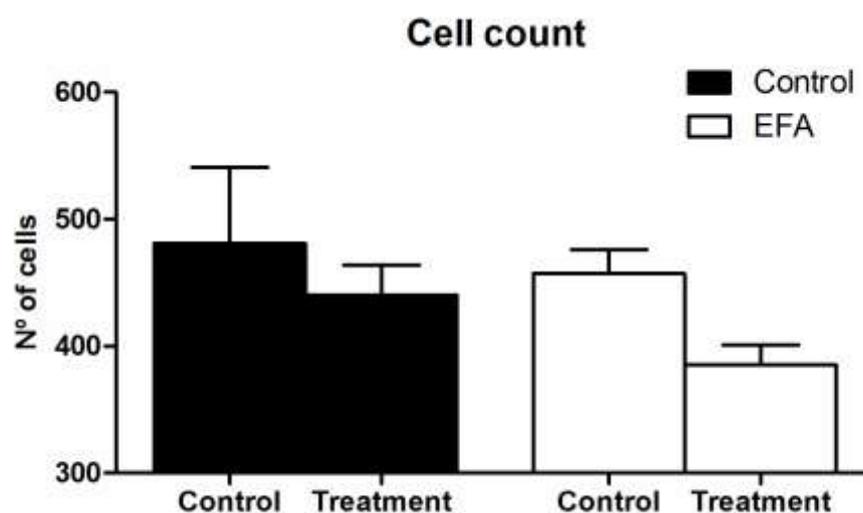


Fig. 4: Gráfico do número de células. Número médio de células nos grupos 1 (SS / OM) e 2 (OM / AGE) para as feridas de controle e tratamento no dia 10.

SHG

Ao comparar as feridas tratadas (OM ou AGE) com as do controle (SS ou OM) em ambos os grupos (Fig. 5), a análise de SHG da densidade do colágeno não revelou diferença significativa entre os grupos.

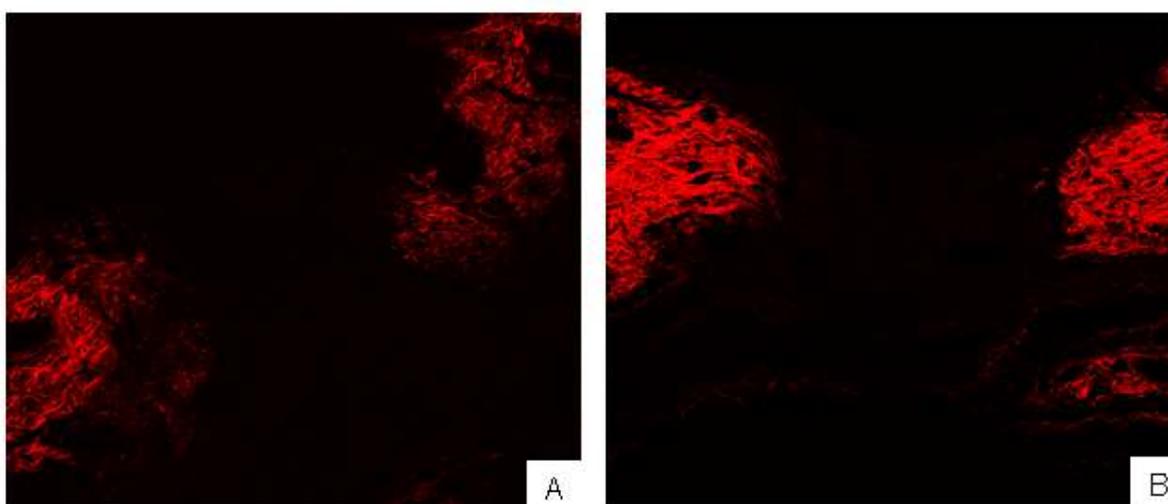


Fig. 5: Imagens representativas das fotomicrografias histológicas de HSG utilizadas para avaliar a densidade de colágeno. Lesões tratadas com SS (grupo controle) (A) e lesões tratadas com AGE (B).

PCR em tempo real

Nossos resultados de qPCR (Fig 6) mostraram que as lesões tratadas com AGE nos animais do grupo 2 apresentaram expressão elevada de RNAm de leptina ($2,88 \pm 0,65$ vs. $1,00 \pm 0,61$), IL-6 ($2,84 \pm 0,575$ vs. $1,00 \pm 0,206$ - (variação de 3 vezes) e IFN- γ ($3,53 \pm 1,31$ vs. $1,00 \pm 0,13$) nos estágios iniciais (dia 4) da cicatrização da ferida em comparação com as lesões tratadas pelo OM no grupo controle. A expressão de IGF-1 foi maior no dia 10 nos animais tratados com AGE ($2,15 \pm 0,325$ vs. $1,00 \pm 0,118$). Análises dos valores das outras citocinas não foram significativas.

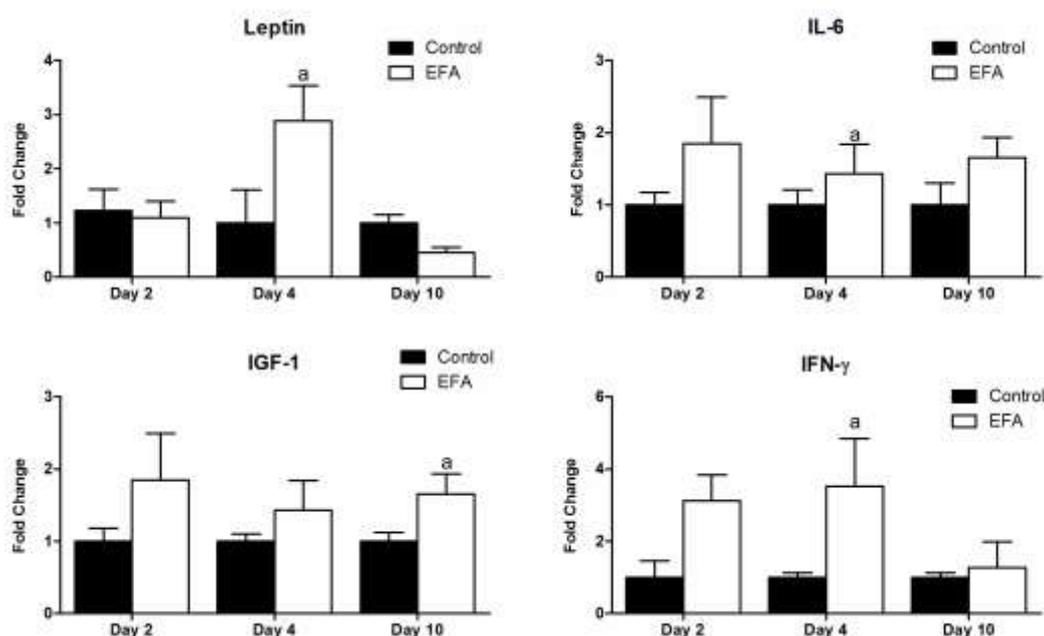


Fig 6: Gráfico dos resultados do qPCR. Apresentando as expressões relativas de RNAm de leptina ($p < 0,05$), IL-6 ($p < 0,01$), IFN- γ ($p < 0,05$) e IGF-1 ($p < 0,05$); "A" no topo das barras indica qual análise revelou uma diferença significativa em comparação com o controle. Todos os dados são expressos como a expressão relativa (número de vezes que foi diferente) aos controles.

Esses achados eram esperados porque o óleo de AGE contém lipídios essenciais necessários para as células [17] e uma melhora na cicatrização de feridas foi relatada quando este produto é usado. [18, 19]

Elisa

Ao analisar os níveis de citocinas sorológicas (Fig. 7), encontramos diferenças significativas entre os grupos apenas nos níveis de IL-6: os animais tratados com AGE apresentaram menor expressão de IL-6 no dia 10. Nenhuma outra análise de citocinas revelou valores significativos.

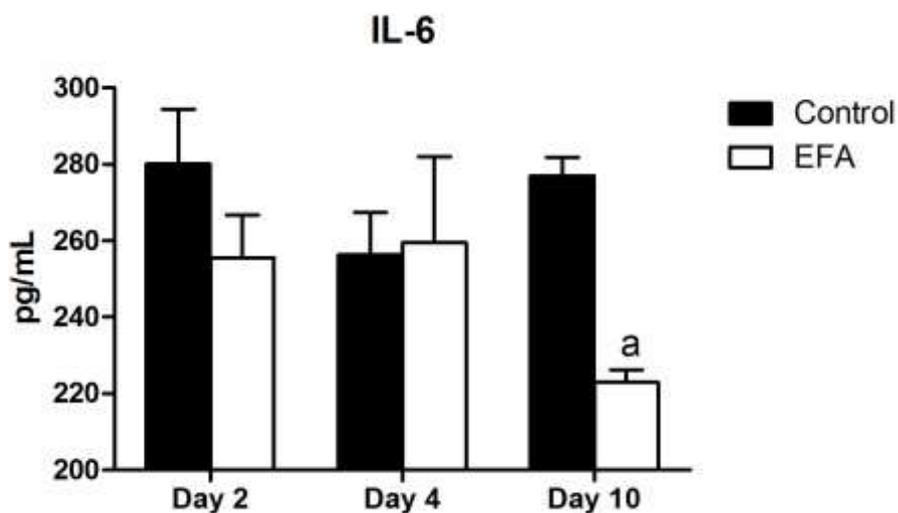


Fig 7: Gráfico dos resultados do Elisa. Mostrando concentrações sorológicas de IL-6 nos grupos controle e AGE no 10^o dia ($p < 0,05$); “A” no topo da barra indica a análise que mostrou uma diferença significativa em comparação com o controle.

