

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Marina de Souza Vencato

**O EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Tropaeolum majus* L.
FAVORECE A CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS**

Santa Maria, RS
2017

Marina de Souza Vencato

**O EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Tropaeolum majus* L. FAVORECE A
CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Toxicologia e Nutracêutica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha

Santa Maria, RS
2017

Marina de Souza Vencato

**O EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Tropaeolum majus* L. FAVORECE A
CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Toxicologia e Nutracêutica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 25 de agosto de 2017:

Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Clarice Madalena Bueno Rolim, Dra. (UFSM) – Parecer

Michele Rorato Sagrillo, Dra. (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

A meus pais, Telbio e Liane, que de muitas coisas se privaram para que eu tivesse as oportunidades que eles próprios não tiveram; que mesmo através das dificuldades nada me deixaram faltar; que fizeram das minhas realizações suas realizações; que tanto desejaram ver este momento se concretizar.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto da dedicação de muitas pessoas. Se superei o difícil período de experimentação, foi porque tive a colaboração de amigos maravilhosos. Carinhosamente, agradeço:

À Deus, pela vida que tenho e pelas pessoas fabulosas com as quais me foi permitido conviver;

À Universidade Federal de Santa Maria, por ser meu segundo lar há mais de 8 anos;

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, seus professores e sua secretária Zeli Carvalho, pelo aprendizado, contribuição em materiais, solventes e todos os esclarecimentos prestados;

Ao Departamento de Morfologia e seus funcionários, pela acolhida e compreensão com meus estudos;

À minha orientadora Bebel pela eficiência acima de toda prova e por ser em muitos momentos bem mais que minha orientadora; pelos conselhos e experiência compartilhada; por compreender minhas estranhezas e confiar tanto em mim;

À Prof.^a Josiane Faganello, pelo carinho sem tamanho, pela amizade, pelos projetos compartilhados, pelos conselhos e pelo melhor cafezinho do mundo;

Ao meu eterno chefe Prof. Marcelo da Veiga, por todas as orientações desde que ingressei nesta universidade;

Aos meus pais Liane e Telbio, que me fizeram compreender desde cedo o valor da educação, dedicação e da leitura assídua e por me resgatarem dos momentos difíceis após o período de experimentação; e à minha irmã Mábile, por ser minha melhor amiga e minha grande fonte de inspiração;

Ao meu namorado Gabriel, por ser simplesmente o melhor, pelo carinho e incentivo infinitos, e por tolerar pacientemente meu cansaço e minhas lágrimas;

Aos meus sogros Vilmar e Michele, pelo convívio alegre e incentivo;

À minha colega e filha/irmã do coração Gabriele Cheiran Pereira, que dividiu comigo no mano-a-mano todas as tarefas neste trabalho com dedicação, esforço e disposição inexplicáveis; e à sua irmã Rafaela Cheiran Pereira pela organização de gráficos e imagens.

À minha colega Karen Luise Moreira, por não permitir que eu caísse em completo desespero nos experimentos, mantendo uma serenidade exemplar; e à sua orientadora de mestrado Patrícia do Nascimento por nos conceder o espaço para os experimentos;

À minha colega e professora Isabel Araldi, pela parceria diária e por ser esse raio de luz no meu dia-a-dia;

À minha amiga Jéssica Franco Dalenogare, pela alegria esfuziante e preciosa ajuda e conselhos ao ingressar na pós-graduação;

À Prof.^a Cristiane de Bona e sua orientada Jéssica Wolf, pela análise dos cremes e ajuda com os resultados;

À Prof.^a Maria Amália Pavanato e sua orientada Érika Londero, pelas análises bioquímicas e orientações de coleta;

À Prof.^a Melânia Manfron e sua orientada e minha grande amiga Juliana Brondani, pela preparação do extrato e todas as análises relacionadas.

A todos meu muito obrigada!

Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração de críticos honestos e suportar a traição de falsos amigos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma saudável criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter sucesso!

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

O EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Tropaeolum majus* L. FAVORECE A CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA EM RATOS

AUTORA: Marina de Souza Vencato

ORIENTADORA: Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha

A pele é o maior órgão do corpo humano. Diversas células, entre elas queratinócitos, células de Langerhans, melanócitos, células de Merkel e fibroblastos, fazem parte dos tecidos da pele, assegurando suas inúmeras funções. Dentre estas funções, a de barreira primária contra agente agressores ambientais é a mais importante. Danos que levem a interrupção desta barreira despertam respostas fisiológicas complexas visando restaurar esta função tão essencial em um processo multifásico denominado cicatrização. A fase inflamatória da cicatrização é passível de descontrole, aumentando o risco de atrasos no processo devido ao desequilíbrio lítico e oxidativo e ao prolongamento da inflamação. Desta forma, a recuperação das defesas fisiológicas pela introdução de agentes antioxidantes e anti-inflamatórios pode representar uma medida importante para atingir a cura. *Tropaeolum majus* L. é uma planta originária dos Andes Sul Americanos com inúmeros usos populares e reconhecida pela cultura tradicional por suas propriedades anti-inflamatórias e cicatrizantes. Alguns desses usos já foram fundamentados cientificamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial cicatrizante do extrato de *T. majus*. Neste trabalho 54 ratos Wistar machos sofreram processo cirúrgico para indução das feridas cutâneas. As feridas foram tratadas diariamente com emulsão base (controle), emulsão base acrescida de alantoína 1% (controle positivo) ou emulsão base acrescida de extrato hidroetanólico (70%) seco de *T. majus* (1%). A eutanásia e remoção das feridas para análises bioquímicas e morfológicas foi realizada 3, 7 e 14 dias após a cirurgia (dia 0). O extrato foi submetido a análise fitoquímica para identificação dos componentes fenólicos majoritários. O conteúdo total de compostos fenólicos e flavonoides e a atividade antioxidante do extrato também foram determinados. A alantoína provou os resultados esperados como agente cicatrizante. Porém o extrato de *T. majus* evidenciou resultados ainda melhores que o controle positivo. O extrato melhorou parâmetros oxidativos da ferida, reduziu a inflamação, aumentou o número de fibroblastos, a organização do tecido conjuntivo da derme e a deposição de colágeno. *T. majus* também ofereceu benefícios a reepitelização. A análise do extrato demonstrou a presença de dois compostos fenólicos majoritários, ácido clorogênico e rutina, além de elevados níveis de compostos fenólicos totais e flavonoides associados a ótima atividade antioxidante. Conclui-se que extrato de *T. majus* apresentou excelente ação cicatrizante a qual parece estar ligada aos compostos fenólicos de sua composição, demonstrando possível aplicação farmacêutica.

Palavras-chave: capuchinha, nastúrio, reparo, pele, compostos fenólicos

ABSTRACT

***Tropaeolum majus* L. HYDROETHANOLIC EXTRACT IMPROVES WOUND HEALING IN RATS**

AUTHOR: Marina de Souza Vencato
ADVISER: Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha

Skin is the largest organ of the human body. Several cell types, including keratinocytes, Langerhans cells, melanocytes, Merkel cells and fibroblasts indwell in this tissue, ensuring its innumerable functions. Among these functions, the primary barrier against environmental aggressions may be the most important activity. Any damage that determines the interruption of this barrier sets a series of complex physiological responses aiming to restore this essential function in a multiphase process known as wound healing. The inflammatory phase of wound healing is subjected to possible instabilities. This may increase risks of delayed repair due to lytic and oxidative unbalances and continued inflammation. Therefore, the restoration of physiological defenses through the introduction of antioxidant and anti-inflammatory substances may result in an important strategy for recovery. *Tropaeolum majus* L. is a plant original from the South American Andes with many popular uses recognized by folk medicine for its anti-inflammatory and wound healing properties. Some of these traditional uses have already been scientifically justified. The aim of this work was to evaluate the wound healing potential of *T. majus* hydroethanolic extract. Fifty-four male Wistar rats were surgically wounded and treated daily with base emulsion (control group), base emulsion plus allantoin 1% (positive control group), or base emulsion plus *T. majus* dried hydroethanolic (70%) extract. Euthanasia and skin sample removal was carried 3, 7, and 14 days after surgery (day 0). The samples were destined to biochemical and morphological analyses. The extract was submitted to phytochemical characterization to determine major phenolic compounds. Total content of phenolic compounds, total content of flavonoids, and antioxidant capacity were also determined. Allantoin showed the expected results for a wound healing agent. However, *T. majus* extract demonstrated superior results compared to the positive control. The extract improved oxidative parameters of the wound, reduced inflammation, increased the number of fibroblasts, increased dermal connective tissue organization and collagen deposition. *T. majus* also offered benefits to re-epithelization. The extract analyses evidenced the presence of two major phenolic compounds, chlorogenic acid and rutin, as well as elevated content of phenolics and flavonoids associated to an elevated antioxidant capacity. It was concluded that *T. majus* extract presented excellent wound healing activity, probably connected to phenolic substances in its composition, demonstrating the possibility of pharmaceutical applications.

Key-words: nasturtium, repair, skin, phenolic content

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 – Representação esquemática da pele, suas camadas e axenos 15
- Figura 2 – Representação esquemática da epiderme e derme na pele espessa18
- Figura 3 – Linha do tempo das fases da cicatrização e sua relação com a migração celular19
- Figura 4 – Flores de *Tropaeolum majus* L. nas cores mais comumente encontradas.... 24

ARTIGO

- Figura 1 – HPLC chromatograms of standards (A) and hydroethanolic extract (70%) of *T. majus* (B)..... 37
- Figura 2 – Results for morphological and biochemical analyses at different moments of wound healing (*p<0.05)..... 39
- Figura 3 – Photomicrographs of histological findings on day 14..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

REFERENCIAL TEÓRICO:

EROs espécies reativas de oxigênio

ARTIGO – *Tropaeolum majus* L. hydroethanolic extract improves wound healing in rats

AG	allantoin treated group
ANOVA	Analyses of variance
BHT	Butylated hydroxytoluene
CAT	catalase
CG	control group
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography-Diode Array detector
Ip	intraperitoneal
Kg	Kilogram
LC ₅₀	lethal concentration 50
mg	milligram
mL	milliliter
nmol	nanomol
OI	oxidation inhibition
SOD	Superoxide dismutase
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TG	<i>T. majus</i> treated group
U	unity
UV	Ultraviolet
µg	microgram
%	percentage

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	FISIOLOGIA DA PELE: PRINCIPAIS FUNÇÕES E TIPOS CELULARES.....	14
2.2	CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA	18
2.3	<i>Tropaeolum majus</i> L. E SUAS PROPRIEDADES	23
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVOS GERAIS	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5	ARTIGO – <i>Tropaeolum majus</i> L. hydroethanolic extract improves wound healing in rats	30
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A pele por si só é um órgão extremamente complexo, uma vez que nela habitam diversos tipos celulares, como fibroblastos, células de Langerhans, melanócitos, células de Merkel e queratinócitos em vários estágios de diferenciação (MENON, 2002). A pele, portanto, exerce inúmeras funções essenciais a vida, fruto desta diversidade de células, cada uma encarregada de suas atividades específicas. Dentre todas as funções exercidas por este tecido, o papel de barreira primária do organismo é considerado o mais importante (HÄNEL et al., 2013).

Maior ainda se torna a complexidade e a diversidade celular deste sistema quando ele responde a lesões que provoquem interrupção tecidual e, conseqüentemente, o comprometimento de suas funções. Inúmeras e complexas respostas fisiológicas são ativadas, iniciando um processo multifásico denominado cicatrização, ainda longe de estar completamente compreendido. A cicatrização tem por objetivo restaurar o tecido lesado e sua função de barreira (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; SORG et al., 2017).

A fase inflamatória da cicatrização é sem dúvida um ponto chave deste processo. Seu objetivo é descontaminar o ferimento e gerar os estímulos para as próximas fases do processo de reparo. Falhas nesta etapa podem gerar a perpetuação anormal desta fase e o surgimento de feridas crônicas. Ferimentos crônicos, portanto, geralmente se tornam estacionários na fase inflamatória, exibem elevados níveis de proteases, espécies reativas e apresentam infecções persistentes. Esta condição representa um grande impacto sobre os recursos destinados a saúde e um desafio aos profissionais da área (FRYKBERG; BANKS, 2015). Este assunto se torna também muito relevante quando considerada a crescente incidência de doenças como diabetes, obesidade e o envelhecimento populacional, os quais representam fatores de risco para o desenvolvimento de ferimentos crônicos (GUO; DIPIETRO, 2010).

Considerando-se este contexto, o uso de novas abordagens em saúde, que venham a restaurar as defesas fisiológicas através de atividades antioxidante, anti-inflamatória ou até mesmo antimicrobiana, pode representar uma relevante estratégia para a obtenção da cura. Todas estas atividades e muitas outras podem ser encontradas nos recursos naturais deste planeta.

Mesmo com o crescimento das indústrias a natureza permanece como a grande fonte provedora de recursos no combate às mais diversas doenças. A medicina tradicional se destaca pela ampla utilização de produtos naturais de forma medicinal. Muito embora apenas uma pequena parcela desses produtos chegue ao mercado, a confiança nos recursos naturais cresce entre pacientes e pesquisadores. A maior parte dos agentes cicatrizantes presentes no mercado

atualmente são derivados de plantas utilizadas na medicina popular, demonstrando a importância de estudos na área (KARAPANAGIOTI; ASSIMOPOLOU, 2016).

Tropaeolum majus L., popularmente conhecida como capuchinha ou nastúrtio, é uma planta comestível originária dos Andes Sul Americanos com inúmeros usos tradicionais. De acordo com a sabedoria popular *T. majus* pode ser empregada contra escorbuto, doenças cardiovasculares, distúrbios respiratório e do trato urinário. Também é considerada um excelente agente antisséptico, anti-inflamatório e cicatrizante (LIM, 2014). Algumas de suas atividades mais marcantes são atribuídas a presença de isotiocianatos em sua composição (PINTÃO; PAIS, 1994). Não obstante, *T. majus* também é rica em compostos fenólicos, antocianinas, carotenoides e vitamina C, que lhe garante várias propriedades que contribuem para o processo de reparo, como ação antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana (GARZÓN; WROLSTAD, 2009; NIIZU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005).

Com base nos dados abordados este trabalho teve como objetivo investigar a capacidade cicatrizante de *Tropaeolum majus*, relacionando-a a composição química da planta e aos dados já presentes em literatura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

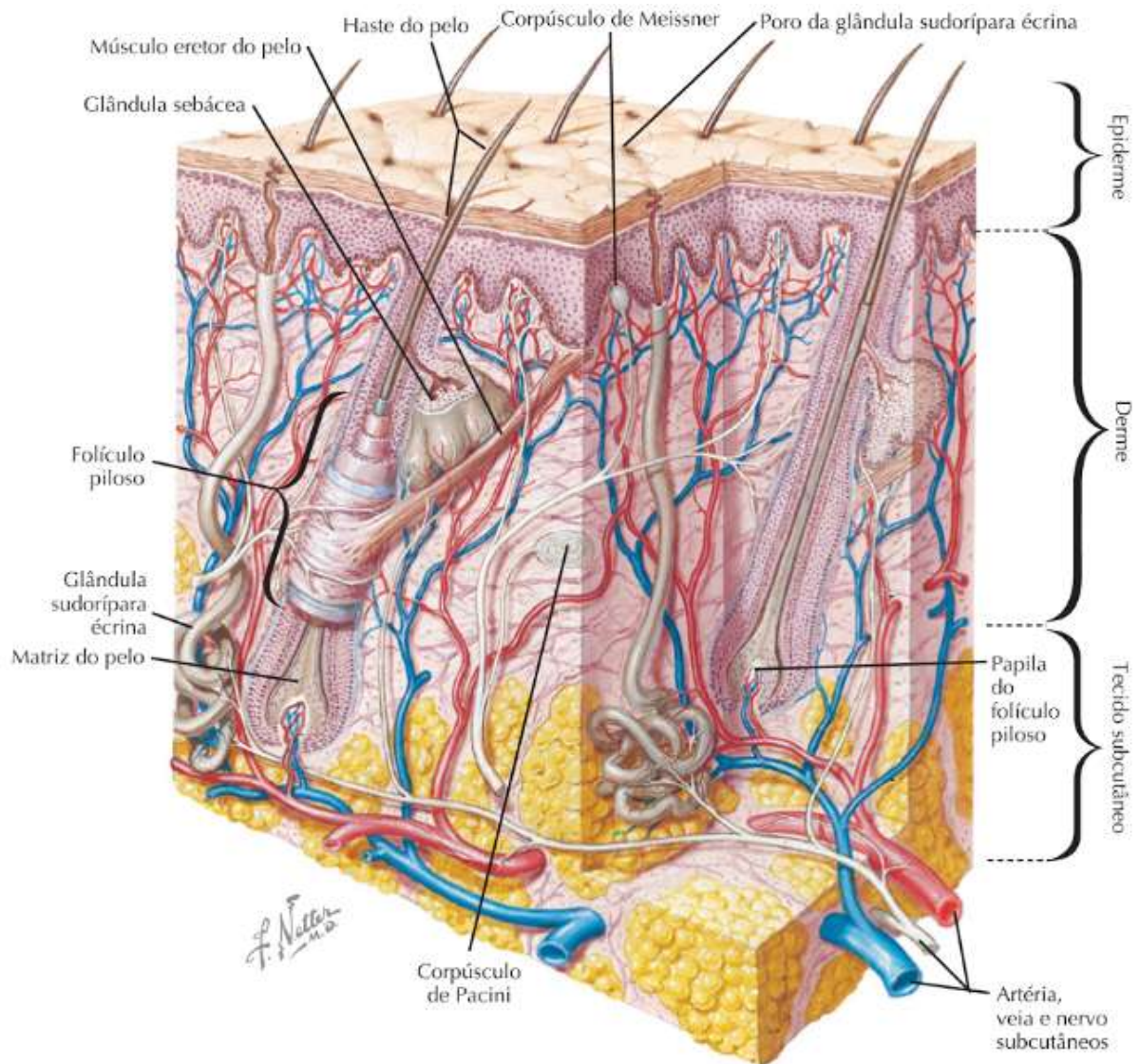
2.1 FISIOLOGIA DA PELE: PRINCIPAIS FUNÇÕES E TIPOS CELULARES

A pele é um órgão fascinante, dinâmico e complexo que faz parte do sistema tegumentar e é responsável por uma grande variedade de funções. Recobrendo todo o organismo e oferecendo proteção contra o ambiente externo, a pele atua também como órgão termorregulador, sensorial e endócrino (MENON, 2002; ROSIQUE; ROSIQUE; FARINA JUNIOR, 2015). Mas, dentre todas as funções deste que é o maior órgão do corpo humano, a função de dupla barreira, contra agentes agressores externos (químicos, físicos ou biológicos) e contra a perda de água e solutos internos é a mais importante (HÄNEL et al., 2013). Curiosamente, seu extenso papel de defesa contra o ambiente externo contrasta com sua natureza maleável, flexível e responsiva (ROSS; CHRISTIANO, 2006).

De forma a assegurar esta função essencial as células epidérmicas da pele sofrem grandes alterações em sua morfologia e integridade estrutural em um processo de diferenciação chamado cornificação, do qual resulta a formação do estrato córneo (HÄNEL et al., 2013). O estrato córneo é considerado parte do sistema imune inato. Se desenvolve na vida intrauterina e acompanha o indivíduo desde o momento do nascimento, quando este é exposto a um ambiente frio, seco e repleto de micro-organismos (VISSCHER; NARENDRAN, 2014). Sua formação é fruto de vias complexas de sinalização celulares, envolvendo inúmeras substâncias químicas reguladoras que quando em desequilíbrio podem gerar distúrbios na formação da barreira cutânea (HÄNEL et al., 2013). O desenvolvimento incompleto desta barreira é um fator de grande relevância em recém-nascidos prematuros, devido ao risco aumentado de infecções (VISSCHER; NARENDRAN, 2014). Além disso, anormalidades na formação da barreira cutânea estão associadas ao desenvolvimento de doenças inflamatórias da pele como dermatite atópica e psoríase (HÄNEL et al., 2013; ADDOR; AOKI, 2010).

A pele geralmente é classificada em dois tipos: pele delgada e pele espessa. A pele delgada apresenta 2 mm de espessura ou menos, sua epiderme é fina e apresenta todos os anexos cutâneos. A pele espessa recobre a palma das mãos e a sola dos pés. Apresenta mais de 5 mm de espessura e possui epiderme e derme espessas. Além disso, a pele fina é glabra, ou seja, não possui pelos (KIERSZENBAUM; TRES, 2012). Derme e epiderme na pele fina estão ilustrados na Figura 1.

Figura 1 – Representação esquemática da pele, suas camadas e axenos



Fonte: OVALLE; NAHIRNEY, 2014.

A pele é formada por duas camadas principais: externamente a epiderme, composta de epitélio estratificado queratinizado; e internamente a derme que sustenta a epiderme e os anexos cutâneos (pelos e glândulas), além das terminações nervosas que inervarão diferentes partes do tecido (MENON, 2002; WATT, 2014). Diversos tipos celulares habitam este sistema, cada qual cumprindo seu papel para a manutenção do equilíbrio e execução das múltiplas funções deste órgão.

A derme é vascularizada e composta pelos elementos do tecido conjuntivo, como colágeno, elastina e glicosaminoglicanas (componentes de matriz extracelular) e pelas células

secretoras desses elementos, os fibroblastos (MENON, 2002). Os fibroblastos são as células residentes da derme, embora outras células, como as células do sistema imune, possam transitar no tecido de forma passageira (MENON, 2002; WATT, 2014).

A epiderme é avascular, formada majoritariamente por queratinócitos em diferentes estágios de diferenciação, além de melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (MENON, 2002). As diferentes camadas epidérmicas representam um processo contínuo de diferenciação. A camada basal apresenta as células tronco epidérmicas colunares ancoradas sobre a membrana basal, as quais replicam-se gerando células engajadas no processo de diferenciação e células que permanecem na camada basal. As células basais são as únicas células epidérmicas com capacidade mitótica (MENON, 2002; McLAFFERTY; HENDRY; FARLEY, 2012).

As células de Merkel são um tipo especial de células epiteliais que atuam como receptores sensoriais e também estão presentes na base da epiderme da pele. As células de Merkel se associam a terminações nervosas em sua porção basal e podem associar-se a queratinócitos vizinhos formando unidades tácteis. Sua função está mais fortemente relacionada a percepção de sensações táteis tênues. Esta percepção se dá graças a presença de canais iônicos mecanicamente ativados, gerando estímulos elétricos que serão interpretados no sistema nervoso central (WOO; LUMPKIN; PATAPOUTIAN, 2015; XIAO; WILLIAMS, BROWNELL; 2014).

As células de Merkel, no entanto, não são os únicos receptores sensoriais da pele. A derme também apresenta os corpúsculos de Meissner, consistindo de terminações nervosas não mielinizadas cujas extremidades são encapsuladas por células lamelares. Os corpúsculos de Paccini por sua vez são terminações mielinizadas também encapsuladas por diversas lamelas concêntricas de tecido conjuntivo. Estes receptores estão presentes principalmente na pele glabra e são de adaptação rápida, extremamente sensíveis com baixo limiar de resposta, responsáveis por detectar pequenos toques e vibrações (SAXOD, 1996; VEGA et al., 2009).

Os melanócitos, também presentes na camada basal, cumprem papel essencial na fotoproteção e determinação de traços fenotípicos. Os melanócitos são responsáveis pela produção e distribuição da melanina a qual além de absorver a radiação UV é responsável pela pigmentação da pele, cabelos e olhos. A melanogênese ocorre dentro de organelas denominadas melanossomas, presentes no citoplasma dos melanócitos. Quando maduras são transferidas aos queratinócitos vizinhos através de prolongamentos citoplasmáticos e posicionando-se estrategicamente sobre o núcleo destas células (VIDEIRA; MOURA; MAGINA, 2013).

Na camada basal da pele ocorre outro evento muito importante: a produção da vitamina D a partir de seus precursores químicos devido a foto-reação mediada pela radiação UVB. Este hormônio é mais reconhecido por suas funções no balanço dos íons cálcio e fósforo e na preservação do sistema musculoesquelético. Apesar de sua síntese endógena ser dependente de luz UV, considerada danosa para a pele, a vitamina D contribui imensamente para a fisiologia da pele e demais órgãos. Está envolvida na proliferação, diferenciação e adesão dos queratinócitos e na prevenção do câncer de pele, envelhecimento cutâneo, e diversas outras doenças cutâneas inflamatórias e infecciosas (PIOTROWSKA; WIERZBICKA; ZMIJEWSKI, 2016).

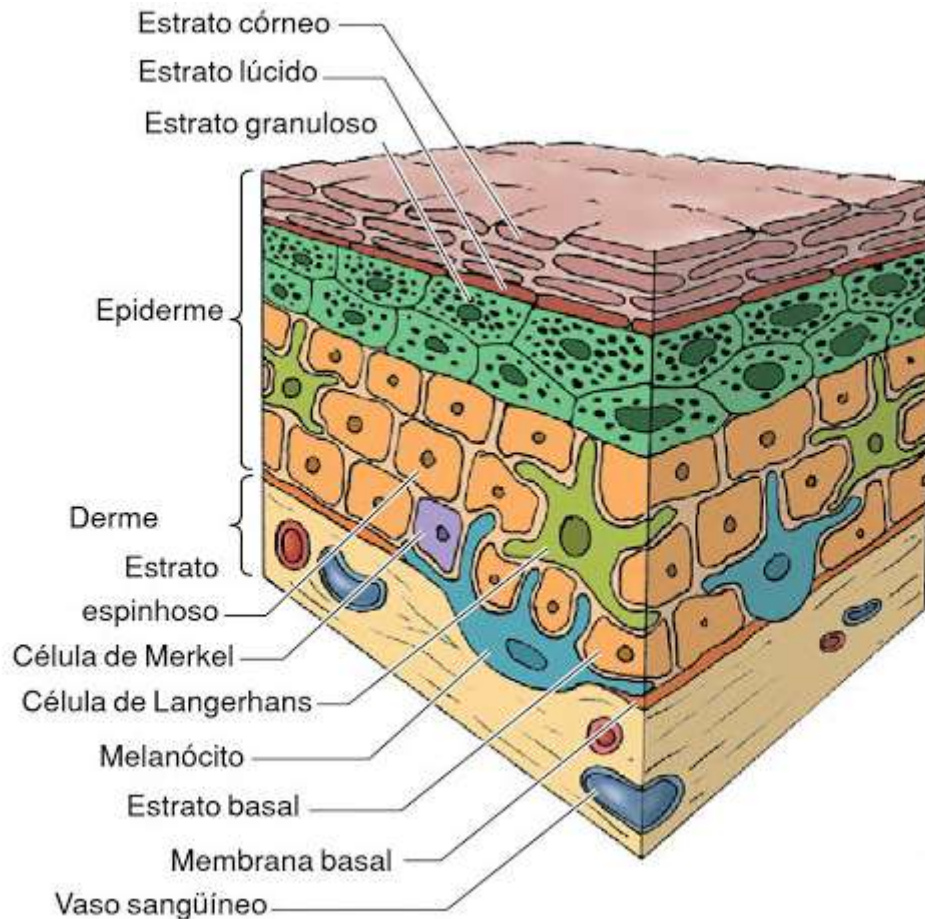
O estrato espinhoso apresenta queratinócitos estrelados, com prolongamentos que se assemelham a espinhos e derivam diretamente das células basais (MENON, 2002). Esta camada também alberga as células dendríticas ou células de Langerhans, que também podem ser encontradas na derme e linfonodos e são responsáveis por outra importante função da pele: a vigilância imunológica (McLAFFERTY; HENDRY; FARLEY, 2012). As células dendríticas compreendem uma família de leucócitos derivados dos monócitos especializados na apresentação de antígenos. Estas células fagocitam e processam substâncias estranhas e micro-organismos, migrando para o linfonodo mais próximo de forma a interagir com linfócitos T e orquestrar a resposta imune (HANIFFA; GUNAWAN; JARDINE, 2015).