Este é um novo e importante achado que demonstra os efeitos sistêmicos da aplicação tópica deste óleo, comparando o nível sérico de citocinas em camundongos tratados com OM / AGE com aqueles em camundongos tratados com SS / OM.

Discussão

O amplo uso de AGE no tratamento de feridas cutâneas e a escassez de informações científicas sobre sua eficácia e segurança nos levaram a estudar objetivamente seus efeitos tópicos e sistêmicos.

Embora os resultados do exame histomorfométrico tenham favorecido o óleo rico em AGE para acelerar o processo de cicatrização, as diferenças não foram

significativas. Uma coorte maior pode revelar resultados estatisticamente significativos.

Os níveis de citocina detectados nas amostras de tecido (medidos via PCR) eram esperados porque este óleo é relatado como indutor de resultados locais.

Encontramos resultados estatisticamente significativos em relação aos níveis locais de RNAm de leptina, IL-6, IGF-1 e IFN- γ . Um estudo realizado por Tadokoro e colegas revelou que a leptina aplicada no local da ferida acelerou a cicatrização de feridas, promovendo a proliferação de queratinócitos [20]. Esta adipocina desencadeia respostas principalmente no hipotálamo, mas também em outros tipos de células que possuem receptores de leptina, como células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos [21]. Além disso, este estudo também encontrou altos níveis de leptina local em amostras de lesões cutâneas com quelóide e hipertróficas em comparação com amostras de pele normais [21]. Nossos resultados são consistentes com os apresentados na pesquisa de Tadokoro. Um achado interessante de nossa pesquisa é a menor expressão desse RNAm nos estágios mais avançados da cicatrização, o que pode ter evitado respostas exageradas de cicatrização de feridas.

O IGF-1 pode ser produzido por fibroblastos e induzir respostas mitogênicas e motogênicas em queratinócitos [22]. Assim, nossos resultados indicaram que a pele ferida tratada com AGE teve maior expressão local de RNAm de IGF-1 ao longo do experimento, o que pode beneficiar o resultado da cicatrização da ferida. Verificou-se que a terapia gênica com o gene IGF-1 transferido para fibroblastos elevou a expressão do IGF-1 e melhorou o resultado da cicatrização da ferida [23].

As quantidades RNAm de IFN- γ foram maiores nos animais tratados com AGE em nosso experimento. Um estudo anterior descobriu que esta substância retardava o processo de cicatrização de feridas em queimaduras e que camundongos nocautes exibiam melhores respostas de angiogênese e miofibroblastos devido à diminuição da inflamação excessiva [24]. Nossos resultados mostraram a resposta oposta; o grupo tratado com AGE apresentou melhor cicatrização de feridas, mas quantidades mais altas de RNAm de IFN- γ . Isso pode ser explicado pelas outras citocinas envolvidas na cascata de cicatrização de feridas, que podem ter se

sobreposto aos efeitos do interferon. Além disso, a quantidade mais elevada pode ter sido relacionada à alta celularidade que nosso grupo encontrou no dia 10.

As citocinas produzidas pela pele podem ter acesso aos vasos capilares por difusão, embora a taxa de difusão dependa de fatores como nível de degradação, distância entre a produção e os vasos [3]; uma dessas citocinas produzidas na pele é a IL-6 [25,26]. As mudanças significativas nos níveis séricos de IL-6 forneceram evidências de que a aplicação tópica de óleo rico em AGE produziu um efeito sistêmico. Como é muito utilizado em feridas abertas, independentemente do seu tamanho e, em alguns casos, durante todo o tratamento, existe o risco de efeitos colaterais sistêmicos secundários. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que também coordena um ambiente anti-inflamatório para resolver a inflamação [27]. Altas quantidades de IL-6 estão diretamente relacionadas à artrite reumatoide, diabetes [28], depressão [29] e mieloma e também pode atuar no crescimento de células tumorais [30], levando ao interesse médico no controle da atividade da IL-6. Baixas quantidades de IL-6 foram encontradas em pacientes com nefropatia por IgA [31]. Além disso, a IL-6 está supostamente envolvida tanto em queimaduras na pele [32] quanto em cicatrização de feridas excisionais [33, 34]. Em ambos os casos, quantidades mais altas de IL-6 nos estágios iniciais de cicatrização foram associadas a melhores desfechos. Goodman e Stein [35] relataram que o envelhecimento dos fibroblastos acarretava em pouca produção de IL-6, o que, em pessoas idosas, poderia levar à má cicatrização de feridas e infecções [35]. Este mesmo cenário poderia ser induzido pelo extenso óleo de AGE quando usado topicamente para cicatrização de feridas, agravando o processo [11]. Outro estudo descobriu que animais alimentados com dieta enriquecida com óleo rico em AGE tinham concentrações sistêmicas de IL-6 mais baixas que o grupo controle [36]. Além disso, a ativação de respostas cerebrais e endócrinas por moléculas da pele que podem ser induzidas por estressores ambientais foi previamente proposta por Slominski e colaboradores [3].

Nosso modelo permitiu observar a produção de citocinas e fatores de crescimento entre os grupos, bem como a celularidade entre grupos e entre diferentes tratamentos no mesmo grupo.

O óleo rico em AGE foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) como curativo; no entanto, nenhuma literatura científica está disponível para consulta pública sobre sua segurança. Existem alguns artigos sobre o uso de AGE em feridas cutâneas em ratos [37-39], cordeiros [40] e pacientes humanos [41], mas nenhum deles avaliou alterações locais ou séricas nas citocinas envolvidas na cascata de cicatrização de feridas. Dois artigos de revisão afirmaram que não existem contraindicações para aplicar diretamente o óleo de AGE na superfície da ferida [18, 42], mas ambos os artigos careciam de informações sobre os efeitos sistêmicos. Mais estudos devem ser realizados em humanos para abordar os potenciais efeitos sistêmicos desse óleo.

Referências

1. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29. Epub 2010/02/09. doi: 10.1177/0022034509359125. PubMed PMID: 20139336; PubMed Central PMCID: PMC2903966.
2. Budovsky A, Yarmolinsky L, Ben-Shabat S. Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair Regen.* 2015;23(2):171-83. Epub 2015/02/24. doi: 10.1111/wrr.12274. PubMed PMID: 25703533.
3. Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev.* 2000;21(5):457-87. Epub 2000/10/21. doi: 10.1210/edrv.21.5.0410. PubMed PMID: 11041445.
4. Ghosh PK, Gaba A. Phyto-extracts in wound healing. *J Pharm Pharm Sci.* 2013;16(5):760-820. Epub 2014/01/08. PubMed PMID: 24393557.
5. Das U, Behera SS, Pramanik K. Ethno-Herbal-Medico in Wound Repair: An Incisive Review. *Phytother Res.* 2017;31(4):579-90. Epub 2017/02/16. doi: 10.1002/ptr.5786. PubMed PMID: 28198058.
6. Pieper B, Caliri MH. Nontraditional wound care: A review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2003;30(4):175-83. Epub 2003/07/10. doi: 10.1067/mjw.2003.131. PubMed PMID: 12851592.

7. Eichenfield LF, McCollum A, Msika P. The benefits of sunflower oleodistillate (SOD) in pediatric dermatology. *Pediatr Dermatol.* 2009;26(6):669-75. Epub 2010/03/05. doi: 10.1111/j.1525-1470.2009.01042.x. PubMed PMID: 20199440.
8. Otranto M, Do Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2010;18(6):629-36. Epub 2010/09/28. doi: 10.1111/j.1524-475X.2010.00617.x. PubMed PMID: 20868383.
9. Langerhuus SN, Jensen KH, Tonnesen EK, Theil PK, Halekoh U, Lauridsen C. The effect of dietary fatty acids on post-operative inflammatory response in a porcine model. *Apmis.* 2012;120(3):236-48. Epub 2012/02/22. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02834.x. PubMed PMID: 22339682.
10. Register FGOotF. 21 Chapter I Subchapter E Part 514 Subpart B, §514.117 2017 [updated 11/20/2017; cited 2017 11/22/2017]. Available from: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=b99dc5d9c2d8ab5cff68d6c1fcccd9f1&mc=true&node=se21.6.514_1117&rgn=div8.
11. Ferreira AM, Souza BMV, Rigotti MA, Loureiro MRD. The use of fatty acids in wound care: an integrative review of the Brazilian literature. *Rev esc enferm USP.* 2012;46(3):752-60. doi: 10.1590/S0080-62342012000300030.
12. Leung V, Zhang E, Pang DS. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. *Sci Rep.* 2016;6. doi: 10.1038/srep31667. PubMed PMID: 27530823.
13. Beeton C, Garcia A, Chandy KG. Drawing Blood from Rats through the Saphenous Vein and by Cardiac Puncture. *J Vis Exp.* 2007;(7). doi: 10.3791/266. PubMed PMID: 18989437.
14. NC3R. Rat: Cardiac puncture (terminal) 2018 [cited 2018 01/10/2018]. Available from: <https://www.nc3rs.org.uk/rat-cardiac-puncture-terminal>.
15. Gokhale AM, Evans RA, Mackes JL, Mouton PR. Design-based estimation of surface area in thick tissue sections of arbitrary orientation using virtual

cycloids. *J Microsc.* 2004;216(Pt 1):25-31. Epub 2004/09/17. doi: 10.1111/j.0022-2720.2004.01392.x. PubMed PMID: 15369480.