A camada granulosa é caracterizada pelo acúmulo de grânulos de querato-hialina e corpos lamelares de conteúdo lipídico no interior das células e pelo início da dissolução das organelas (MENON, 2002). Os queratinócitos desta camada são achatados e ao iniciarem o programa apoptótico perdem seus núcleos e tornam-se metabolicamente inativos. Este processo é consequência do próprio grau de afastamento destas células da derme e seus nutrientes, uma vez que a epiderme não é vascularizada. A pele espessa apresenta uma camada extra após o estrato granuloso chamado estrato lúcido. Suas células apresentam-se com o interior claro e ricas em queratina. Além disso, o estrato córneo na pele espessa é muito abundante (McLAFFERTY; HENDRY; FARLEY, 2012). A pele espessa está representada na Figura 3, juntamente com as principais células presentes na epiderme.

A camada córnea representa o estágio terminal de diferenciação dos queratinócitos (MENON, 2002). É formada por células mortas, achatadas e revestidas por um envelope cornificado proteico e lipídico (HÄNEL et al., 2013). Este conteúdo lipídico proveniente dos corpos lamelares cimenta os corneócitos uns aos outros, evitando a desidratação enquanto a camada proteica de queratina oferece proteção contra calor, químicos e patógenos (McLAFFERTY; HENDRY; FARLEY, 2012). A agregação intracelular dos filamentos de

queratina bem como o acúmulo e secreção de corpos lamelares para o meio extracelular está intimamente ligada a maturação dos queratinócitos visando a formação dos corneócitos (MENON, 2002; HÄNEL et al., 2013).

Figura 2 – Representação esquemática da epiderme e derme na pele espessa



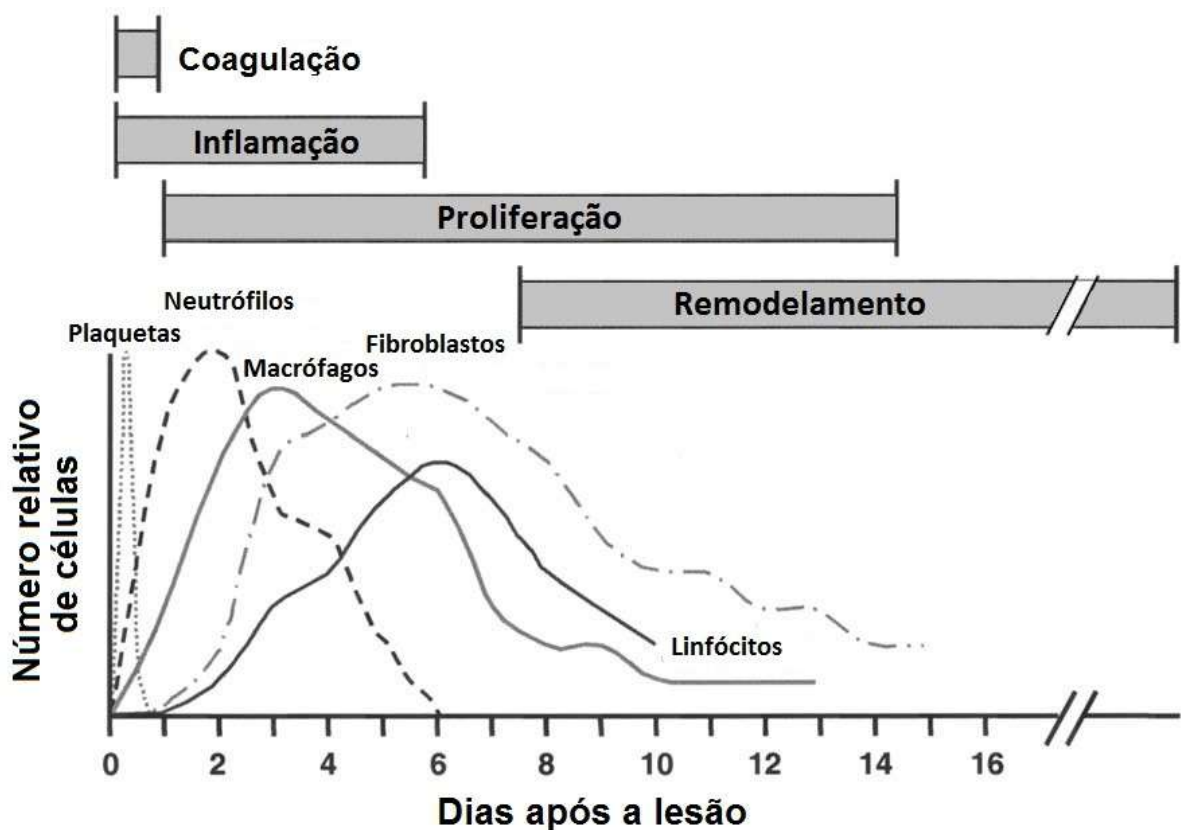
A pele espessa apresenta epitélio espesso e extrato córneo abundante além do extrato lúcido, camada que precede o estrato córneo e não está presente na pele fina. Fonte: Adaptado de Gartner e Hiatt (2012).

2.2 CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA

Tendo em vista que a pele desempenha papel essencial a manutenção da vida, é imprescindível que danos a este tecido sejam revertidos. A lesão tecidual desencadeia uma série de eventos celulares e bioquímicos altamente regulados com o objetivo de restaurar a integridade desta barreira (PARK; BARBUL, 2004). A cicatrização é um processo multifásico complexo e dinâmico resultante da capacidade autorregenerativa dos seres vivos, que envolve

a liberação de uma verdadeira miríade de mediadores químicos responsáveis por orquestrar e regular o reparo tecidual (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). Participam deste processo diversas células do sistema imune, as quais migram para o local da ferida e atuam não apenas na defesa do hospedeiro, mas secretando vários dos mediadores que atuam na cicatrização, como citocinas, linfocinas e fatores de crescimento (PARK; BARBUL, 2004). A dinâmica entre as fases da cicatrização e as principais células ligadas a este processo ao longo do tempo está representada na Figura 3.

Figura 3 – Linha do tempo das fases da cicatrização e sua relação com a migração celular



Fonte: Adaptado de Park e Barbul, 2004.

Os primeiros momentos após uma lesão envolvem eventos hemostáticos, visando interromper a perda de sangue e promovendo a formação de uma matriz provisória para a migração celular. As reações são iniciadas pelo endotélio vascular lesado, induzindo a agregação plaquetária e a formação do coágulo. Antigamente considerada parte da fase inflamatória, apenas recentemente a coagulação passou a ser reconhecida como uma fase

individualmente. Uma vez ativadas, as plaquetas liberam substâncias quimioatratadoras, recrutando leucócitos e dando início a fase inflamatória (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

Porém, outros eventos ainda mais prematuros contribuem para alavancar a cicatrização. A galvanotaxia, ou seja, a migração celular guiada por campos elétricos é reconhecida há muitos anos nos processos fisiológicos, e cumpre um papel essencial na regeneração de tecidos (LEVIN, 2009; NUCCITELLI, 2003). O rompimento da pele em um ferimento gera o colapso do potencial transepitelial, o qual gera um campo elétrico endógeno. Este evento é um dos mais precoces a desencadear a reepitelização, precedendo a sinalização química promovida na fase inflamatória. Os queratinócitos são um dos muitos exemplos de células sensíveis a correntes, sendo por elas direcionados ao centro da ferida até a completa reepitelização (HART et al., 2013; NUCCITELLI, 2003)

A fase inflamatória apresenta um período inicial, em que predominam os neutrófilos, responsáveis por descontaminar a ferida e eliminar corpos estranhos, através da liberação de enzimas e espécies reativas de oxigênio (EROs); e uma fase tardia, caracterizada pela intensa atividade de macrófagos (GUO; DIPIETRO, 2010; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). Muitos fatores relacionados a produção controlada de EROs são fundamentais a cicatrização. A própria hipóxia gerada no local da ferida devido a ruptura vascular e ao elevado consumo celular de oxigênio é responsável por aumentar a migração galvanotática dos queratinócitos. Sugere-se que este mecanismo é induzido por EROs pois na sua ausência este efeito não é verificado (GUO et al., 2015).

Os macrófagos, por sua vez, são considerados os grandes orquestradores do processo de reparo, liberando fatores responsáveis por estimular a proliferação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos. Desta forma, os macrófagos atuam como dirigentes da fase proliferativa, estando envolvidos na síntese de colágeno, angiogênese e reepitelização (KOH; DIPIETRO, 2011; SORG et al. 2017). Assim tem início a fase de proliferação, marcada pela presença do tecido de granulação, rico em fibroblastos, macrófagos, altamente vascularizado e sustentado por uma matriz rica em colágeno tipo III (REINK; SORG, 2012).

Portanto, como o próprio nome sugere, a fase proliferativa é marcada pela proliferação das células que promoverão o reparo, sendo portanda crucial para o sucesso deste processo. A proliferação das células do endotélio sustenta o processo do ponto de vista energético, enquanto fibroblastos repõem os elementos de matriz da derme e os queratinócitos migram em direção ao leito da ferida, de forma a sela-la definitivamente.

Apesar de parecer contraditório, modelos matemáticos recentes mostram que a adesão celular entre queratinócitos é essencial no reparo cutâneo por estar relacionada à manutenção da migração celular coletiva e contínua. Dessa forma a adesão celular é vista não como uma força que retém as células migratórias, mas que faz com que as células em migração puxem as células vizinhas consigo para o leito da ferida (NARDINI et al., 2016).

Diferente das demais, a fase de remodelação pode levar um ano para se concluir. É caracterizada pela substituição da matriz provisória gerada na fase proliferativa por uma matriz permanente e mais resistente de colágeno tipo I. Nesta fase também ocorrem a apoptose das células do tecido de granulação, bem como a retração na cicatriz (REINK; SORG, 2012).

As feridas agudas são aquelas que alcançam a devida descontaminação e são bem-sucedidas em completar todas as fases do reparo de forma ordenada, restaurando sua integridade funcional e anatômica geralmente dentro de algumas semanas. No entanto, quando ocorrem perturbações deste processo, devido a infecções, reduzida perfusão sanguínea ou oxigenação, feridas crônicas podem surgir (KARAPANAGIOTI; ASSIMOPOULOU, 2016; LI et al., 2017). Feridas crônicas geralmente partem de pequenos cortes, iniciando o processo como feridas agudas, até que as dificuldades em concluir as fases as tornem estacionárias (MARTIN; NUNAN, 2015).

Diversos fatores tornam o manejo de ferimentos um assunto muito relevante na atualidade. A epidemia mundial de indivíduos obesos, diabéticos e acometidos por doenças cardiovasculares está fortemente ligada ao desenvolvimento de feridas crônicas, pois estes pacientes são extremamente susceptíveis a esta comorbidade e a colonização por bactérias (BJARNSHOLT et al., 2008). Além do diabetes e dos transtornos vasculares, pacientes acamados por longos períodos, recebendo radioterapia, imunodeprimidos ou malnutridos também estão mais propensos ao desenvolvimento de feridas crônicas (FRYKBERG; BANKS, 2015; GUO; DIPIETRO, 2010; PARK; BARBUL, 2004). Associado a todos estes fatores está o envelhecimento populacional. Com o atual aumento da população idosa, e conseqüentemente das doenças relacionadas a idade avançada, os problemas de cicatrização também se tornam mais prevalentes. O idoso apresenta alterações vasculares, bem como a redução no número de células responsáveis pela cicatrização, suas capacidades proliferativas e migratórias. Estas alterações características do envelhecimento, muitas vezes somadas a outras comorbidades, tornam o indivíduo idoso mais propenso ao desenvolvimento de feridas crônicas (SGONC; GRUBER, 2013).

Feridas crônicas são caracterizadas pelo insucesso em completar todas as fases fisiológicas da cicatrização de forma temporal e ordenada. Caracterizam-se por exibir intensa

infiltração inflamatória associada a um excesso de citocinas pró-inflamatórias, proteases e espécies reativas de oxigênio. Também apresentam muitas células senescentes, tecido necrótico e exsudatos, bem como a presença de infecções persistentes (FRYKBERG; BANKS, 2015; MARTIN; NUNAN, 2015). Vários autores exploram o papel controverso da inflamação. Embora seja parte integrante do processo de cicatrização, prevenindo infecções e mediando a proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais, a falha deste processo de descontaminação pode levar ao fracasso do reparo tecidual. O aumento de citocinas pró-inflamatórias em resposta a presença de toxinas microbianas pode perpetuar a fase inflamatória e aumentar o risco de desenvolvimento de ferimentos crônicos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; GUO; DIPIETRO, 2010; VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

O descontrole na inflamação pode gerar ferimentos crônicos em função do estresse oxidativo e do desequilíbrio lítico, gerado pelo influxo de EROs e enzimas proteolíticas secretadas pelos neutrófilos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; DIEGELMANN; EVANS, 2004; ROSIQUE; ROSIQUE; FARINA JUNIOR, 2015). Neste âmbito, a eliminação de espécies reativas e a restauração das defesas antioxidantes fisiológicas através da introdução de agentes antioxidantes ao tratamento (vitaminas, flavonóides, ácidos graxos poli-insaturados, etc) podem resultar em uma importante medida de recuperação (MOLNAR; UNDERDOWN; CLARK, 2014).

A natureza constitui uma fonte incomparável de medicamentos e substâncias com atividades farmacológicas. Muito antes das civilizações e indústrias se desenvolverem, ela era a única fonte de tratamento e cura para os mais diversos distúrbios. Muitos medicamentos eficazes da atualidade são derivados naturais.

Ainda assim, o uso da maioria dos produtos medicinais naturais permanece apenas no âmbito da medicina tradicional. No entanto, o grande número de descobertas científicas no campo dos produtos naturais vem aumentando a confiança de pacientes e estudiosos nas propriedades provenientes da natureza. A maioria dos agentes cicatrizantes descobertos nas últimas décadas são plantas. Da mesma forma, a quase totalidade de produtos cicatrizantes presentes no mercado possuem princípios ativos isolados de plantas estudadas com base em seus usos tradicionais. Todas estas informações reforçam a importância dos estudos etnofarmacológicos no desenvolvimento de novos medicamentos (KARAPANAGIOTI; ASSIMOPOULOU, 2016).

2.3 *Tropaeolum majus* L. E SUAS PROPRIEDADES

Tropaeolum majus L., também conhecida pelo nome capuchinha ou nastúrio, é uma planta da família Tropaeolaceae originária dos Andes Sul Americanos, adaptada ao clima temperado, solo pobre e baixa umidade. Suas folhas e flores são comestíveis, apresentando propriedades nutricionais e farmacológicas reconhecidas. *T. majus* foi levada para a Europa pelos descobridores espanhóis e logo seus usos culinários se espalharam pelo continente devido a seu sabor picante e odor pungente (nastúrio, do latim “nasturtium”, significa nariz torcido, uma referência as características organolépticas da planta). Pode ser apreciada em saladas, acompanhamentos e sopas (BALICK, 2014; LIM, 2014). Suas folhas são orbiculares, peltadas, de cor verde-azuladas e margens onduladas, sustentadas por um pecíolo inserido na região central da folha. É uma planta suculenta, rastejante ou trepadeira e suas flores são exuberantes e muito coloridas (Figura 4). As cores variam em tons de vermelho, laranja, amarelo, creme e branco (LIM, 2014; VARDHANA, 2008; ZANETTI; MANFRON; HOELZEL, 2004).

T. majus é utilizada de forma muito variada na medicina tradicional. É indicada em resfriados, como expectorante e contra doenças respiratórias. Também é utilizada contra doenças cardiovasculares e do trato urinário e reconhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, antissépticas e cicatrizantes (LIM, 2014). Ademais, é considerada estimulante e recomendada contra o escorbuto, linfedemas e caquexia (VARDHANA, 2008). Alguns especialistas recomendavam o uso de *T. majus* até mesmo como tônico capilar contra alopecia (BALICK, 2014; LIM, 2014).

Muitos de seus usos populares já foram fundamentados cientificamente. *T. majus* é considerada uma excelente fonte de vitamina C (BAZYLKO et al., 2013; GARZÓN; WROLSTAD, 2009), o que justifica sua ação antiescorbútica. Sua utilização contra doenças cardiovasculares e do trato urinário também foi apoiada em literatura, estando relacionada a presença de um flavonoide bioativo, a isoquercitrina. Este flavonoide demonstrou ação diurética, natriurética e inibitória sobre a enzima conversora da angiotensina, conferindo ao extrato de *T. majus* atividade diurética, poupadora de potássio e hipotensora (GASPAROTTO JUNIOR et al., 2009; GASPAROTTO JUNIOR et al., 2011^a, 2011b). Além disso, *T. majus* foi capaz de aumentar o tempo de coagulação sobre o plasma humano, novamente corroborando seu uso contra doenças cardiovasculares. Os flavonoides presentes no extrato foram apontados como os prováveis responsáveis por esta atividade (SANTO et al., 2007).

Outro dado interessante é a presença de ácido acetilsalicílico no óleo essencial obtido a partir das partes aéreas da planta (BUTNARIU; BOSTAN, 2011), substância muito reconhecida no âmbito farmacêutico e que, além de anti-inflamatória, é um antiagregante plaquetário que beneficia pacientes cardiovasculares (FONSECA; ALVES; PONTES, 2014). O óleo

demonstrou atividade anti-inflamatória e antimicrobiana, as quais foram atribuídas a presença de tiosulfatos, componentes que também são responsáveis pelo odor pungente e propriedades farmacológicas do alho e da cebola (BUTNARIU; BOSTAN, 2011; BENKEBLIA; LANZOTTI, 2007; BORLINGHAUS et al., 2014). A atividade anti-inflamatória também foi verificada em extratos aquosos e hidroalcoólicos de *T. majus*, desta vez relacionada a presença de compostos fenólicos e ácido ascórbico (BAZYLKO et al., 2013).

Figura 4 – Flores de *Tropaeolum majus* L. nas cores mais comumente encontradas.



Fonte: BALICK, 2014

Análises histoquímicas demonstraram a existência de várias substâncias oleosas, como óleos fixos, óleos voláteis e isotiocianatos em todas as formações parenquimáticas de *T. majus* (ZANETTI; MANFRON; HOELZEL, 2004). O benzil isotiocinato, metabólito proveniente da hidrólise do glicosinolato de benzila, apresenta propriedades antimicrobianas e antifúngicas marcantes e é considerado o principal componente do óleo desta planta. De fato, diversas atividades atribuídas a *T. majus* estão relacionadas a este componente (BONE; MILLS, 2013;

PINTÃO; PAIS, 1993). Desta maneira, este constituinte é provavelmente responsável, pelo menos em parte, pelas propriedades antissépticas culturalmente atribuídas a esta planta.

Além da atividade antimicrobiana (AIRES et al., 2009; DROBNICA et al., 1967, SELLAM et al., 2007), os isotiocianatos apresentam, efeitos anticancerígenos frente a diversos agentes indutores (WATTENBERG 1977, 1981, 1987), ação citotóxica contra várias linhagens tumorais (PINTÃO et al., 1995) e ação antiparasitária (KERMANS HAI, 2001). Em um estudo sobre os efeitos protetores contra a hepatotoxicidade do dietil maleato, o extrato metanólico de *T. majus* foi capaz de preservar a arquitetura hepática, melhorando diversos parâmetros bioquímicos no sangue e no tecido. Os resultados foram associados principalmente a presença de isotiocianatos no extrato (KORIE M; ARBID; EL-GENDY, 2010).

As flores e folhas de *T. majus* são ricas em uma gama de substâncias que podem favorecer a cicatrização e o equilíbrio fisiológico da pele. Entre elas destacam-se as antocianinas, o ácido ascórbico, os carotenoides (em especial a luteína) e os compostos fenólicos em geral. O principal benefício destes compostos está relacionado ao potencial antioxidante e anti-inflamatório (GARZÓN; WROLSTAD, 2009; NIIZU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005; BAZYLKO et al., 2013).

Os polifenóis de origem natural exibem uma gama de atividades farmacológicas e benefícios ao organismo, atuando na prevenção das mais diversas doenças, inclusive distúrbios da pele. Seu potencial protetor contra o envelhecimento, doenças inflamatórias, feridas crônicas, queimaduras e até mesmo câncer de pele já foi relatado. Estas atividades, por sua vez, estão baseadas em suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana, já demonstradas essenciais contra doenças cutâneas (DZIALO et al., 2016; LI et al., 2014).

O ácido ascórbico ou vitamina C, além de apresentar ação antioxidante e anti-inflamatória, cumpre papel crucial no processo de reparo, pois é cofator da síntese do colágeno. Esta vitamina estabiliza a estrutura das fibras e aumenta a força tênsil do colágeno recém-formado (COLLINS, 2009). Recentemente, pesquisadores comprovaram que a vitamina C age de forma complexa e temporal sobre a cicatrização, não apenas promovendo a deposição de colágeno, mas também reduzindo mediadores inflamatórios, induzindo genes promotores da cicatrização e afetando a progressão do processo como um todo (MOHAMMED et al., 2016).

Carotenoides como a luteína apresentam vastas atividades biológicas, atuando como pró-vitamina A, participando de diversas vias de sinalização celular e protegendo a pele e a retina contra danos foto-oxidativos. Além de sua ação antioxidante, capaz de capturar espécies reativas de oxigênio, os compostos desta família atuam como filtros contra radiação solar,

prevenindo a degeneração macular e cutânea (ROBERTS; GREEN; LEWIS, 2009; STAHL; SIES, 2005).

O fato de *T. majus* ser reconhecida como uma planta comestível há séculos já é um indício de sua baixa toxicidade. Ainda assim, estudos de toxicidade aguda e subcrônica já foram conduzidos, verificando a segurança e baixa toxicidade de extratos obtidos a partir de *Tropaeolum majus* (ZANETTI et al., 2003; GOMES et al., 2012). De fato, com a administração do extrato etanólico 70% de *T. majus* não foi verificada toxicidade aguda em ratos mesmo na dose de 5000 mg/Kg (ZANETTI et al., 2003). Estes dados são essenciais para que eventualmente seja feita a utilização farmacológica de *T. majus*, valendo-se de suas propriedades benéficas sem oferecer riscos aos usuários.

Porém, podem haver ressalvas com relação ao consumo das sementes ou frutos desta planta. Estes podem ser consumidos em conserva substituindo alcaparras (B BALICK, 2014; VAN WYK; 2013), mas apenas em pequenas quantidades (PRANCE; NESBITT, 2005). Além de possuírem efeitos purgativos (VARDHANA, 2008), os frutos de *T. majus* apresentam características únicas. Embora as sementes contidas nas vagens contenham baixo teor em óleo, este é um dos mais abundantes em ácido erúcido no reino vegetal, podendo atingir um conteúdo de até 80% (CARLSON; KLEIMAN,1993). O ácido erúcido é conhecido por sua cardiotoxicidade em ratos (McCUTCHEON et al., 1976). Essa toxicidade pode ser aumentada na presença de outro agente cardiotoxíco (BOZCALI et al., 2009). Os mecanismos por trás das alterações miocárdicas não estão esclarecidos, e estas podem estar relacionadas não ao ácido erúcido em si, mas ao desequilíbrio na composição de ácido graxos em espécies ricas neste lipídio (HULAN et al., 1975). Muito embora após a ingestão de ácido erúcido este possa ser encontrado no plasma e incorporado a tecidos, não existem evidências das consequências do consumo a longo prazo em humanos (LARYEA et al., 1992).

Ainda assim, pode haver interesse farmacológico sobre as sementes de *T. majus*, especialmente com relação à cicatrização. Em um estudo recente, a xiloglucana presente nas sementes de *T. majus* foi isolada e testada. Ficou provado que esta substância atua por mecanismos específicos para ativar a diferenciação dos queratinócitos, aumentando a expressão de genes da diferenciação e inibindo a fosforilação do receptor do fator de crescimento epidermal (ZACHARSKI et al., 2015). No entanto, a atividade das xiloglucanas não está restrita aos queratinócitos. Estas foram capazes de influenciar a atividade de fibroblastos também, beneficiando tanto reepitelização como remodelamento. É provável que estas hemiceluloses afetem a proliferação e migração de várias células (NIE; DETERS, 2013).

Todos estes dados indicam que *Tropaeolum majus* tem um grande potencial farmacológico e nutricional. Sem dúvida, muitas das atividades desta planta permanecem ainda inexploradas ou pouco esclarecidas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a capacidade cicatrizante de *Tropaeolum majus* L. em ratos Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato hidroalcoólico (70%) liofilizado das partes aéreas (flores e folhas) de *T. majus*.
- Incorporar o extrato obtido a uma formulação tópica do tipo creme.
- Realizar a análise fitoquímica do extrato em HPLC e determinar compostos fenólicos e flavonoides totais no extrato, relacionando sua composição aos resultados obtidos.
- Conhecer a capacidade antioxidante do extrato por meio do sistema β -caroteno/ácido linoleico.
- Realizar um protocolo cirúrgico para indução de ferimentos de segunda intenção.
- Avaliar bioquimicamente as modificações no balanço oxidativo do ferimento (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, catalase, superóxido dismutase) provocadas pelo tratamento com a formulação contendo extrato de *T. majus*.
- Investigar e acompanhar ao longo do tempo a retração e as modificações microestruturais das feridas através de análises morfológicas.

4 METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo a metodologia, os resultados e a discussão estão organizados sob a forma de um manuscrito científico submetido a revista *Ethnopharmacology*, organizado de acordo com as normas da mesma.

5 ARTIGO

***Tropaeolum majus* L. hydroethanolic extract improves wound healing in rats**

Marina de Souza Vencato^a, Gabriele Cheiran Pereira^a, Karen Luise Moreira^a, Juliana Calil Brondani^b, Érika Pase Londero^c, Maria Amália Pavanato^c, Melânia Palermo Manfron^b, Marcelo Leite da Veiga, Maria Izabel de Ugalde Marques da Rocha^{a*}.

^aDepartment of Morphology, Federal University of Santa Maria, Roraima Avenue, 1000, building 19, room 3208, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^bDepartment of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Roraima Avenue, 1000, building 26, Camobi, CEP 97105-900 Santa Maria, RS Brazil

^cDepartment of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Roraima Avenue, 1000, building 21, Camobi, CEP 97105-900 Santa Maria, Brazil

*correspondence to: Department of Morphology, Federal University of Santa Maria, Roraima Avenue, 1000, building 19, room 3208, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.
Fone number: 55 55 32209560. E-mail address: bebelugalde@gmail.com

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Tropaeolum majus* L. is an edible plant native from the South American Andes, popularly known as nasturtium. It presents several uses in traditional medicine; still, only a few of these uses have been scientifically supported.

Aim of the study: To identify chemical components in the hydroethanolic extract obtained from *Tropaeolum majus* aerial parts and evaluate the antioxidant capacity and wound healing potential of this plant.

Materials and methods: Major phenolic composition of the extract was accessed through HPLC. Colorimetric methods were used to determine total phenolics, total flavonoids and antioxidant capacity. Animals were surgically wounded and treated daily with base emulsion, emulsion containing *T. majus* extract at 1% or emulsion containing allantoin at 1%. Skin wound samples were removed on days 3, 7, and 14 after surgery and destined to biochemical and morphological analyses.

Results: Chlorogenic acid and rutin were identified as the major phenolic compounds in the extract. *T. majus* extract demonstrated elevated phenolic (24,4%) and flavonoid (3,82%) content combined to strong antioxidant capacity. Wounds treated with *T. majus* extract showed improved oxidative status, re-epithelization, organization of dermal connective tissue, deposition of type I collagen, increased fibroblasts at wound site and decreased inflammation. These results have overcome the benefits of allantoin to wound healing.

Conclusions: Our results indicate that *T. majus* has relevant wound healing properties, presumably related to antioxidant, anti-inflammatory and stimulatory properties inherent to its phenolic constituents.