16. de Moura RF, Nascimento LF, Ignacio-Souza LM, Morari J, Razolli DS, Solon C, et al. Hypothalamic stearoyl-CoA desaturase-2 (SCD2) controls whole-body energy expenditure. *Int J Obes (Lond).* 2015. Epub 2015/09/24. doi: 10.1038/ijo.2015.188. PubMed PMID: 26392016.

17. Rodrigues HG, Vinolo MA, Sato FT, Magdalon J, Kuhl CM, Yamagata AS, et al. Oral Administration of Linoleic Acid Induces New Vessel Formation and Improves Skin Wound Healing in Diabetic Rats. *PLoS One.* 2016;11(10):e0165115. Epub 2016/10/21. doi: 10.1371/journal.pone.0165115. PubMed PMID: 27764229; PubMed Central PMCID: PMC5072690.

18. Manhezi AC, Bachion MM, Pereira AL. [The use of essential fatty acids in the treatments of wounds]. *Rev Bras Enferm.* 2008;61(5):620-8. Epub 2008/11/05. PubMed PMID: 18982227.

19. Écheli CSB, Busato CR. Tratamento tópico de úlcera de estase venosa - proposta para padronização. 12. 2009. doi: <http://177.101.17.124/index.php/biologica/article/view/424>.

20. Tadokoro S, Ide S, Tokuyama R, Umeki H, Tatehara S, Kataoka S, et al. Leptin promotes wound healing in the skin. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121242. Epub 2015/03/24. doi: 10.1371/journal.pone.0121242. PubMed PMID: 25799398; PubMed Central PMCID: PMC4370705.

21. Seleit I, Bakry OA, Samaka RM, Tawfik AS. Immunohistochemical Evaluation of Leptin Expression in Wound Healing: A Clue to Exuberant Scar Formation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(4):296-306. Epub 2015/08/11. doi: 10.1097/pai.000000000000187. PubMed PMID: 26258753.

22. Seeger MA, Paller AS. The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 4. United States 2015. p. 213-24.

23. Talebpour Amiri F, Fadaei Fathabadi F, Mahmoudi Rad M, Piryaee A, Ghasemi A, Khalilian A, et al. The Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 Gene

Therapy and Cell Transplantation on Rat Acute Wound Model. *Iran Red Crescent Med J.* 2014;16(10). doi: 10.5812/ircmj.16323. PubMed PMID: 25558384; PubMed Central PMCID: PMC4270678.

24. Shen H, Yao P, Lee E, Greenhalgh D, Soulika AM. Interferon-gamma inhibits healing post scald burn injury. *Wound Repair Regen.* 2012;20(4):580-91. Epub 2012/06/21. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00812.x. PubMed PMID: 22712462.

25. Urbanski A, Schwarz T, Neuner P, Krutmann J, Kirnbauer R, Kock A, et al. Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. *J Invest Dermatol.* 1990;94(6):808-11. Epub 1990/06/01. PubMed PMID: 2355183.

26. Slominski AT, Zmijewski MA, Zbytek B, Tobin DJ, Theoharides TC, Rivier J. Key role of CRF in the skin stress response system. *Endocr Rev.* 2013;34(6):827-84. Epub 2013/08/14. doi: 10.1210/er.2012-1092. PubMed PMID: 23939821; PubMed Central PMCID: PMCPMC3857130.

27. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 2015;16(5):448-57. Epub 2015/04/22. doi: 10.1038/ni.3153. PubMed PMID: 25898198.

28. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and Diabetes. *Diabetes.* 2005;54(Suppl 2):11. doi: 10.2337/diabetes.54.suppl_2.S114.

29. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry.* 2010;67(5):446-57. Epub 2009/12/18. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.09.033. PubMed PMID: 20015486.

30. Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, et al. Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res.* 1993;53(4):851-6. Epub 1993/02/15. PubMed PMID: 8428365.

31. Benitez JM, Barros RT, Cevallos CVG, Rizzo LV, Kokron C, Woronik V, et al. Comparação da secreção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) entre

pacientes com nefropatia da IgA e deficiência de IgA. *Rev Bras Alerg Immunopatol.* 2004;27(3):12.

32. Abo El-Noor MM, Elgazzar FM, Alshenawy HA. Role of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 expression in estimation of skin burn age and vitality. *J Forensic Leg Med.* 2017;52:148-53. Epub 2017/09/20. doi: 10.1016/j.jflm.2017.09.001. PubMed PMID: 28926822.

33. Yang WT, Ke CY, Wu WT, Harn HJ, Tseng YH, Lee RP. Effects of *Angelica dahurica* and *Rheum officinale* Extracts on Excisional Wound Healing in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017;2017:1583031. Epub 2017/09/14. doi: 10.1155/2017/1583031. PubMed PMID: 28900458; PubMed Central PMCID: PMC5576423.

34. Wahedi HM, Jeong M, Chae JK, Do SG, Yoon H, Kim SY. Aloesin from *Aloe vera* accelerates skin wound healing by modulating MAPK/Rho and Smad signaling pathways in vitro and in vivo. *Phytomedicine.* 2017;28:19-26. Epub 2017/05/10. doi: 10.1016/j.phymed.2017.02.005. PubMed PMID: 28478809.

35. Goodman L, Stein GH. Basal and induced amounts of interleukin-6 mRNA decline progressively with age in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 1994;269(30):19250-5. Epub 1994/07/29. PubMed PMID: 8034686.

36. Johansson S, Lönnqvist A, Östman S, Sandberg AS, Wold AE. Long-chain polyunsaturated fatty acids are consumed during allergic inflammation and affect T helper type 1 (Th1)- and Th2-mediated hypersensitivity differently. *Clin Exp Immunol.* 2010;160(3):9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04107.x. PubMed PMID: 20148912; PubMed Central PMCID: PMC2883112.

37. Magalhaes MS, Fechine FV, Macedo RN, Monteiro DL, Oliveira CC, Brito GA, et al. Effect of a combination of medium chain triglycerides, linoleic acid, soy lecithin and vitamins A and E on wound healing in rats. *Acta Cir Bras.* 2008;23(3):262-9. Epub 2008/06/17. PubMed PMID: 18552998.

38. Rocha RP, Rocha ELP, Hames RL, Sposeto TB. Estudo comparativo do processo de cicatrização com o uso de óleo de semente de girassol e triglicérides de cadeia-média: modelo experimental em ratos. *Sci Med.* 2004;14(1):6. doi: 445341.

39. Cavazana WC, Simoes Mde L, Yoshii SO, Amado CA, Cuman RK. Sugar (sucrose) and fatty acid compounds with triglycerides on the treatment of wounds: experimental study in rats. *An Bras Dermatol.* 2009;84(3):229-36. Epub 2009/08/12. PubMed PMID: 19668935.
40. Marques SR, Peixoto CA, Messias JB, et al. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. *Acta Cir Bras.* 2004;19(3):196-209. doi: 10.1590/S0102-86502004000300005.
41. Declair V. Tratamento de úlceras crônicas de difícil cicatrização com ácido linoleico. *J Bras Med.* 2002;82(6):6. doi: 316955.
42. Mandelbaum SH, Di Santis ÉP, Mandelbaum MHSA. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2003;78(5):521-2. doi: 10.1590/S0365-05962003000500002.

5. DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho teve como objetivo a avaliação de óleos de café e girassol, ricos em AGE, em feridas cutâneas e como o uso destes poderia induzir respostas locais e sistêmicas, a partir do uso tópico.

O uso de produtos naturais para diversos fins, inclusive dermatológicos, é muito comum como tratamento oriundo de conhecimento popular, assim como são fontes de moléculas para produtos industrializados com a mesma finalidade (131, 132).

Conforme revisado na introdução deste trabalho, um dos fatores necessários para que a cicatrização ocorra de forma satisfatória é a umidade do local, pois isto pode aumentar a velocidade da cicatrização (60, 61), em contraposição a um ambiente lesional seco (“tratamento seco”) (64). Uma das prováveis causas é que o ambiente úmido permite a distribuição dos nutrientes e moléculas necessárias para que todo o processo se dê sem maiores complicações. Isto foi clinicamente observado, conforme esperado, nas feridas dos animais do grupo controle tratadas com SS, em relação às feridas que receberam os diferentes óleos como tratamento, pois estas mantinham a lesão úmida, acarretando em melhor cicatrização.

Diversos óleos vegetais têm sido relatados para uso em feridas cutâneas. Entre as diferentes formas de apresentação, está a de nanopartículas carregadas com partículas de lipídeos, como de coco, oliva e eucalipto (133). Estudos também foram realizados utilizando óleo essencial de crisântemo no crescimento de queratinócitos *in vitro* e os pesquisadores encontraram que este produto estimulou o crescimento celular, podendo então auxiliar na regeneração da pele e na cicatrização de feridas (134).

Os trabalhos publicados por este grupo de pesquisa seguem esta linha de raciocínio e corroboram dados outrora publicados na literatura científica (73, 74, 80, 134-138).