Key words: nasturtium; phenolic content; repair; skin

1. Introduction

The skin is the largest organ of the human body. Its integrity is fundamental to preserve its essential functions. It protects the organism from harmful environmental agents, prevents water loss, promotes thermal regulation, and plays immune, sensorial, and endocrine roles (Rosique et al., 2015; Sorg et al., 2017). It presents two major layers: epidermis, constituted mainly by several strata of keratinocytes engaged to a complex progressive process of differentiation and cell renewal; and dermis; the adjacent connective tissue that sustains epidermis. Several cell types such as keratinocytes, melanocytes, Langerhans cells, and fibroblasts indwell in this organ, maintaining balance and ensuring the accomplishment of all its functions. (Menon, 2002; Mclafferty et al., 2012; Hänel et al., 2013)

Any damage that determines the interruption of this fundamental protective barrier will trigger a series of highly regulated cellular and biochemical events to restore its integrity in a process named skin wound healing (Park and Barbul, 2004). Wound healing is a complex integrated multiphase event that results from the self-regenerative capacity demonstrated by all living beings. It involves the liberation of a myriad of chemical mediators responsible for orchestrating and regulating wound repair (Balbino et al., 2005; Sorg et al., 2017).

Inflammation plays a controversial role in wound repair. Despite its function as integrating part of this process, promoting wound healing and preventing infections, failure during this stage may result in chronic wounds. These wounds become stationary, abnormally inflamed, present oxidative and latic instability and are often infected (Frykberg and Banks, 2015; Martin and Nunan, 2015). Consequently, the restoration of physiological defenses

through the introduction of antioxidant and anti-inflammatory agents to the treatment may be an important strategy for recovery.

Tropaeolum majus L., commonly known as nasturtium, is an edible plant original from the South American Andes. It belongs to the Tropaeolaceae family and has recognized nutritional and pharmacological properties. It is employed in many ways by the popular medicine: against scurvy, inflammations, constipation, urinary tract, cardiovascular and respiratory conditions, and as a wound healing agent (Lim, 2014; Vardhana, 2008). *T. majus* presents antitumoral and antimicrobial properties related to the presence of isothiocyanates already mentioned in literature (Aires et al., 2009; Sellam et al., 2007; Wattenberg, 1981; Zanetti et al., 2004). Moreover, different uses of *T. majus* in folk medicine, as in the treatment of cardiovascular disorders and disturbs of the urinary tract, have already been scientifically justified. (Gasparotto et al., 2009; Gasparotto et al., 2011a, 2011b). Therefore, the aim of this study was to investigate the wound healing potential of *T. majus* using an in vivo experimental model.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

Tropaeolum majus L. aerial parts (leaves and flowers) were collected in Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brazil) in April 2015 (coordinates 29°41'38,3"S and 53°47'57,1"W). The plant was identified and authenticated by Prof. Renato A. Záchia, botanist of the Federal University of Santa Maria. A voucher specimen is deposited in the herbarium of the Biology department of this institution (No. SMDB 16100).

2.2 Obtainment of the extract

The aerial parts of *T. majus* were powdered in a knife mill after dried in a circulating air oven. Crude extract was obtained by maceration of the powder in ethanol 70% at room temperature until the complete depletion of the plant. The macerate was filtered and concentrated in a rotary evaporator Buchi RII, lyophilized and stored under refrigeration.

2.3 Phytochemical characterization

Using a High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array detector (HPLC-DAD), major polyphenolic constituents of the crude extract of *T. majus* were analyzed, following the method described by Evaristo and Leitão (2001) with slight modifications. A Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a pump model LC-20AT, SPD-M20A diode array detector and communicator 20A and CBM controlled by software LC SP1 was used to perform the reverse phase chromatographic analyses under gradient conditions. The analytical column used was a C18 packed with 5 μm diameter particles, dimensions of 4.6 mm x 150 mm. The elution flow rate was 0.9 mL/min, using two mobile phases: A, consisting of 2% acetic acid in water and, B, using only methanol UV/HPLC. The injection volume was 40 μL and the photodiode array detection system for wavelengths between 230-400 nm for 55 minutes. The polyphenols identification was achieved by comparing the retention time and UV absorption spectrum of the samples to the standards solutions. The quantified concentrations of the substances were calculated from the equation of the line and results were expressed in equivalent milligrams of each pattern for each gram of the extract.

2.4 Determination of total phenols and flavonoids

Spectrophotometric quantification of secondary metabolites was also performed in the extract. Total phenolic compound content was determined according to the Folin-Ciocalteu reagent method and the results were expressed in equivalent gallic acid milligrams per gram of dried extract (Georgé et al., 2005). For the quantification of flavonoids rutin was used as a standard and aluminium chloride solution as a color reagent according to Zhishen et al. (1999). Total flavonoid content was calculated in equivalent rutin milligrams per gram of dried extract.

2.5 β -carotene bleaching assay

The antioxidant capacity of the extract was determined by β -carotene bleaching assay (Mokbel and Hashinaga 2006). Butylated hydroxytoluene (BHT) was used as a positive control. The results were expressed in percentage of inhibition of linoleic acid oxidation (OI).

2.6 Experimental animals

Fifty-four male albino Wistar rats were obtained from Central Animal Facility of the Federal University of Santa Maria and kept during the entire protocol at the animal facility of the Department of Physiology and Pharmacology in the same institution. The animals were maintained under standardized conditions (23° C±1, 12 h light/dark cycle) inside polypropylene cages (40×33×16 cm of dimension, four individuals per cage) and had free access to water and commercial food. All procedures performed in this experiment were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of Federal University of Santa Maria (CEUA No. 2732220616). The animals remained acclimatizing during 7 days before the beginning of the experimental protocol.

2.7 Surgical procedure

The surgical procedure was adapted from Melo et al. (2011). All animals were previously anesthetized by ketamine (90 mg/Kg, ip) and xylazine (10 mg/Kg, ip) and had the upper back trichotomized. After disinfection of the shaved area with chlorhexidine 2%, it was proceeded with the removal of circular skin patch using surgical scissors and tweezers. To ensure homogeneity in wound sizes and guide the incision a stamp was made in the back of all animals with the nozzle of a tube. All incisions had full thickness until the exposure of the muscle fascia. Pain management after surgery was accomplished through daily intraperitoneal injection of tramadol, 12,5mg/Kg, during 4 days (including the surgery day).

2.8 Experimental design and treatments

The animals were allocated in three general groups (n=18) as described:

Control Group (CG): negative control animals treated with a base emulsion with no active substances incorporated.

Allantoin Group (AG): positive control animals treated with allantoin (1%) incorporated to the emulsion base.

Tropaeolum majus group (TG): animals treated with *T. majus* extract (1%) incorporated to the base emulsion.

The use of allantoin in this experiment as a positive control is based on the work of Flores and co-workers (2014). Nevertheless, the proliferative properties of alantoin have leded

to its use as positive control in many other wound healing studies, in vivo and in vitro (Affonso et al., 2016; Araújo et al., 2012; Yamane et al., 2016; Syarina et al., 2015). Aiming a fair comparison and attempting to avoid bias comparing results between groups, the same concentration of allantoin was also employed for *T. majus* extract.

Animals were treated every morning around the same time, from the first day after the surgical procedure (day 1) to the euthanasia day. The volume of emulsion considered optimal to completely cover the wound area was 0.3 mL. This volume was previously measure in a syringe to ensure homogeneity in the quantity of emulsion applied to the wounds. For all the mentioned groups euthanasia of the animals and sample collection happened in three different moments: on the 3rd, 7th and 14th day after the surgical procedure (day 0). The animals were euthanized by isoflurane overdose and wound samples were removed and destined for biochemical and morphological analyses.

2.9 Biochemical analyses

The biochemical tests aimed to determine oxidative status of wounds using homogenized skin samples. The concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and the activity of the enzymes catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD), were determined according to literature (Boveris and Chance, 1973; Buege and Aust, 1978; Fridovich, 1974). Due to limitations related to sample quantity, biochemical analyses received skin portions only from days 3 and 7. These are also the most significant days to be investigated regarding the oxidative stress.

2.10 Morphological analyses

2.10.1 Wound contraction

Photographic records of wounds were taken during anesthesia at the day of the surgical procedure (day 0) and at days of euthanasia (days 3, 7, and 14), using a digital camera (Sony[®] Cyber-shot, DSC-W80, 7.2 MP) connected to a tripod. The images were analyzed using the software Image J[®] (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2009) to determine the area of each wound by tracing the wound margin. The results are expressed in terms of percentage of decrease of the

initial wound area according to the following equation (Avsar et al., 2016): Wound contraction (%) = [(initial wound size – final wound size)/initial wound size]×100.

2.10.2 Histological analyses

After collected, skin samples were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours before undergoing routine histological treatment (dehydration in increasing concentrations of ethanol, diaphanization in xylene, and paraffin embedding). Paraffin embedded material was sectioned in manual rotatory microtome (Easy Path[®]). Sections (6 µm thick) were obtained from each sample and stained by two different methods: Masson's trichrome stain modified by Goldner (Goldner, 1938) and Picrosirius staining technique (Junqueira et al., 1979).

Sections stained by the trichrome method were semi-quantitatively evaluated by a trained histologist according to the presence of granulation tissue, new-formed vessels (angiogenesis), re-epithelization, fibroblasts, inflammatory cells, and degree of organization of dermal connective tissue. A scoring system with 4 criteria described by Gál et al. (2009) was used. Sections stained by Picrosirius were microphotographed under polarized illumination using a digital camera (Opton[®], 10.0 MP) coupled to a light microscope (Olympus[®], design CX40). The camera functions were controlled and configured by the interfaced software IS Capture[®]. Photomicrographs were analyzed using the software Image J[®] to quantify type I collagen. The results were expressed in percentage of collagen per area.

2.11 Statistical analysis

Statistics were performed by the software Graph Pad Prism. Data obtained in this study were investigated by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post-hoc test in order to observe differences among groups and the evolution of wounds through time. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Extract analyses

HPLC analysis of the extract demonstrated the presence of two major peaks in the chromatogram, identified as chlorogenic acid and rutin (Fig. 1), according to comparison with

parameters such as peak shape, retention time and maximum UV absorption of standards. The concentration of chlorogenic acid and rutin in the dried extract were 22.79 mg/g (2.27% w/w) and 32.37 mg/g (3.23% w/w), respectively.

Spectrophotometric analyses employed for further phytochemical characterization demonstrated a total polyphenol content of 244.4 ± 4.7 mg/g as gallic acid equivalents (24.4%). The total flavonoid content was 38.2 ± 0.88 mg/g as rutin equivalents (3.82%).

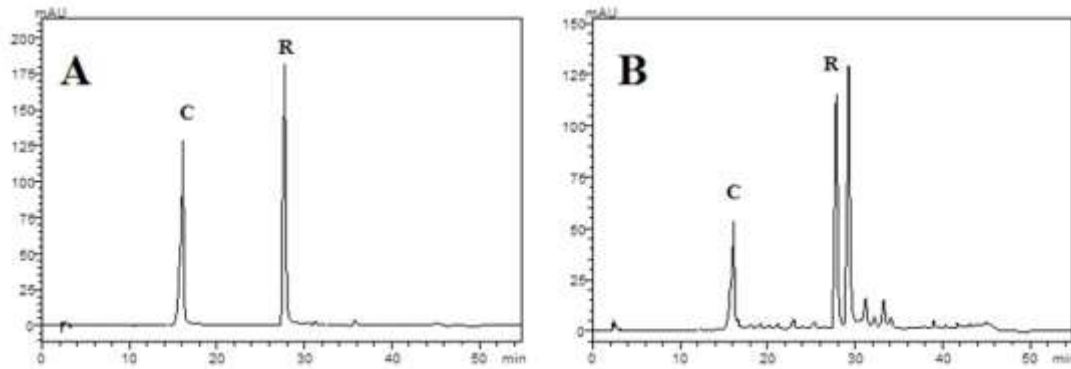


Fig. 1 HPLC chromatograms of standards (A) and hydroethanolic extract (70%) of *T. majus* (B), where C corresponds to chlorogenic and R corresponds to rutin.

The antioxidant capacity of the extract was consistent with the standard at the first two concentrations. Only at the concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$ *T. majus* demonstrated lower antioxidant capacity than BHT (Table 1).

Table 1

Antioxidant capacity of the extract (β -carotene bleaching)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	OI BHT (%)	OI <i>T. majus</i> (%)
12.5	24.16	25.50
25	40.83	38.24
50	70	43.07

OI=oxidation inhibition; BHT= Butylated hydroxytoluene

3.2 Biochemical analyses

Biochemical parameters demonstrated differences between groups for parameters TBARS and SOD. TG had lower TBARS levels than CG on day 3 and higher SOD levels on

day 7 compared to CG and AG. AG presented lower SOD levels on day 3 compared to other groups. No significant differences were found for the activity of CAT. The results for biochemical and morphological analyses are presented in Fig. 2.

3.3 Morphological analyses

Allantoin treated animals showed a greater re-epithelization index compared to the other groups on the 7th day of wound healing, demonstrating also marked acceleration of the process through time. TG demonstrated better results on day 14, with wounds statistically more re-epithelized than the CG. Moreover, all groups exhibited the expected temporal evolution.

Regarding the presence of inflammation, TG had less inflammatory cells at the wound site than the AG at the 7th day, and less inflammatory cells than both CG and AG at the 14th day. Until the end of the protocol, all groups demonstrated the expected reduction of inflammation; however, for TG this decrease happened faster compared to other groups. This behavior happened in a distinct opposite way for the quantification of fibroblasts. TG had more fibroblasts at the wound site than AG and CG on day 7, and more fibroblast than CG on day 14. Conversely, TG had the most marked increase in fibroblastic proliferation through time. Concerning to the connective tissue organization TG demonstrated enhanced collagen maturation on day 3 compare to CG and AG. On day 14 both AG and TG had higher scores for this parameter when compared to CG. All groups showed the expected improvement in collagen organization through time.

For the quantification of type I collagen through the picrosirius staining, the results were similar. Both TG and AG differed from CG at the last day of protocol. Moreover, through this evaluation, the evolution of CG was not statistically perceived. For the groups allantoin and *T. majus* the increased presence of collagen was noticed only on day 14.

For wound contraction, no statistical differences were perceived. Temporally, all groups evolved similarly. No significant differences were found as well for the parameters granulation tissue and newformed vessels. The most important morphological findings encountered in this study are presented in Fig. 3.

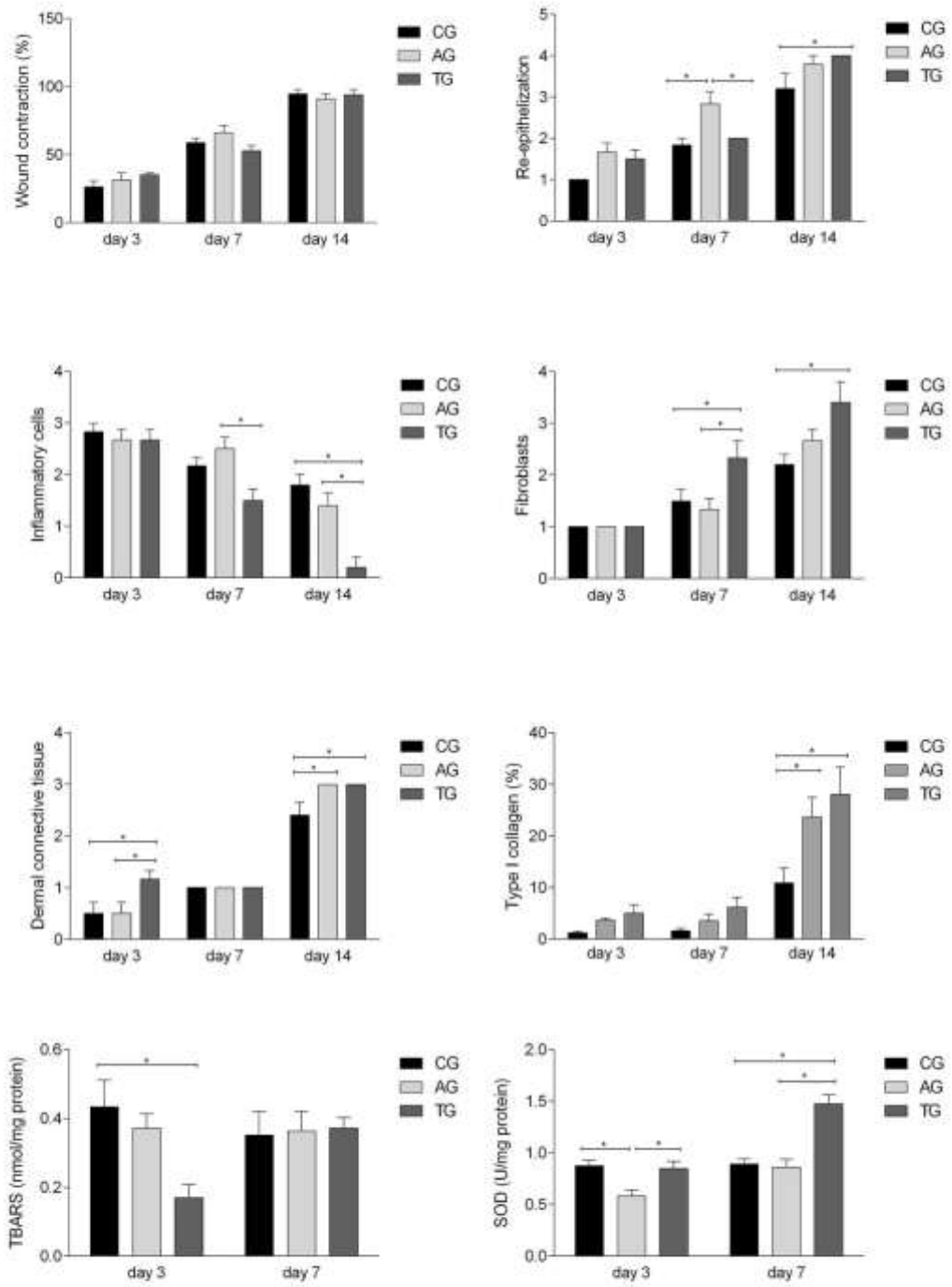


Fig. 2 Results for morphological and biochemical analyses at different moments of wound healing (*p<0.05).

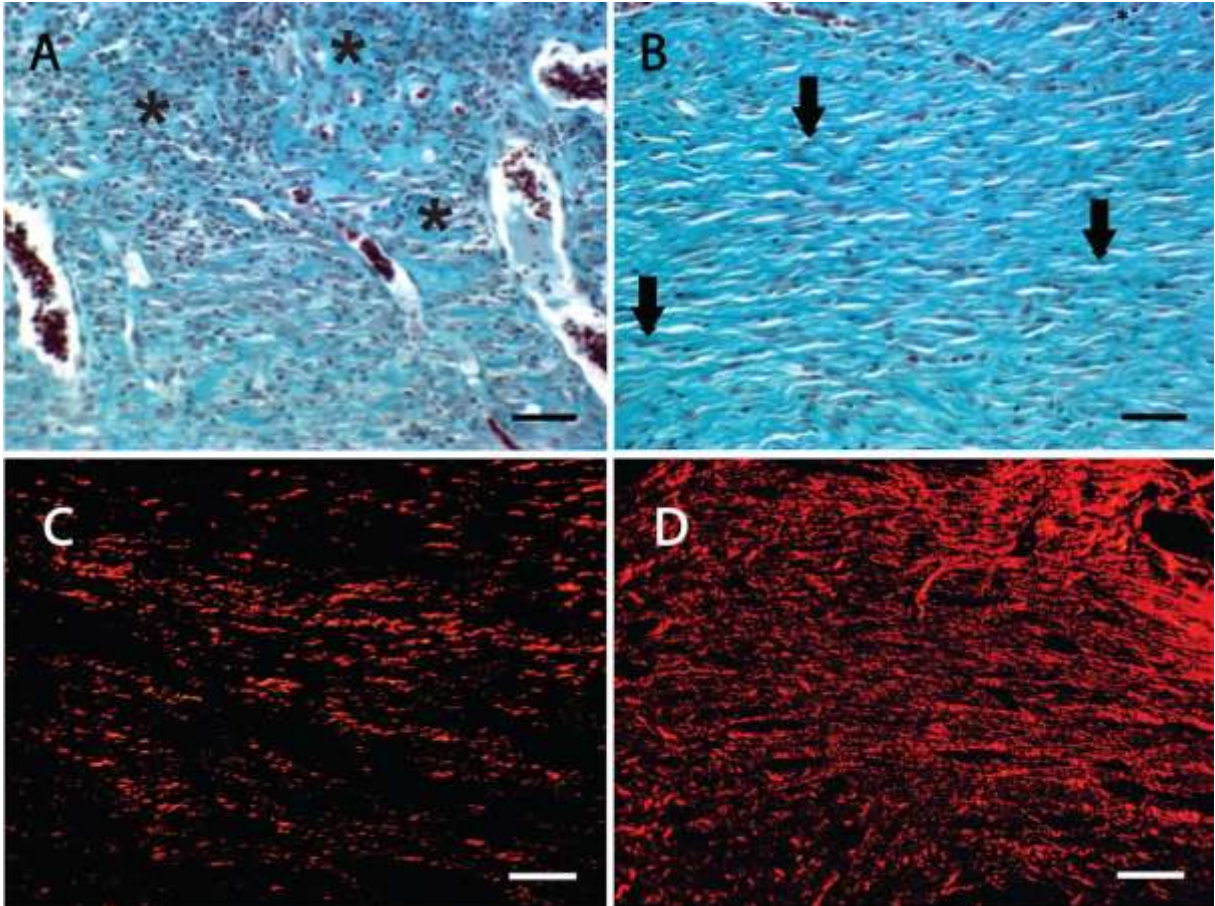


Fig. 3 Photomicrographs of main histological findings on day 14. Dermal connective tissue and granulation tissue at the wound site are in evidence (A and B). Asterisks represent predominance of inflammatory cells on CG (A) and arrows represent predominance of fibroblasts (elongated cells) on TG (B). The intensity of the staining (green color, trichrome staining) and organization of collagen fibers denoting organization of dermal connective tissue is also notorious on TG. Picosirius stained sections under polarization (C and D) demonstrate type I collagen in red to yellow birefringency. TG (D) showed more collagen per area compared to CG (C). Scale bar for comparison: 50 μ m (A, B) and 100 μ m (C, D)

4. Discussion

Literature attests the presence of plenty natural important substances in *T. majus* aerial parts, such as anthocyanins, flavonols, ascorbic acid, and carotenoids (Bazytko et al., 2013; Garzón and Wrolstad, 2009; Niizu and Rodriguez-Amaya, 2005). *T. majus* extract employed in this study presented high phenolic content (24.4%) when compared to extracts of several fruits and plants widely known for its antioxidant properties and abundance of polyphenols (Syta et al., 2016; Tawaha et al., 2007; Velioglu et al., 1998). Even higher contents were found in the flowers of *T. majus* (Garzón and Wrolstad, 2009). The total content of phenolic compounds and flavonoids was compatible with the content present in extracts obtained from *Camelia sinensis*, a plant rich in polyphenols and recognized for its remarkable properties (Chan et al., 2011;

Izzreen and Fadzelly, 2013). These properties include benefits to wound healing as presented in literature (Asadi et al., 2013; Hajiaghaalipour et al., 2013).

A study carried by Bazylo and co-workers (2013) with *T. majus* extracts found results partially different for HPLC composition, but confirms the presence of chlorogenic acid, one of major compounds of the extract in this study. Yet, it is important to mention that the content of metabolites obtainable in a plant material variate according to innumerable factors that involve extraction methods, climate, seasons and soil conditions (Boyer and Liu, 2004; Lobstein et al., 1991; Rusak et al., 2008).

Allied to its prominent phenolic content, *T. majus* demonstrated elevated antioxidant capacity in β -carotene bleaching assay, consistent with the standard used in most of the concentrations. In fact, extracts tested hardly reach the standards antioxidant capacity, and the highest antioxidant activity seems to be associated with great amounts of polyphenols (Velioglu et al., 1998 Amessis-Ouchemoukh et al., 2014). Greater amounts of phenolic compounds and flavonoids in extracts seem to be also related to superior wound healing performances (Agar et al., 2015; Akkol et al., 2011).

Moreover, the combination of this findings may be responsible for the decrease of TBARS levels TG on day 3, followed by increase of SOD, that happened only on day 7 and was not accompanied by changes in CAT. Organisms are complex systems and the enzymatic responses to stress modifications may not be immediate or followed by all biomarkers. Even in some cases, responses to oxidative stress may not necessarily be related to reduction in all enzymatic defenses (Nadeem et al., 2003), proving these alterations may not be so predictable.

Rutin, the most important glycoside derived from quercetin, and chlorogenic acid, part of the hydroxycinnamic acid group, are the major phenolic compounds found in *T. majus* extract. They occur in several vegetables and fruits and are probably among the phenolics mostly consumed by the population. Its protective effects are reported for several diseases like diabetes, gastrointestinal or hepatic disturbs, hypertension, and metabolic syndrome (Garambone and Rosa, 2007; Hosseinzadeh and Nassiri-Asl, 2014, Santana-Gálvez et al., 2017). The benefits of chlorogenic acid oral and topical administrations have also been explored in wound healing protocols, improving oxidative parameters, epithelization, matrix deposition and upregulating repair mediators (Bagdas et al., 2014; Bagdas et al., 2015; Chen et al., 2013). Rutin has also been successfully tested in wound healing protocols, encouraging the creation of pharmaceutical formulations that enhance this property (Almeida et al., 2012; Tran et al., 2011).

A study carried with *Calendula officinalis* extract found interesting results, such as stimulation of human dermal fibroblasts proliferation and migration, and upregulation of

growth factors related to connective tissue (Dinda et al., 2016). These discoveries were connected to the presence quercetin glycosides, specially rutin, also present in *T. majus*. The present study also proved benefits of *T. majus* to connective tissue formation that probably result from stimulation to signaling pathways of its synthesis. Besides, many other wound healing protocols were conducted with the use of several extracts rich in chlorogenic acid, rutin, and phenolic substances. Effects such as improvement in fibroblastic function, increase of collagen accumulation and its indicative parameters, increment of important chemical signaling mediators, anti-inflammatory, and antioxidant properties were observed (Duque et al., 2016; Joshi et al., 2016; Süntar et al., 2010). These findings corroborate with the present work, suggesting the role of *T. majus* phenolic content present in the extract on stimulus to fibroblast multiplication, matrix synthesis, antioxidant, and anti-inflammatory properties.

Wound healing is a complex process composed of four overlapping phases. At the first moments, hemostatic responses activate platelet aggregation and coagulation, which leads to recruitment of leucocytes in the inflammatory phase and stimulate the cellular multiplicative events that distinguish the proliferative phase. Innumerable growth factors and cytokines participate of this process, promoting angiogenesis, re-epithelization, activation of fibroblasts, and granulation tissue formation. Remodeling phase is marked by type I collagen deposition, scar formation, apoptosis of granulation tissue, and slow reorganization of collagen fibers (Guo and DiPietro, 2010; Velnar et al., 2009). The present experiment explores three different wound healing moments in an attempt to contemplate all wound healing phases and all its main events.

Wound contraction is often related to progress in re-epithelization. Even though there were no differences among groups for that parameter, our histological results for re-epithelization cannot be discarded. Scab was present in all animals until the 7th day, even when the bridging of epithelium migrating edges had already happened. Therefore, the migration of keratinocytes continues under the scab. In fact, only after epithelium bridge is complete, enzymatic responses are activated to mediate scab detachment (Diegelmann and Evans, 2004).

In this study allantoin evidenced expected results at the concentration of 1%, with improvement of parameters related to matrix synthesis and accelerated epithelization, which reached marked progress at the proliferative phase (represented on day 7). This is in agreement with the stimulatory properties of allantoin on cell proliferation and extracellular matrix production suggested in literature. Still, allantoin did not demonstrate benefits to oxidative status and histological inflammatory profile, despite its modulation of oxidative and inflammatory responses also described. Howsoever, the understanding over mechanisms

underlying the activities attributed to allantoin is still deficient. (Araújo et al., 2010; Shestopalov et al., 2006).