Os animais tratados com OCT e OCV tiveram resultados melhores do que os animais do grupo controle, como descrito no primeiro artigo da seção “Resultados” da presente tese. Por outro lado, não foi possível perceber melhor resposta nos

animais tratados OG, em relação aos do grupo controle, no segundo artigo aqui apresentado, uma vez que os animais que receberam este tratamento não obtiveram diferenças estatísticas significativas na celularidade das lesões analisadas HE e na deposição do colágeno analisada por SHG, embora os resultados mostrassem tendência à diferença. Talvez, se o tamanho amostral fosse maior, a tendência encontrada neste estudo poderia ser confirmada. Tanto o tratamento com OCT, OCV e OG geraram diferenças significativas nos resultados das análises das substâncias envolvidas na cicatrização, tanto em nível tecidual quanto sistêmico. Outro fator que pode ter alterado os resultados foi a presença das crostas cicatriciais e qual seria o melhor momento para retirá-las das lesões, uma vez que ao removê-la pode-se retirar a área re-epitelizada e ainda aderente à crosta; por outro lado, não retirar a crosta pode impedir a re-epitelização e facilitar infecções locais (64, 139). Assim, esta era removida somente se os animais não apresentassem sinais de dor (140).

Os animais tratados com BOCV e BOCT não obtiveram bons resultados para a cicatrização das lesões, pois estes óleos continham muito material sólido que, em contato com o leito cicatricial, retardaram o processo de recuperação dos animais, formando concreções na lesão. Ao realizar a análise histológica destas lesões, conforme relatado no primeiro artigo da seção “Resultados”, foi possível verificar que ocorria a formação de granuloma de corpo estranho ao redor das partículas sólidas das borras. Esse dado opõe-se ao encontrado em um relato de caso do uso da borra do pó da bebida de café como tratamento para cicatrização de feridas de queimadura; os autores relatam que o uso deste material auxiliou na recuperação da paciente, pois absorvia o exsudato da lesão (141)

Em relação ao tratamento com óleo de café, os animais tratados com OCT apresentaram maior velocidade cicatricial, maior expressão de RNAm de IGF-1, IL-6 e IL-23 nas etapas iniciais da cicatrização e de IL-12 na fase mais tardia avaliada. O tratamento com OCV obteve maior expressão gênica de IL-6 e IL-23 nos estágios cicatriciais iniciais. A análise por SHG evidenciou maior densidade do colágeno nos animais tratados com OCV e OCT.

A respeito dos dados encontrados sobre possíveis efeitos sistêmicos, o tratamento com OCV induziu elevados níveis séricos de IFN- α ao longo de todo o

experimento e baixos níveis de IL-4 e IFN- γ no dia 4 e adiponectina no dia 10; também foi constatado menor concentração sérica de IFN- γ com uso de OCT.

Já a respeito dos dados encontrados com o uso de OG como tratamento, os animais apresentaram maiores níveis de RNAm de IGF-1, leptina, IL-6 e IFN- γ . A análise histológica objetiva mostrou uma tendência à menor celularidade nos animais tratados com OG; a análise por SHG não revelou diferenças na densidade do colágeno entre os diferentes tratamentos aplicados aos animais.

No tratamento com OG foram detectados baixos níveis séricos de IL-6 em relação aos animais do grupo controle.

As fibras colágenas produzem bom sinal para análise por SHG (142), sendo esta uma boa análise para a cicatrização. Conforme o processo cicatricial avança, os fibroblastos devem produzir e depositar colágeno na MEC. Nos animais tratados com OCT e OCV, as lesões que receberam OM obtiveram maior densidade de colágeno em comparação com os animais do grupo controle. Este resultado pode sugerir um possível efeito sistêmico induzido pelo uso tópico dos óleos de café.

Como dito acima, era esperado encontrar efeitos locais decorrentes do uso dos óleos naturais. Das substâncias analisadas neste trabalho, a discussão pode ser realizada conjuntamente, para evidenciar a ação da citocina no organismo.

Sobre a leptina, quando esta é aplicada no local da lesão, o processo cicatricial é acelerado, uma vez que promove a proliferação dos queratinócitos (42). Essa molécula é diretamente envolvida no eixo hipotalâmico, mas pode induzir respostas em qualquer célula que possua receptor para ela, como é o caso de fibroblastos e queratinócitos (143). Estes dados encontrados na literatura são condizentes com os encontrados neste estudo, que observou maiores níveis dessa substância no tecido da lesão tratado com OG.

A adiponectina é secretada pelos adipócitos e atua como reguladora do metabolismo de lipídeos e glicose (144) e possui efeito ainda não esclarecido sobre a cicatrização. Um estudo utilizando camundongos como modelo, realizado por Salathia e colaboradores, encontrou que a cicatrização foi acelerada quando a adiponectina foi injetada na borda da lesão (145); por outro lado, já foi relatado que esta adipocina suprimiu a proliferação e diferenciação dos queratinócitos, fator necessário para a

cicatrização (44). Os tratamentos com OCT e OCV induziram menores níveis séricos de adiponectina ao longo de todo o tratamento, comparando com o grupo controle, embora houvesse diferença estatística apenas no dia 4 quando tratado com OCV. Como esses tratamentos tiveram melhores respostas cicatriciais, pode-se dizer que este achado é condizente com o relatado por Kawai e colegas, embora sejam necessários mais estudos específicos para esta substância na cicatrização.

A concentração de RNAm de IGF-1 aumentou nos animais tratados com OCT e OG. Este fator de crescimento pode ser produzido por fibroblastos e induzir respostas nos queratinócitos, como a promoção da motilidade e divisão celular (40, 146, 147); é também importante na neovascularização da pele e para a formação do tecido de granulação no local da ferida (146). Dessa forma, o uso de alguma substância que aumente a expressão e produção deste fator de crescimento pode ser benéfico para a cicatrização, como encontrado nos estudos realizados por este grupo de estudo.

Quando tratados com OCV, os animais exibiram níveis séricos de IL-4 mais baixos que os animais do grupo controle. Esta citocina atua em fibroblastos, estimulando a produção de colágeno, além de ser relacionada com a resposta imune Th2 (148). Caso a produção desta substância seja muito estimulada pelo organismo, pode ocorrer síntese exagerada de MEC, levando a uma cicatriz fibrótica (149). Dessa forma, baixos níveis séricos desta substância poderiam contribuir para evitar a ocorrência de cicatrizes hipertróficas, o que não foi encontrado em nenhum animal deste estudo. Este resultado indica possível ação sistêmica gerada a partir da aplicação tópica do tratamento.

A IL-12 é uma citocina produzida principalmente por células de defesa e provavelmente está envolvida na imunidade celular, podendo induzir a síntese de IFN- γ e aumentar a taxa metabólica local, podendo ajudar as células locais a aumentarem a produção de substâncias pró-cicatriciais (150-152). O tratamento com OCT induziu aumento na expressão de IL-12 no dia 10, o que pode ter contribuído para o melhor desempenho deste tratamento.

A citocina IL-23 é de interesse dermatológico, uma vez que está envolvida na psoríase e ligada à resposta Th17 e à citocina IL-12. Uma das possíveis ações desta substância é a hiperproliferação dos queratinócitos, manifestação típica da

psoríase (153); pode haver também uma interdependência entre essas substâncias na sua ação de proliferação das células da pele (154). Os animais tratados com OCT e OCV tiveram os níveis locais de IL-23 aumentados na etapa inicial da cicatrização, evidenciando correlação com a literatura, uma vez que este tratamento obteve os melhores resultados neste estudo.

Foram encontrados menores níveis séricos de IFN- γ nos animais tratados com OCV e OCT. Um estudo prévio demonstrou que o IFN- γ retardou o processo de cicatrização de queimadura cutânea e que camundongos nocaute para este gene tiveram melhor angiogênese e respostas de miofibroblastos devido à supressão de resposta inflamatória excessiva (155). Esta molécula limita o dano tecidual associado à inflamação (156). Em outro estudo, os pesquisadores entenderam que a ação desta citocina pode mudar em diferentes estágios da cicatrização: na fase inicial pode ativar a fagocitose nos macrófagos e a produção de VEGF enquanto nos estágios finais pode inibir a atuação do TGF- β (157).

Foi encontrado, neste trabalho, que o tratamento com OCV aumentou os níveis séricos de IFN- α ao longo de todo o estudo, indicando possível ação sistêmica deste óleo após aplicação tópica. As células dendríticas são grande fonte deste interferon (156) e foram identificados como o principal produtor na pele lesionada de humanos e camundongos, podendo aumentar a re-epitelização (158), corroborando o dado encontrado na pesquisa realizada por este grupo.

A citocina IL-6 tem um importante papel no início da resposta inflamatória e atua como quimiotático para leucócitos. Butzelaar e colegas evidenciaram que baixos níveis desta substância nos estágios iniciais da cicatrização podem levar à formação de cicatriz hipertrófica (159). Outro estudo afirmou que a deficiência desta molécula pode levar à ativação exacerbada dos macrófagos, acarretando em ferida crônica (160). Com relação a este fator, os animais tratados com OCV, OCT e OG tiveram a expressão gênica do RNAm aumentada e a concentração sérica diminuído nos animais tratados com OG.

Considerando os efeitos sistêmicos avaliados neste trabalho, os relativos ao uso do OG são de maior importância imediata para os profissionais da saúde, uma vez que este tratamento já está amplamente disponível no mercado nacional e é

usado como tratamento por muitas pessoas. O perigo disso são efeitos colaterais não previstos.