T. majus seeds have been related to wound healing potential due to the presence of xyloglucans with stimulatory effects on keratinocyte differentiation (Zacharski et al., 2015). In this study *T. majus* extract at the same concentration as allantoin demonstrated wound healing potential. These results were superior to those found for allantoin. It evidenced antioxidant properties and revealed not only improved epithelization and extracellular matrix deposition, but also promoted contrasted increase of fibroblasts and decrease of inflammatory cells. Even though the results for connective tissue organization and type I collagen determination were not exactly the same at day 3, this discrepancy can be explained by the non-specificity of the staining technique used for evaluating the histological parameters; therefore, other synthesized matrix elements, such as elastin or proteoglycans were probably evaluated along with the new formed collagen fibers.

T. majus extracts have already been tested *in vivo* in acute and subchronic toxicity protocols. No signs of toxic effects were found in both cases (Gomes et al., 2012; Zanetti et al., 2003). Although more studies are needed to ensure the safety in the use of *T. majus* extracts, these results are important to enable its possible pharmacological applications.

5. Conclusion

With the present research, we confirm *Tropaeolum majus* L. wound healing potential. *T. majus* extract improved re-epithelization and oxidative status, reduced inflammation, increased collagen deposition and fibroblasts at the wound site. These activities seem to be related to high levels of polyphenols and may suggest pharmaceutical applications for this plants' extract.

Acknowledgments

The authors acknowledge CAPES/Brazil for financial support and Rafaela Cheiran Pereira for help with the graphic art.

References

- Aires, A., Mota, V.R., Saavedra, M.J., Rosa, E.A.S., Bennett, R.N., 2009. The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 106 (6), p. 2086–2095.
- Affonso, R.C., Voytena, A.P., Fanan, S., Pitz, H., Coelho, D.S., Horstmann, A.L., Pereira, A., Uarrota, V.G., Hillmann, M.C., Varela, L.A., Ribeiro-do-Valle, R.M., Maraschin, M., 2016. 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.* <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1923754>.
- Agar, O.T., Dikmen, M., Ozturk, N., Yilmaz, M.A., Temel, H., Turkmenoglu, F.P., 2015. Comparative studies on phenolic composition, antioxidant, wound healing and cytotoxic activities of selected *Achillea* L. species growing in Turkey. *Molecules.* 20 (10), 17976–18000.
- Akkol, E.K., Acikara, O.B., Süntar, I., Citoglu, G.S., Keles, H., Ergene, B., 2011. Enhancement of wound healing by topical application of *Scorzonera* species: Determination of the constituents by HPLC with new validated reverse phase method. *Ethnopharmacol.* 137 (2), 1018–1027.
- Almeida, J.S., Benvegnú, D.M., Boufleur, N., Reckziegel, P., Barcelos, R.C., Coradini, K., Carvalho, L.M., Bürger, M.E., Beck, R.C., 2012. Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 38 (7), 792–799.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P.L.V., Serralheiro, M.L., Araújo, M.E.M., 2014. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Ind. Crop. Prod.* 53, 6–15.
- Araújo, L.U., Grabe-Guimarães, A., Mosqueira, V.C., Carneiro, C.M., Silva-Barcellos, N.M., 2010. Profile of wound healing process induced by allantoin. *Acta Cir. Bras.* 25 (5), 460–466.
- Araújo, L.U., Reis, P.G., Barbosa, L.C., Saúde-Guimarães D.A., Grabe-Guimarães A., Mosqueira, V.C., Carneiro, C.M., Silva-Barcellos, N.M., 2012. In vivo wound healing effects of *Symphytum officinale* L. leaves extract in different topical formulations. *Die Pharmazie.* 67 (4), 355–360.
- Asadi, S.Y., Parsaei, P., Karimi, M., Ezzati, S., Zamiri, A., Mohammadzadeh, F., Rafieian-kopae, M., 2013. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on healing process of surgical wounds in rat. *Int. J. Surg.* 11 (4), 332–337.
- Avsar, U., Halici, Z., Akpınar, E., Yayla, M., Avsar, U., Harun, U., Harun, U., Tarik A.H., Bayraktutan, Z., 2016. The Effects of Argan Oil in second-degree burn wound healing in rats. *Ostomy Wound Manag.* 62 (3), 26–34.

- Bagdas, D., Etoz, B.C., Gul, Z., Ziyank, S., Inan, S., Turacozen, O., Gul, N.Y., Topal, A., Cinkilic, N., Tas, S., Ozyigit, M.O., Gurun, M.S., 2015. In vivo systemic chlorogenic acid therapy under diabetic conditions: Wound healing effects and cytotoxicity/genotoxicity profile. *Food Chem. Toxicol.* 81, 54–61.
- Bagdas, D., Gul, N.Y., Topal, A., Tas, S., Ozyigit, M.O., Cinkilic, N., Gul, Z., Etoz, B.C., Ziyank, S., Inan, S., Turacozen, O., Gurun, M.S., 2014. Pharmacologic overview of systemic chlorogenic acid therapy on experimental wound healing. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 387 (11), 1101–1116.
- Balbino, C.A., Pereira, L.M., Curi, R., 2005. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Braz. J. Pharm. Sci.* 41 (1), 27–51.
- Bazytko, A., Granica, S., Filipek, A., Piwowarski, J., Stefańska, J., Osińska, E., Kiss, A.K., 2013. Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. *Ind. Crop. Prod.* 50, 88–94.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 134, 707–716.
- Boyer, J., Liu, R.H., 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J.* 3 (5), 1–15.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method. Enzymol.* 52, 302–309.
- Chan, E.W.C., Soh, E.Y., Tie, P.P., Law, Y.P., 2011. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Res.* 3 (4), 266–272.
- Chen, W.-C., Liou, S.S., Tzeng, T.F., Lee, S.L., Liu, I.M., 2013. Effect of topical application of chlorogenic acid on excision wound healing in rats. *Planta Med.* 79 (8), 616–621.
- Diegelmann, R.F., Evans, M.C., 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front. Biosci.* 9, 283–289.
- Dinda, M., Mazumdar, S., Das, S., Ganguly, D., Dasgupta, U.B., Dutta, A., Jana, K., Karmakar, P., 2016. The water fraction of *Calendula officinalis* hydroethanol extract stimulates in vitro and in vivo proliferation of dermal fibroblasts in wound healing. *Phytother. Res.* 30 (10), 1696–1707.
- Duque, A.P.N., Pinto, N.C., Mendes, R.F., Silva J.M., Aragão, D.M., Castañon, M.C., Scio, E., 2016. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. *J. Pharm. Pharmacol.* 68 (1), 128–138.
- Evaristo, I.M., Leitão, M.C., 2001. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana.* 9 (2), 135–141.
- Flores, F.C., Lima, J.A., Silva, C.R., Benvegnú, D., Ferreira, J., Burger M.E., Beck, R.C.R., Rolim, C.M.B., Rocha, M.I.U.M., Veiga, M.L., Silva, C.B., 2014. Hydrogels containing

nanocapsules and nanoemulsions of Tea Tree Oil provide antiedematogenic effect and improved skin wound healing. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 1–10.

Fridovich, I. Superoxide and evolution. *Horiz. Biochem. Biophys.* v.1, p. 1-37, 1974.

Frykberg, R.G., Banks, J., 2015. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv. Wound Care.* 4 (9), 560–582.

Gál, P., Toporcer, T., Grendel, T., Vidová, Z., Smetana, K.Jr., Dvoránková, B., Gál, T., Mozes, S., Lenhardt, L., Longauer, F., Sabol, M., Sabo, J., Backor, M., 2009. Effect of *Atropa belladonna* L. on skin wound healing: Biomechanical and histological study in rats and in vitro study in keratinocytes, 3T3 fibroblasts, and human umbilical vein endothelial cells. *Wound Repair and Regen.* 17 (3), 378–86.

Garambone, E., Rosa, G., 2007. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. *Alimentos e Nutrição*, 18 (2), p. 229–235.

Garzón, G.A., Wrolstad, R.E., 2009. Major anthocyanins and antioxidant activity of *Nasturtium* flowers (*Tropaeolum majus*). *Food Chem.* 114, 44–49.

Gasparotto, A.Jr., Boffo, M.A., Lourenço, E.L., Stefanello, M.E., Kassuya, C.A., Marques, M.C., 2009. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (Tropaeolaceae) in rats. *J. Ethnopharmacol.* 122 (3), 517–522.

Gasparotto, A.Jr., Gasparotto, F.M., Boffo, M.A., Lourenço E.L.B., Stefanello, M.E.A., Salvador, M.J., Silva-Santos, J.E., Marques, M.C.A., Kassuya C.A.L., 2011a. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. *J. Ethnopharmacol.* 134 (2), 363–372.

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J., 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.* 53 (5), 1370–1373.

Gasparotto Junior, A., Gasparotto, F.M., Boffo, M.A., Lourenço E.L.B., Stefanello, M.E.A., Salvador, M.J., Silva-Santos, J.E., Marques, M.C.A., Kassuya C.A.L., 2011b. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin—An active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. *J. Ethnopharmacol.* 134 (2), 210–215.

Goldner, J., 1938. A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol.* 14 (2), 237–243.

Gomes, C., Lourenço, E.L.B., Liuti, E.B., Duque, A.O., Nihi F., Lourenço, A.C., Mendes, T.C., Gasparotto, A.Jr., Dalsenter, P.R., 2012. Evaluation of subchronic toxicity of hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* in wistar rats. *J. Ethnopharmacol.* 142 (2), 481–487.

Guo, S., Dipietro, L.A., 2010. Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.* 89 (3), 219–229.

Hänel, K.H., Cornelissen, C., Lüscher, B., Baron, J.M., 2013. Cytokines and the skin barrier. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (4), 6720–6745.

Hajiaghaalipour, F., Kanthimathi, M.S., Abdulla, M.A., Sanusi, J., 2013. The effect of *Camellia sinensis* on wound healing potential in an animal model. *Evid-Based Compl. Alt.* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/386734>.

- Hosseinzadeh, H.; Nassiri-Asl, M., 2014. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *J. Endocrinol. Investigation*, 37 (9), 783–788.
- Izzreen, M.N.N.Q., Fadzelly, A.B.M., 2013. Phytochemicals and antioxidant properties of different parts of *Camellia sinensis* leaves from Sabah Tea Plantation in Sabah, Malaysia. *Int. Food Res. J.* 20 (1), 307–312.
- Joshi, A, Joshi V.K., Pandey, D., Hemalatha, S., 2016. Systematic investigation of ethanolic extract from *Leea macrophylla*: Implications in wound healing. *J. Ethnopharmacol.* 191, 95–106.
- Junqueira, L.C.U., Bignolas, G., Brentani, R.R., 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 11 (4), 447–55.
- Lim, T.K., 2014. Edible medicinal and non-medicinal plants. v. 8. Dordrecht: Springer Science & Business, 777–785.
- Lobstein, A., Rietsch-Jako, L., Haag-Berrurier, M., Anton, R., 1991 Seasonal variations of the flavonoid content from *Ginkgo biloba* leaves. *Planta Med.* 57 (5), 430–433.
- Martin, P., Nunan, R., 2015. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br. J. Dermatol.* 173 (2), 370–378.
- Mclafferty, E., Hendry C., Farley, A., 2012. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs. Stand.* 27 (3), 35–42.
- Melo, C.M.L, Porto, C.S., Melo-Júnior, M.R., Mendes, C.M., Cavalcanti, C.C., Coelho, L.C., Porto, A.L., Leão, A.M., Correia, M.T., 2011. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *Int. J. Pharm.* 408 (1-2), 113–119.
- Menon, G.K., 2002. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 54, suppl. 1, S1–S17.
- Mokbel, M.S., Hashinaga, F., 2006. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis Osbeck*) fruits tissues. *Food Chem.* 94 (4), 529–534.
- Nadeem, A., Chhabra, S.K., Masood, A., Raj, H.G., 2003. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 111 (1), 72–78.
- Niizu, P.I., Rodriguez-Amaya, D.B., 2005. Flowers and leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of lutein. *J. Food Sci.* 70 (9), S605–S609.
- Park, J.E., Barbul, A., 2004. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am. J. Surg.* 187 (5A), 11S–16S.
- Rosique, R.G., Rosique, M.J., Farina Junior, J.A., 2015. Curbing inflammation in skin wound healing: a review. *Int. J Inflamm.* <http://dx.doi.org/10.1155/2015/316235>.

- Rusak, G., Komes, D., Likić, S., Horžić, D., Kovač, M., 2008. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. *Food Chem.* 110 (4), 852–858.
- Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., Jacobo-Velázquez, D.A., 2017. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules.* 22 (3), 1–21.
- Sellam, A., Iacomi-Vasilescu, B., Hudhomme, P., Simoneau, P., 2007. In vitro antifungal activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*. *Plant Pathol.* 56 (2), 296–301, 2007.
- Shestopalov, A.V., Shkurat, T.P., Mikashinovich, Z.I., Kryzhanovskaya, I.O., Bogacheva, M.A., Lomteva, S.V., Prokof'ev, V.N., Gus'kov, E.P., 2006. Biological Functions of Allantoin. *Biology Bull.* 33 (5), 437–440.
- Sorg, H., Tilkorn, D.J., Hager, S., Hauser J., Mirastschijski, U., 2017. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. *Eur. Surg. Res.* 58 (1-2), 81–94.
- Süntar, I.P., Akkol, E.K., Yilmazer, D., Baykal, T., Kirmizibekmez, H., Alper, M., Yeşilada, E., 2010. Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *J. Ethnopharmacol.* 127 (2), 468–477.
- Syarina, P.N., Karthivashan, G., Abas, F., Arulselvan, P., Fakurazi, S., 2015. Wound healing potential of *Spirulina platensis* extracts on human dermal fibroblast cells. *EXCLI J.* 14, 385–393.
- Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauhd, C., Brestic, M., 2016. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi J. Biol. Sci.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.036>.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* 104 (4), 1372–1378.
- Tran, N.Q., Joung, Y.K., Lih, E., Park, K.D., 2011. In situ forming and rutin-releasing chitosan hydrogels as injectable dressings for dermal wound healing. *Biomacromolecules.* 12 (8). 2872–2880.
- Vardhana, R., 2008. Direct uses of medicinal plants and their identification. 1 ed. New Delhi: Sarup & Sons, 349.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D., 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J. Agr. Food Chem.* 46 (10), 4113–4117.
- Velnar, T., Bailey, T., Smrkolj, V., 2009. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* 37 (5), 1528–1542.