Foi encontrada diferença significativa dos níveis séricos de IL-6 nos animais tratados com OG. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que está envolvida na coordenação da resolução da inflamação (161). Entre as doenças em que esta citocina está envolvida diretamente, pode-se citar a diabetes, artrite reumatoide (162), depressão (163) e mieloma (164); assim, a IL-6 é de grande interesse médico pois está envolvida em diferentes doenças, podendo ainda atuar no controle do crescimento tumoral. Baixos níveis desta substância já foram relatados em pacientes com nefropatia relacionada ao IgA (165). A IL-6 está envolvida na melhora de queimaduras de pele (166, 167) e cicatrização de feridas agudas na pele (81), em que altos níveis nos estágios iniciais da cicatrização foram associados com melhores resultados. Goodman e Stein (168) reportaram que fibroblastos de pessoas com idade avançada produzem menor quantidade de IL-6, o que poderia ser uma explicação para a piora da cicatrização em pacientes idosos.

Um cenário parecido poderia ser induzido por uso extenso e prolongado do OG quando aplicado topicamente em feridas, o que poderia acarretar em piora do quadro (93). Outro estudo realizado em animais, analisando a ingestão de diversos óleos naturais ricos em AGE, foi constatado que o consumo destes diminui os níveis sistêmicos de IL-6, em relação ao grupo controle (89).

Como relatado na seção “Métodos” desta tese, os animais possuem área de superfície corporal média de 0,0356 m² enquanto a dos humanos varia entre 1,6 e 1,9 m² (122). Esta diferença na área relativa deve ser considerada ao extrapolar os dados aqui encontrados, uma vez que a diferença da área total é em torno de 45 vezes entre essas espécies. Como o volume aplicado em cada ferimento foi de 0,1 mL, cada ferida, em humanos, deveria ser tratada com 4,5 mL dos diferentes óleos, totalizando 18 mL. Como vários hospitais tratam pacientes acometidos por grandes feridas, muitas delas crônicas, este volume pode ser facilmente aplicado.

Os produtos naturais são tidos como seguros para uso na percepção popular devido ao fato de serem naturais (popularmente chamados de produtos orgânicos), mas, na verdade, isto é um grande equívoco. Não é o caso de nenhum dos produtos avaliados neste trabalho, mas muitos produtos comercializados são

produzidos sem seguir as “Boas Práticas de Fabricação”, que garantiriam a qualidade do produto final (169). Embora não haja um consenso mundial, padrões de controle de qualidade estão sendo estabelecidos para a fabricação de produtos naturais, que é uma tarefa viável, porém difícil de ser alcançada (170).

Em artigo de dois profissionais da Anvisa, está descrito que “plantas medicinais podem desencadear reações adversas pelos seus próprios constituintes, devido a interações com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda relacionados a características do paciente (idade, sexo, condições fisiológicas, características genéticas, entre outros). Erros de diagnóstico, identificação incorreta de espécies de plantas e uso diferente da forma tradicional podem ser perigosos, levando a superdose, inefetividade terapêutica e reações adversas” (171). Neste trabalho, os autores revisaram as notificações de reações adversas ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos recebidas pela Anvisa e foi constatado que um terço das reações estavam relacionadas a produtos sem registro na Anvisa. Um fato que dificulta o maior número dessas notificações é que o Notivisa, sistema utilizado pela Agência, é feito para que profissionais da área da saúde preencham um relatório técnico; caso um paciente queira relatar um efeito adverso, é necessário realizar um extenso cadastro, que pode levar à desistência da notificação, acarretando em baixos números de relatos. Como o uso desses remédios é amplamente utilizado em todo o país, principalmente em locais afastados de grandes centros urbanos, seria importante ter um sistema de notificação mais simples, o que poderia melhorar as ações da Anvisa em relação a estes produtos (171).

A farmacovigilância é utilizada para monitorar e detectar reações adversas às drogas que ainda não tenham sido reconhecidas (172). Em relatório publicado em 2011 pelo Centro de Monitoramento de Uppsala, da Organização Mundial da Saúde, foram relatadas cerca de 21.000 reações adversas à ervas ou produtos naturais.

Para evitar que este número continue crescendo, é necessário que sejam realizados estudos de segurança dos produtos naturais usados pela população; além de garantir que o produto não ofereça riscos à população, certamente o custo da pesquisa é menor do que o gasto com o tratamento dos pacientes afetados.

O método usado nos trabalhos realizados por este grupo de pesquisa permitiu avaliar o efeito local dos óleos de café e girassol, avaliando, em um mesmo

animal, como em outros estudos (173, 174), úlceras tratadas com OM e outras com óleos vegetais. Realizando-se as pesquisas dessa forma, foi possível atender à requisição da Universidade (e, cada vez mais, da sociedade em geral) de diminuir a quantidade de animais utilizados em pesquisa. Porém, algumas pesquisas ainda necessitam de modelos animais para possibilitar a análises dos resultados em nível sistêmico (175), como foi o caso dessa. Por outro lado, o método escolhido, pode ao mesmo tempo ter minimizado as diferenças entre os dois lados uma vez que é possível ter havido melhora no lado tratado com OM pela ação sistêmica do óleo vegetal. Este efeito sistêmico pode ser explicado pela relação de área de superfície pelo peso total do animal, o que facilitaria a possível ação sistêmica assim como pelo fato de, nos primeiros dias, o tratamento aplicado ter tido contato direto com a corrente sanguínea do animal (176).

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstram que o uso do OCT em feridas cutâneas de ratos, produzidas cirurgicamente com aço esterilizado em um ambiente controlado, é benéfico. Ambos os óleos de café (OCT e OCV) induziram efeitos sistêmicos como pôde ser observado nos resultados das análises séricas e por SHG.

Outros estudos devem ser realizados para identificar as biomoléculas responsáveis pelos resultados encontrados para a realização de testes em culturas de células humanas e, possivelmente, testes clínicos.

O uso do OG não apresentou melhora estatisticamente significativa da resposta cicatricial dos ratos, como seria esperado. O estudo demonstrou, porém, que o uso tópico deste tratamento tão difundido no Brasil induz efeitos sistêmicos que podem levar a efeitos colaterais não previstos e indesejáveis para os pacientes e profissionais envolvidos.

Foi possível documentar que os óleos de café e o óleo de girassol tiveram efeito sistêmico cujas consequências para o organismo precisam ser oportunamente avaliadas, aumentando a segurança do uso destes produtos no ambiente doméstico ou hospitalar.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Sampaio SAP, Rivitti EA. Anatomia e fisiologia. In: Sampaio SAP, Rivitti EA, editors. *Dermatologia*. 3ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 2011. p. 1-38.
2. Burns DA, Cox NH. Introduction and historical bibliography. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology*. 1. 7th ed: Blackwell Publishing; 2004. p. 1.-7.
3. Streilein JW. Skin-associated lymphoid tissue. *Immunol Ser*. 1989;46:73-96.
4. Ishida-Yamamoto A, Igawa S, Kishibe M. Molecular basis of the skin barrier structures revealed by electron microscopy. *Exp Dermatol*. 2018;Apr 28. Epub ahead of print.
5. Visscher M, Narendran V. The Ontogeny of Skin. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(4):291-303.
6. Arda O, Goksugur N, Tuzun Y. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clin Dermatol*. 2014;32(1):3-13.
7. Kamibeppu L, Valente NYSV, Sotto MN. A pele: Estruturas, fisiologia e embriologia. In: Júnior WB, Chiacchio Nd, Criado PR, editors. *Tratado de Dermatologia*. 1. 2ª ed. São Paulo, SP, Brasil: Editora Atheneu; 2014. p. 3-25.
8. Tadokoro R, Takahashi Y. Intercellular transfer of organelles during body pigmentation. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;45:132-8.
9. Deckers J, Hammad H, Hoste E. Langerhans Cells: Sensing the Environment in Health and Disease. *Front Immunol*. 2018;9:93.
10. Walsh CM, Bautista DM, Lumpkin EA. Mammalian touch catches up. *Curr Opin Neurobiol*. 2015;34:133-9.
11. Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 5):667-75.
12. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Site-matched papillary and reticular human dermal fibroblasts differ in their release of specific growth factors/cytokines and in their interaction with keratinocytes. *J Cell Physiol*. 2004;200(1):134-45.
13. Sorrell JM, Baber MA, Caplan AI. Construction of a bilayered dermal equivalent containing human papillary and reticular dermal fibroblasts: use of fluorescent vital dyes. *Tissue Eng*. 1996;2(1):39-49.

14. Cerio R, Griffiths CE, Cooper KD, Nickoloff BJ, Headington JT. Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. *Br J Dermatol.* 1989;121(4):421-31.
15. Nickoloff BJ. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol.* 1991;127(4):523-9.
16. Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. *Endocr Rev.* 2000;21(5):457-87.
17. Rousselle P, Montmasson M, Garnier C. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix Biol.* 2018.
18. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12(4):390-9.
19. McGrath JA, Breathnach SM. Wound Healing. In: Tony Burns SB, Neil Cox, Christopher Griffiths, editor. *Rook's Textbook of Dermatology.* 1. 7th. ed: Blackwell; 2004. p. 1-25.
20. Gottrup F, Henneberg E, Trangbaek R, Baekmark N, Zollner K, Sorensen J. Point prevalence of wounds and cost impact in the acute and community setting in Denmark. *J Wound Care.* 2013;22(8):413-22.
21. Guest JF, Ayoub N, McIlwraith T, Uchegbu I, Gerrish A, Weidlich D, et al. Health economic burden that wounds impose on the National Health Service in the UK. *BMJ Open.* 2015;5(5:e009283).
22. Dowsett C, Bielby A, Searle R. Reconciling increasing wound care demands with available resources. *J Wound Care.* 2014;23(11):552-8.
23. Dowsett C. Breaking the cycle of hard-to-heal wounds: balancing cost and care. *Wounds Int.* 2015;6(2):5.
24. Borges EL, Pires Júnior JF, Abreu MNS, Lima VL, Silva PAB, Soares SM. Factors associated with the healing of complex surgical wounds in the breast and abdomen: retrospective cohort study. *Rev Latino-Am Enfermagem.* 2016;24(e2811):10.
25. Bezerra SMG, Viana MCBR, Oliveira AC, Santos RR, Nogueira LT. Avaliação do custo e da efetividade no tratamento de feridas em um serviço público

especializado. In: SOBEST, editor. XI Congresso Brasileiro de Estomaterapia 2015; Gramado - Brasil.

26. Ereno C, Guimaraes SA, Pasetto S, Herculano RD, Silva CP, Graeff CF, et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95(3):932-9.
27. Mandelbaum SH, Di Santis ÉP, Mandelbaum MHSA. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An Bras Dermatol*. 2003;78(4):393-408.
28. Ortonne JP, Clevy JP. [Physiology of cutaneous cicatrization]. *Rev Prat*. 1994;44(13):1733-7.
29. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med res*. 2009;37(5):1528-42.
30. Hart J. Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care*. 2002;11(6):205-9.
31. Broughton G, 2nd, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7 Suppl):1-32e-S.
32. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-28.
33. O'Kane S, Ferguson MW. Transforming growth factor beta's and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(1):63-78.
34. Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. 2000;85(1):21.
35. Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol*. 2003;73(6):713-21.
36. Makhlef HA, Stepniakowska J, Hoffman S, Smith E, LeRoy EC, Trojanowska M. IL-4 upregulates tenascin synthesis in scleroderma and healthy skin fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1996;107(6):856-9.
37. Wolk K, Sabat R. Adipokines in psoriasis: An important link between skin inflammation and metabolic alterations. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016;17(3):305-17.
38. Shibata S, Tada Y, Hau CS, Mitsui A, Kamata M, Asano Y, et al. Adiponectin regulates psoriasiform skin inflammation by suppressing IL-17 production from gammadelta-T cells. *Nat Commun*. 2015;6:7687.

39. Stoll SW, Kansra S, Elder JT. Keratinocyte outgrowth from human skin explant cultures is dependent upon p38 signaling. *Wound Repair Regen.* 2003;11(5):346-53.
40. Seeger MA, Paller AS. The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 4. United States 2015. p. 213-24.
41. Nascimento AP, Costa AM. Overweight induced by high-fat diet delays rat cutaneous wound healing. *Br J Nutr.* 2006;96(6):1069-77.
42. Tadokoro S, Ide S, Tokuyama R, Umeki H, Tatehara S, Kataoka S, et al. Leptin promotes wound healing in the skin. *PLoS One.* 2015;10(3):e0121242.
43. Shibata S, Tada Y, Asano Y, Hau CS, Kato T, Saeki H, et al. Adiponectin regulates cutaneous wound healing by promoting keratinocyte proliferation and migration via the ERK signaling pathway. *J Immunol.* 2012;189(6):3231-41.
44. Kawai K, Kageyama A, Tsumano T, Nishimoto S, Fukuda K, Yokoyama S, et al. Effects of adiponectin on growth and differentiation of human keratinocytes--implication of impaired wound healing in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;374(2):269-73.
45. Zhu J, Clark RAF. Fibronectin at select sites binds multiple growth factors and enhances their activity: expansion of the collaborative ECM-GF paradigm. *J Invest Dermatol.* 2014;134(4):895-901.
46. Clark RA, An JQ, Greiling D, Khan A, Schwarzbauer JE. Fibroblast migration on fibronectin requires three distinct functional domains. *J Invest Dermatol.* 2003;121(4):695-705.
47. Ihlberg L, Haukipuro K, Risteli L, Oikarinen A, Kairaluoma MI, Risteli J. Collagen synthesis in intact skin is suppressed during wound healing. *Ann Surg.* 1993;217(4):397-403.
48. Li W, Fan J, Chen M, Guan S, Sawcer D, Bokoch GM, et al. Mechanism of human dermal fibroblast migration driven by type I collagen and platelet-derived growth factor-BB. *Mol Biol Cell.* 2004;15(1):294-309.
49. Viera MH, Vivas AC, Berman B. Update on keloid management: clinical and basic science advances. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012;1(5):200-6.
50. Schulz JN, Plomann M, Sengle G, Gullberg D, Krieg T, Eckes B. New developments on skin fibrosis - Essential signals emanating from the extracellular matrix for the control of myofibroblasts. *Matrix Biol.* 2018;Epub (ahead of print).

51. Desmouliere A, Badid C, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(1):19-30.
52. Doillon CJ, Dunn MG, Bender E, Silver FH. Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness. *Coll Relat Res.* 1985;5(6):481-92.
53. Mandelbaum SH, Di Santis ÉP, Mandelbaum MHSA. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte II. *An Bras de Dermatol.* 2003;78(5):521-2.
54. Harn HI, Ogawa R, Hsu CK, Hughes MW, Tang MJ, Chuong CM. The tension biology of wound healing. *Exp Dermatol.* 2017.
55. Ogawa R, Akaishi S, Huang C, Dohi T, Aoki M, Omori Y, et al. Clinical applications of basic research that shows reducing skin tension could prevent and treat abnormal scarring: the importance of fascial/subcutaneous tensile reduction sutures and flap surgery for keloid and hypertrophic scar reconstruction. *J Nippon Med Sch.* 2011;78(2):68-76.
56. Hsu CK, Lin HH, Harn HI, Ogawa R, Wang YK, Ho YT, et al. Caveolin-1 controls hyperresponsiveness to mechanical stimuli and fibrogenesis-associated RUNX2 activation in keloid fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 2018;138(1):208-18.
57. Ramasastry SS. Acute wounds. *Clin Plast Surg.* 2005;32(2):195-208.
58. Menaker G, Wilcher GD. Dressings. In: Bologna JL, Jorizzo JL, Rapini RP, editors. *Dermatology.* 2. 1st ed. Spain: Elsevier; 2003. p. 14.
59. van Middendorp JJ, Sanchez GM, Burridge AL. The Edwin Smith papyrus: a clinical reappraisal of the oldest known document on spinal injuries. *Eur Spine J.* 2010;19(11):1815-23.
60. Cho CY, Lo JS. Dressing the part. *Dermatol Clin.* 1998;16(1):25-47.
61. Bloom H. Cellophane' dressing for second-degree burns. *The Lancet.* 1945;246(6375):559.
62. Gilje O. On taping (adhesive tape treatment) of leg ulcers. *Acta Derm Venereol.* 1948;28(5):454-67.
63. Schilling RS, Roberts M, Goodman N. Clinical trial of occlusive plastic dressings. *Lancet.* 1950;1(6599):293-6.
64. Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature.* 1962;193:293-4.

65. MacEwan MR, MacEwan S, Kovacs TR, Batts J. What makes the optimal wound healing material? A review of current science and introduction of a synthetic nanofabricated wound care scaffold. *Cureus*. 2017;9(10):e1736.
66. Sood A, Granick MS, Tomaselli NL. Wound dressings and comparative effectiveness data. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(8):511-29.
67. Ayello EA, Salcido RS, Sibbald RG. Interprofessional Education: Celebrating the Past and Embracing the Future. *Adv Skin Wound Care*. 2017;30(2):54.
68. Benbow M. Best practice in wound assessment. *Nurs Stand*. 2016;30(27):40-7.
69. Atiyeh BS, El-Musa KA, Dham R. Scar quality and physiologic barrier function restoration after moist and moist-exposed dressings of partial-thickness wounds. *Dermatol Surg*. 2003;29(1):14-20.
70. Knighton DR, Fiegel VD. Macrophage-derived growth factors in wound healing: regulation of growth factor production by the oxygen microenvironment. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(4):1108-11.
71. Budovsky A, Yarmolinsky L, Ben-Shabat S. Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair Regen*. 2015;23(2):171-83.
72. Bedi MK, Shenefelt PD. Herbal therapy in dermatology. *Arch Dermatol*. 2002;138(2):232-42.
73. Davis SC, Perez R. Cosmeceuticals and natural products: wound healing. *Clin Dermatol*. 2009;27(5):502-6.
74. Pieper B, Caliri MH. Nontraditional wound care: A review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2003;30(4):175-83.
75. Ribeiro VP, Arruda C, Abd El-Salam M, Bastos JK. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. *Pharm Biol*. 2018;56(1):253-68.
76. da Silva TC, da Silva JM, Ramos MA. What factors guide the selection of medicinal plants in a local pharmacopoeia? A case study in a rural community from a historically transformed Atlantic Forest landscape. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018;v.2018:10.
77. Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2016;112:4-29.