Wattenberg, L.W., 1981. Inhibition of carcinogen-induced neoplasia by sodium cyanate, tert-butyl isocyanate, and benzyl isothiocyanate administered subsequent to carcinogen exposure. *Cancer Res.* 41 (8), 2991–2994.

Yamane, L.T., Paula, E., Jorge, M.P., Freitas-Blanco, V.S., Junior, Í.M., Figueira, G.M., Anholeto, L.A., Oliveira, P.R., Rodrigues, R.A., 2016. *Acmella oleracea* and *Achyrocline satureioides* as sources of natural products in topical wound care. *Evid-Based Compl. Alt.* <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3606820>.

Zacharski, D.M., Brandt, S., Esch, S., König, S., Mormann, M., Ulrich-Merzenich G., Hensel, A., 2015. Xyloglucan from *Tropaeolum majus* seeds induces cellular differentiation of human keratinocytes by inhibition of EGFR phosphorylation and decreased activity of transcription factor CREB. *Biomacromolecules.* 16 (7), 2157–2167.

Zanetti, G.D., Manfron, M.P., Hoelzel, S.C.S., 2004. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). *Inheringia.* 59 (2), 173–178.

Zanetti, G.D., Manfron, M.P., Hoelzel, S.C.S.M., Pagliarin, V.P., Morel, A.F., 2003. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. *Acta Farm. Bonaerense.* 22 (2), 159–62.

Zhishen, J. Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64 (4), 555–559.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho verificamos o extrato hidroetanólico de *Tropaeolum majus* L. apresentou atividade cicatrizante superior ao da alantoína, um agente cicatrizante reconhecido presente no mercado há anos. O extrato apresentou elevada capacidade antioxidante combinada a elevados níveis de compostos fenólicos e flavonoides. Entre eles estão o ácido clorogênico e a rutina, componentes majoritários do extrato.

O extrato de *T. majus* contribuiu para a regeneração dérmica e epidérmica, favorecendo a reepitelização, a organização da matriz dérmica, a deposição de colágeno e a proliferação de fibroblastos. Além disso, o extrato também apresentou atividade anti-inflamatória e antioxidante, reduzindo o infiltrado inflamatório e melhorando parâmetros oxidativos da lesão. Estes resultados podem ser atribuídos as propriedades dos componentes do extrato, suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e indutoras sobre vias de sinalização do reparo tecidual.

REFERÊNCIAS

- ADDOR, F. A. S.; AOKI, V. Skin barrier in atopic dermatites. **The Brazilian Annals of Dermatology**, v. 85, n. 2, p. 184-194, 2010.
- AIRES, A. et al. The antimicrobial effects of glucosinolates and their respective enzymatic hydrolysis products on bacteria isolated from the human intestinal tract. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 6, p. 2086-2095, 2009.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BALICK, M. J. **Rodale's 21st-century Herbal: A practical guide for healthy living using nature's most powerful plants**. New York: Rodale, 2014. p. 288.
- BAZYLKO, A. Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 88-94, 2013.
- BENKEBLIA, N.; LANZOTTI, V. *Allium* thiosulfinates: chemistry, biological properties and their potential utilization in food preservation. **Food**, v. 1, n. 2, p. 193-201, 2007.
- BJARNSHOLT, T. et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 16, n. 1, p.2-10, 2008.
- BONE, K.; MILLS, S. Y. **Principles and practice of phytotherapy: modern herbal medicine**. 2 ed. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2013. p. 31.
- BORLINGHAUS, J. et al. Allicin: chemistry and biological properties. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12591-12618, 2014.
- BOZCALI, E. et al. Effects of erucic acid supplemented feeding on chronic doxorubicin toxicity in rats. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 2, n.4, p. 337-347, 2009.
- BUTNARIU, M.; BOSTAN, C. Antimicrobial and anti-inflammatory activities of the volatile oil compounds from *Tropaeolum majus* L. (Nasturtium). **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 31, p. 5900-5909, 2011.
- CARLSON, K. D.; KLEIMAN, R. Chemical survey and erucic acid content of commercial varieties of nasturtium, *Tropaeolum majus* L. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 11, p. 1145-1148, 1993.
- COLLINS, N. The facts about Vitamin C and wound healing. **Ostomy Wound Management**, v. 55, n.3, p. 8-9, 2009.
- DIEGELMANN, R. F.; EVANS, M. C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p.283-9, 2004.

DROBNICA L., et al. Antifungal activity of isothiocyanates and related compounds: I. naturally occurring isothiocyanates and their analogues. **Applied Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 701–709, 1967.

DZIALO, M. et al. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1-41, 2016.

FONSECA, N. M.; ALVES, R. R.; PONTES, J. P. J. Recomendações da SBA para segurança na anestesia regional em uso de anticoagulantes. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 64, n. 1, p. 1-15, 2014.

FRYKBERG, R. G.; BANKS, J. Challenges in the treatment of chronic wounds. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 9, p. 560-582, 2015.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Histologia Essencial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 205.

GARZÓN, G. A.; WROLSTAD, R. E. Major anthocyanins and antioxidant activity of *Nasturtium* flowers (*Tropaeolum majus*). **Food Chemistry**, v. 114, n. 1, p. 44-49, 2009.

GASPAROTTO JUNIOR et al. Antihypertensive effects of isoquercitrin and extracts from *Tropaeolum majus* L.: evidence for the inhibition of angiotensin converting enzyme. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 363-72, 2011a.

GASPAROTTO JUNIOR, A. et al. Diuretic and potassium-sparing effect of isoquercitrin—An active flavonoid of *Tropaeolum majus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 210-215, 2011b.

GASPAROTTO JUNIOR, A. et al. Natriuretic and diuretic effects of *Tropaeolum majus* (*Tropaeolaceae*) in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 517-522, 2009.

GOMES C. et al. Evaluation of subchronic toxicity of hydroethanolic extract of *Tropaeolum majus* inistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 481-487 2012.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors affecting wound healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

GUO, X. et al. The galvanotactic migration of keratinocytes is enhanced by hypoxic preconditioning. **Scientific Reports**, 2015. No prelo.

HÄNEL, K. H. et al. Cytokines and the skin barrier. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 6720-6745, 2013.

HANIFFA, M; GUNAWAN, M; JARDINE, L. Human skin dendritic cells in health and disease. **Journal of Dermatological Science**, v. 77, n. 2, p. 85-92, 2015.

HART, F. X. et al. Keratinocyte galvanotaxis in combined DC and AC electric fields supports an electromechanical transduction sensing mechanism. **Bioeletromagnetics**, v. 34, n. 2, p. 85-94, 2013.

- HULAN, H.W. et al. Relationship between erucic acid and myocardial changes in male rats. **Lipids**, v. 11, n. 1, p. 9-15, 1975.
- KARAPANAGIOTI, E.G.; ASSIMOPOULOU, A.N. Naturally occurring wound healing agents: an evidence-based review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 29, p. 3285-3321, 2016.
- KERMANSHAI, R. et al. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 427-435, 2001.
- KOH, T. J.; DIPIETRO, L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 13, n. e23, p. 1-12, 2011.
- KORIEEM, K. M. M.; ARBID, M. S.; EL-GENDY, N. F. I. The protective role of *Tropaeolum majus* on blood and liver toxicity induced by diethyl maleate in rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 20, n. 9, p. 579-586, 2010.
- LARYEA, M. D. et al. Fatty acid composition of blood lipids in Chinese children consuming high erucic acid rapeseed oil. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 36, n. 5-6, p. 273-8, 1992.
- LEVIN, M. Bioelectric mechanisms in regeneration: unique aspects and future perspectives. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 5, p. 543-556, 2009.
- LI, A. N. et al. Resources and biological activities of natural polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020-6047, 2014.
- LI, W. W. et al. Vascular assessment of wound healing: a clinical review. **International Wound Journal**, v. 14, n. 3, p. 460-469, 2017.
- LIM, T. K. **Edible medicinal and non medicinal plants**. v. 8. Dordrecht: Springer Science & Business, 2014. p. 777-785.
- MARTIN, P.; NUNAN, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. **British Journal of Dermatology**, v. 173, n. 2, p. 370-378, 2015.
- McCUTCHEON, J. S. et al. Cardiopathogenicity of rapeseed oils and oil blends differing in erucic, linoleic, and linolenic acid content. **Lipids**, v. 11, n. 7, p. 545-551, 1976.
- McLafferty, E.; Hendry C.; Farley, A. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. **Nursing Standard**, v. 27, n. 3, p. 35-42, 2012.
- MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, suppl. 1, p. S1-S17, 2002.
- MOHAMMED, B. M. et al. Vitamin C promotes wound healing through novel pleiotropic mechanisms. **International wound journal**, v. 13, n. 4, p. 572-584, 2016.
- MOLNAR, J. A.; UNDERDOWN, M. J.; CLARK, W. A. Nutrition and chronic wounds. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 11, p. 663-681, 2014.

NIE, W.; DETERS, A. M. Tamarind seed xyloglucans promote proliferation and migration of human skin cells through internalization via stimulation of proliferative signal transduction pathways. **Dermatology Research and Practice**, 2013. No prelo.

NIIZU, P. Y.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flowers and leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of lutein. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 9, p. S605-S609, 2005.

NUCCITELLI, R. A Role for Endogenous Electric Fields in Wound Healing. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 58, p. 1-26, 2003.

OVALLE, W.; NAHIRNEY, P. C. **Netter Bases da Histologia**. Rio de Janeiro: Eselvier, 2014. p. 244.

PARK, J. E., BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of surgery**, v. 187, n. 5a, p 11S-16S, 2004.

PINTÃO, A. M.; PAIS M. S. S Cell suspension cultures from *Tropaeolum majus* L. establishment and growth conditions. **Bioresource Technology**, v. 47, n. 2, p. 143-147, 1994.

PINTÃO, A. M. et al. In vitro and in vivo antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*. **Planta Medica**, v. 61, n. 3, p. 233-6, 1995.

PIOTROWSKA, A.; WIERZBICKA, J.; ZMIJEWSKI, M. A. Vitamin D in the skin physiology and pathology. **Acta Biochimica Polonica**, v. 16, n. 1, p. 17-29, 2016.

PRANCE, G.; NESBITT, M. **The Cultural History of Plants**. New York: Routledge, 2005. p. 108.

ROBERTS, R. L.; GREEN, J.; LEWIS, B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. **Clinics in dermatology**, v. 27, n. 2, p. 195-201, 2009.

ROSIQUE, R. G.; ROSIQUE, M. J.; FARINA JUNIOR, J. A. Curbing inflammation in skin wound healing: a review. **International journal of inflammation**, 2015. No prelo.

ROSS, F. P.; CHRISTIANO, A. M. Nothing but skin and bone. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n.5, p. 1140-1149, 2006.

REINKE, J. M.; SORG, H. 2012. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, v. 49, n. 1, p. 35-43, 2012.

SANTO, A. P.E. et al. Efeito anticoagulante *in vitro* do extrato hidroetanólico de folhas e flores éduladas de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae) sobre o plasma humano. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 5, p. 732-736, 2007.

SAXOD, R. Ontogeny of the cutaneous sensory organs. **Microscopy Research and Technique** v. 34, n. 4, 313-333, 1996.

SELLAM, A. et al. In vitro antifungal activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*. **Plant Pathology**, v. 56, n. 2, p. 296-301, 2007.

SGONC, R.; GRUBER, J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review. **Gerontology**, v. 59, n. 2, p. 159-164, 2013

SORG, H. et al. Skin wound healing: an update on the current knowledge and concepts. **European Surgical Research**, v. 58 n. 1-2, p. 81-94, 2017.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, n. 2, p. 101-7, 2005.

VAN WIK, B.-E. **Culinary Herbs and Spices of the World**. Chicago: The University of Chicago Press Press, 2013. p. 280.

VARDHANA, R. **Direct uses of medicinal plants and their identification**. New Delhi: Sarup & Sons, 2008. p. 349.

VEGA, J. A. et al. The Meissner and Pacinian sensory corpuscles revisited new data from the last decade. **Microscopy Research and Technique**, v. 72, n. 4, p. 299-309, 2009.

VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 5, p. 1528-42, 2009.

VIDEIRA, I. F. S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 1, p. 76-83, 2013.

VISSCHER, M.; NARENDRAN, V. The ontogeny of skin. **Advances in Wound Care**, v. 3, n. 4, p. 291-303, Apr 2014.

WATT, F. M. Mammalian skin cell biology: At the interface between laboratory and clinic. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 937-940, 2014.

WATTENBERG, L. W. Inhibition of carcinogenic effects of polycyclic hydrocarbons by benzyl isothiocyanate and related compounds. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 58, n. 2, p. 395-8, 1977.

WATTENBERG, L. W. Inhibition of carcinogen-induced neoplasia by sodium cyanate, tert-butyl isocyanate, and benzyl isothiocyanate administered subsequent to carcinogen exposure. **Cancer Research**, v. 41, n. 8, p. 2991-2994, 1981.

WATTENBERG, L. W. Inhibitory effects of benzyl isothiocyanate administered shortly before diethylnitrosamine or benzo[a]pyrene on pulmonary and forestomach neoplasia in A/J mice. **Carcinogenesis**, v. 8, n. 12, p. 1971-3, 1987.

WOO, S. H.; LUMPKIN, E. A.; PATAPOUTIAN, A. Merkel cells and neurons keep in touch. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 2, p. 74-81, 2015.

XIAO, Y.; WILLIAMS, J. S.; BROWNELL, I. Merkel cells and touch domes: More than mechanosensory functions? **Experimental Dermatology**, v. 23, n. 10, p. 692-695, 2014.

ZACHARSKI, D. M. et al. Xyloglucan from *Tropaeolum majus* seeds induces cellular differentiation of human keratinocytes by inhibition of EGFR phosphorylation and decreased activity of transcription factor CREB. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 7, p. 2157-2167, 2015.

ZANETTI, G. D. et al. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 22, n. 2, 158-62, 2003.

ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **INHERINGIA Série Botânica**, v. 59, n. 2, p. 173-178, 2004.