78. da Silva BAF, da Costa RHS, Fernandes CN, Leite LHI, Ribeiro-Filho J, Garcia TR, et al. HPLC profile and antiedematogenic activity of *Ximenia americana* L. (Olacaceae) in mice models of skin inflammation. *Food Chem Toxicol*. 2018.
79. Meimeti E, Kafanas A, Pavlou P, Evangelatou A, Tsouparelou P, Kanellopoulos S, et al. Topical Treatment of Skin Injury Inflicted in Mice by X-Ray Irradiation. *Skin Pharmacol Physiol*. 2018;31(4):175-83.
80. Hemmati AA, Foroozan M, Houshmand G, Moosavi ZB, Bahadoram M, Maram NS. The topical effect of grape seed extract 2% cream on surgery wound healing. *Glob J Health Sci*. 2015;7(3):40015.
81. Wahedi HM, Jeong M, Chae JK, Do SG, Yoon H, Kim SY. Aloesin from *Aloe vera* accelerates skin wound healing by modulating MAPK/Rho and Smad signaling pathways in vitro and in vivo. *Phytomedicine*. 2017;28:19-26.
82. Prakoso YA, Kurniasih. The effects of *Aloe vera* cream on the expression of CD4(+) and CD8(+) lymphocytes in skin wound healing. *J Trop Med*. 2018;eCollection:6218303.
83. Winter GF. Medical-Grade Honey Dressing Use in Developing Countries. *Adv Skin Wound Care*. 2017;30(11):1-3.
84. Machado G, Marques T, de Carvalho T, Duarte A, de Oliveira F, Goncalves M, et al. Antibacterial activity and *in vivo* wound healing potential of phenolic extracts from jaboticaba skin. *Chem Biol Drug Des*. 2018;Epub ahead of print.
85. Ricardo LM, Dias BM, Mugge FLB, Leite VV, Brandao MGL. Evidence of traditionality of Brazilian medicinal plants: The case studies of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimao) barks and *Copaifera spp.* (copaiba) oleoresin in wound healing. *J Ethnopharmacol*. 2018;219:319-36.
86. Ghatak SB, Panchal SJ. Investigation of the immunomodulatory potential of oryzanol isolated from crude rice bran oil in experimental animal models. *Phytother Res*. 2012;26(11):1701-8.
87. Manosroi A, Chutoprapat R, Abe M, Manosroi W, Manosroi J. Anti-aging efficacy of topical formulations containing niosomes entrapped with rice bran bioactive compounds. *Pharm Biol*. 2012;50(2):208-24.
88. Eichenfield LF, McCollum A, Msika P. The benefits of sunflower oleodistillate (SOD) in pediatric dermatology. *Pediatr Dermatol*. 2009;26(6):669-75.

89. Otranto M, Do Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen.* 2010;18(6):629-36.
90. Affonso RC, Voytena AP, Fanan S, Pitz H, Coelho DS, Horstmann AL, et al. Phytochemical composition, antioxidant activity, and the effect of the aqueous extract of coffee (*Coffea arabica L.*) bean residual press cake on the skin wound healing. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1923754.
91. Wagemaker TAL, Rijo P, Rodrigues LM, Maia-Campos PMBG, Fernandes AS, Rosado C. Integrated approach in the assessment of skin compatibility of cosmetic formulations with green coffee oil. *International Journal of Cosmetic Science.* 2016;37(5):506-10.
92. Ojeh N, Stojadinovic O, Pastar I, Sawaya A, Yin N, Tomic-Canic M. The effects of caffeine on wound healing. *Int Wound J.* 2016;13(5):605-13.
93. Ferreira A, Souza B, Rigotti M, Loureiro M. The use of fatty acids in wound care: an integrative review of the Brazilian literature. *Rev esc enferm USP.* 2012;46(3):752-60.
94. Nardi A, Rodaski S, Sousa R, Baudi D, Castro J. Secondary cicatrization in dermoepidermal wounds treated with essential fatty acids, vitamins A and E, soy lecithin and polynylpyrrolidone-iodine in dogs. *Arch Vet Sci.* 2005;9(1):16.
95. Greenway DL, Dyke KG. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *J Gen Microbiol.* 1979;115(1):233-45.
96. Moch D, Schewe T, Kuhn H, Schmidt D, Buntrock P. The linoleic acid metabolite 9DS-hydroxy-10,12(E,Z)-octadecadienoic acid is a strong proinflammatory mediator in an experimental wound healing model of the rat. *Biomed Biochim Acta.* 1990;49(4):201-7.
97. Couto CLM, Alfonso-Goldfarb AM. A cup o' controversy: coffee and health in 19th century Rio de Janeiro. *Circumscribere: International Journal for the History of Science.* 2016;17:13.
98. Bowe WP, Pugliese S. Cosmetic benefits of natural ingredients. *J Drugs Dermatol.* 2014;13(9):1021-5.
99. Velazquez Pereda C, Dieamant C, Eberlin S, Nogueira C, Colombi D, di Stasi LC, et al. Effect of green *Coffea arabica L.* seed oil on extracellular matrix components

and water-channel expression in in vitro and ex vivo human skin models. *J Cosmet Dermatol*. 2009;8(1):56-62.

100. Ribeiro H, Marto J, Raposo S, Agapito M, Isaac V, Chiari B, et al. From coffee industry waste materials to skin-friendly products with improved skin fat levels. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2017;115(3):330-6.

101. Patzelt A, Lademann J, Richter H, Darvin ME, Schanzer S, Thiede G, et al. In vivo investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier. *Skin Res Technol*. 2012;18(3):364-9.

102. Farris P. Idebeneone, green tea, and Coffeeberry extract: new and innovative antioxidants. *Dermatol Ther*. 2007;20(5):322-9.

103. Choi HS, Park ED, Park Y, Suh HJ. Spent coffee ground extract suppresses ultraviolet B-induced photoaging in hairless mice. *J Photochem Photobiol B*. 2015;153:164-72.

104. Micek A, Godos J, Lafranconi A, Marranzano M, Pajak A. Caffeinated and decaffeinated coffee consumption and melanoma risk: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Food Sci Nutr*. 2018;69(4):417-26.

105. Costa JS, Costa KSL, Cruz JV, Ramos RS, Silva LB, Brasil DSB, et al. Virtual Screening and Statistical Analysis in the Design of New Caffeine Analogues Molecules with Potential Epithelial Anticancer Activity. *Curr Pharm Des*. 2018;24(5):576-94.

106. Li X, Cornelis MC, Liang L, Song F, De Vivo I, Giovannucci E, et al. A genome-wide analysis of gene-caffeine consumption interaction on basal cell carcinoma. *Carcinogenesis*. 2016;37(12):1138-43.

107. Service FA. Coffee: World Markets and Trade. In: USDA, editor. <https://www.fas.usda.gov/data/coffee-world-markets-and-trade2017>.

108. Declair V. The usefulness of topical application of essential fatty acids (EFA) to prevent pressure ulcers. *Ostomy Wound Manage*. 1997;43(5):48-52, 4.

109. Bruzi LM, Mendes DC. Importância da assistência de enfermagem no manejo de complicação relacionada ao cateter totalmente implantável. *Rev Esc Enferm USP*. 2011;45(2):5.

110. Gonçalves RV, Souza NTA, Silva PH, Barbosa FS, Neves CA. Influência do laser de arseneto de gálio-alumínio em feridas cutâneas de ratos. *Fisoter Mov*. 2010;23(3):8.

111. Prottey C, Hartop PJ, Press M. Correction of the cutaneous manifestations of essential fatty acid deficiency in man by application of sunflower-seed oil to the skin. *J Invest Dermatol.* 1975;64(4):228-34.
112. Marques SR, Peixoto CA, Messias JB, de Albuquerque AR, da Silva Junior VA. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. *Acta Cir Bras.* 2004;19(3):196-209.
113. Quege GE, Bachion MM, Lino Junior RS, Lima ABM, Ferreira PS, Santos QR, et al. [Comparison of the activity of fatty essential acids and biomembrane in the microbiota of infected chronic wounds]. *Rev Eletr Enf.* 2008;10(4):16.
114. Rocha RP, Rocha ELP, Hames RL, Sposeto TB. Estudo comparativo do processo de cicatrização com o uso de óleo de semente de girassol e triglicérides de cadeia média: modelo experimental em ratos. *Sci Med.* 2004;14(1):6.
115. Ernst E. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. *Br J Dermatol.* 2000;143(5):923-9.
116. Gee BC, Wilson P, Morris AD, Emerson RM. Herbal is not synonymous with safe. *Arch Dermatol.* 2002;138(12):1613.
117. Tirant M, Lotti T, Gianfaldoni S, Tchernev G, Wollina U, Bayer P. Integrative Dermatology - The use of herbals and nutritional supplements to treat dermatological conditions. *Open Access Maced J Med Sci.* 2018;6(1):185-202.
118. Society AOC, Firestone D. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society: AOCS press; 1994.
119. Hantao L, Toledo B, Ribeiro F, Pizetta M, Pierozzi C, Furtado E, et al. Comprehensive two-dimensional gas chromatography combined to multivariate data analysis for detection of disease-resistant clones of Eucalyptus. *Talanta.* 2013;116:1079-84.
120. Poole C. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. *Journal of Chromatography.* 2013;1296:2-14.
121. Gouma E, Simos Y, Verginadis I, Lykoudis E, Evangelou A, Karkabounas S. A simple procedure for estimation of total body surface area and determination of a new value of Meeh's constant in rats. *Lab Anim.* 2012;46(1):40-5.
122. Redlarski G, Palkowski A, Krawczuk M. Body surface area formulae: an alarming ambiguity. *Sci Rep.* 62016.

123. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010;8(6):e1000412.
124. Tran RJ, Sly KL, Conboy JC. Applications of Surface Second Harmonic Generation in Biological Sensing. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2017;10(1):387-414.
125. König K, Riemann I. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *J Biomed Opt.* 2003;8(3):432-9.
126. Vieira-Damiani G, Adam R, Ferro D, de Thomaz A, Cesar C, Metze K. Automatic analysis of the elastic fiber texture of the aorta. *Microscopy and Microanalysis.* 2009;15:962-3.
127. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):671-5.
128. de Moura RF, Nascimento LF, Ignacio-Souza LM, Morari J, Razolli DS, Solon C, et al. Hypothalamic stearoyl-CoA desaturase-2 (SCD2) controls whole-body energy expenditure. *Int J Obes (Lond).* 2015.
129. Morari J, Torsoni AS, Anhe GF, Roman EA, Cintra DE, Ward LS, et al. The role of proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha in the fatty-acid-dependent transcriptional control of interleukin-10 in hepatic cells of rodents. *Metabolism.* 2010;59(2):215-23.
130. Lania BG, Morari J, Souza AL, Silva MND, de Almeida AR, Veira-Damiani G, et al. Topical use and systemic action of green and roasted coffee oils and ground oils in a cutaneous incision model in rats (*Rattus norvegicus albinus*). *PLoS One.* 2017;12(12):e0188779.
131. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov.* 2015;14(2):111-29.
132. Xie T, Song S, Li S, Ouyang L, Xia L, Huang J. Review of natural product databases. *Cell Prolif.* 2015;48(4):398-404.
133. Saporito F, Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Boselli C, Icaro Cornaglia A, et al. Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing. *Int J Nanomedicine.* 2018;13:175-86.

134. Kim do Y, Won KJ, Yoon MS, Hwang DI, Yoon SW, Park JH, et al. *Chrysanthemum boreale* Makino essential oil induces keratinocyte proliferation and skin regeneration. *Nat Prod Res.*29(6):562-4.
135. Marques SR, Peixoto CA, Messias JB, Albuquerque ARd, Silva Junior VAd. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. *Acta Cir Bras.* 2004;19(3):196-209.
136. Manhezi AC, Bachion MM, Pereira AL. The use of essential fatty acids in the treatments of wounds. *Rev Bras Enferm.* 2008;61(5):620-8.
137. Gupta A, Upadhyay NK, Sawhney RC, Kumar R. A poly-herbal formulation accelerates normal and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(6):784-90.
138. Ghosh PK, Gaba A. Phyto-extracts in wound healing. *J Pharm Pharm Sci.* 2013;16(5):760-820.
139. Shinzato T, Sasaki M, Ota N, Shibata K, Fukui H, Toma S, et al. A New Method That Enables Complete Removal of Scabs at Buttonhole Entry Sites. *Contrib Nephrol.* 2015;186:41-7.
140. Leung V, Zhang E, Pang DS. Real-time application of the Rat Grimace Scale as a welfare refinement in laboratory rats. *Sci Rep.* 2016;6.
141. Hailemeskel B, Fullas F. The Use of Freshly Roasted Coffee Bean Powder in the Treatment of Burn Wound: A Case Report. *Dermatol Open J.* 2016;1(2):5.
142. Cicchi R, Kapsokalyvas D, De Giorgi V, Maio V, Van Wiechen A, Massi D, et al. Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy. *J Biophotonics.* 2010;3(1-2):34-43.
143. Seleit I, Bakry OA, Samaka RM, Tawfik AS. Immunohistochemical evaluation of leptina expression in wound healing: a clue to exuberante scar formation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2016;24(4):296-306.
144. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 2003;423(6941):762-9.
145. Salathia NS, Shi J, Zhang J, Glynne RJ. An in vivo screen of secreted proteins identifies adiponectin as a regulator of murine cutaneous wound healing. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):812-21.

146. Aghdam SY. Vascular endothelial insulin/IGF-1 signaling controls skin wound vascularization. 2012;421(2):197–202.
147. Talebpour Amiri F, Fadaei Fathabadi F, Mahmoudi Rad M, Piryae A, Ghasemi A, Khalilian A, et al. The effects of insulin-like growth factor-1 gene therapy and cell transplantation on rat acute wound model. *Iran Red Crescent Med J*. 2014;16(10).
148. Zhao Y, Bao L, Chan LS, DiPietro LA, Chen L. Aberrant wound healing in an epidermal interleukin-4 transgenic mouse model of atopic dermatitis. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146451.
149. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghov R. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest*. 1992;90(4):1479-85.
150. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(2):133-46.
151. Gerber SA, Cummings RJ, Judge JL, Barlow ML, Nanduri J, Johnson DE, et al. Interleukin-12 preserves the cutaneous physical and immunological barrier after radiation exposure. *Radiat Res*. 2015;183(1):72-81.
152. Li J, Bower AJ, Vainstein V, Gluzman-Poltorak Z, Chaney EJ, Marjanovic M, et al. Effect of recombinant interleukin-12 on murine skin regeneration and cell dynamics using in vivo multimodal microscopy. *Biomed Opt Express*. 2015;6(11):4277-87.
153. Meglio PD, Nestle FO. The role of IL-23 in the immunopathogenesis of psoriasis. *F1000 Biol Rep*. 2010;2.
154. Bollag WB, Hill WD. CXCR4 in epidermal keratinocytes: crosstalk within the skin. *J Invest Dermatol*. 2013;133(11):2505-8.
155. Shen H, Yao P, Lee E, Greenhalgh D, Soulika AM. Interferon-gamma inhibits healing post scald burn injury. *Wound Repair Regen*. 2012;20(4):580-91.
156. Mikita N, Ikeda T, Ishiguro M, Furukawa F. Recent advances in cytokines in cutaneous and systemic lupus erythematosus. *J Dermatol*. 2011;38(9):839-49.
157. Tanno H, Kawakami K, Ritsu M, Kanno E, Suzuki A, Kamimatsuno R, et al. Contribution of invariant natural killer T cells to skin wound healing. *Am J Pathol*. 2015;185(12):3248-57.
158. Gregorio J, Meller S, Conrad C, Di Nardo A, Homey B, Lauerma A, et al. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med*. 2010;207(13):2921-30.

159. Butzelaar L, Schooneman DP, Soykan EA, Talhout W, Ulrich MM, van den Broek LJ, et al. Inhibited early immunologic response is associated with hypertrophic scarring. *Exp Dermatol*. 2016;25(10):797-804.
160. Das LM, Rosenjack J, Au L, Galle PS, Hansen MB, Cathcart MK, et al. Hyperinflammation and skin destruction mediated by rosiglitazone activation of macrophages in IL-6 deficiency. *J Invest Dermatol*. 2015;135(2):389-99.
161. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015;16(5):448-57.
162. Kristiansen OP, Mandrup-Poulsen T. Interleukin-6 and diabetes. *Diabetes*. 2005;54(Suppl 2):11.
163. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry*. 2010;67(5):446-57.
164. Sato K, Tsuchiya M, Saldanha J, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kishimoto T, et al. Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer Res*. 1993;53(4):851-6.
165. Benitez JM, Barros RT, Cevallos CVG, Rizzo LV, Kokron C, Woronik V, et al. Comparação da secreção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) entre pacientes com nefropatia da IgA e deficiência de IgA. *Rev Bras Alerg Imunopatol*. 2004;27(3):12.
166. Yang WT, Ke CY, Wu WT, Harn HJ, Tseng YH, Lee RP. Effects of *Angelica dahurica* and *Rheum officinale* extracts on excisional wound healing in rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2017;2017:1583031.
167. Abo El-Noor MM, Elgazzar FM, Alshenawy HA. Role of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 expression in estimation of skin burn age and vitality. *J Forensic Leg Med*. 2017;52:148-53.
168. Goodman L, Stein GH. Basal and induced amounts of interleukin-6 mRNA decline progressively with age in human fibroblasts. *J Biol Chem*. 1994;269(30):19250-5.
169. Ruparel P, Lockwood B. The quality of commercially available herbal products. *Nat Prod Commun*. 2011;6(5):733-44.
170. Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Herbal drugs: standards and regulation. *Fitoterapia*. 2010;81(6):462-71.

171. Balbino EE, Dias MF. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2010;20(6):992-1000.
172. Shaw D, Graeme L, Pierre D, Elizabeth W, Kelvin C. Pharmacovigilance of herbal medicine. *J Ethnopharmacol*. 2012;140(3):513-8.
173. GPO. 21 Chapter I Subchapter E Part 514 Subpart B, §514.117 - Adequate and well-controlled studies. *Code of Federal Regulation* 2017.
174. Meireles MM, da Cruz CF, Ninahuaman MFM, Santos RCS, Santos AA. Efeito da pasta de figo no processo cicatricial de pele de Wistar. *Acta Scientiae Biol Res*. 2016;1(1):24.
175. Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Sci OA*. 2015;1(4):FSO63.
176. Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(1):1-15.

8. ANEXOS

8.1. Carta de aprovação do Ceua



CEUA/Unicamp

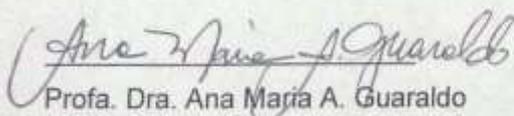
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

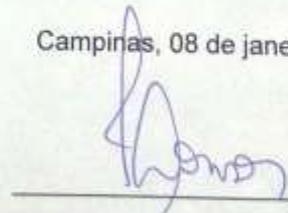
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Uso da borra do óleo de café para cicatrização de úlceras cutâneas em ratos (*Rattus norvegicus albinus* - Sprague Dawley)" (protocolo nº 2929-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho / Bruno Grosselli Lania, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 08 de janeiro de 2013.

Campinas, 08 de janeiro de 2013.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alenso
Secretária Executiva