



## **AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *ALLIUM SATIVUM* L. SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS HUMANOS.**

## **IN VITRO EVALUATION OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT BY *ALLIUM SATIVUM* L. ON THE PROLIFERATION OF HUMAN FIBROBLASTS.**

EMMILY SANT ANNA, SAMARA DOS SANTOS CORDEIRO, CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA- ANHENBI MORUMBI, SÃO PAULO, BRASIL- 2017<sup>1</sup>.

DOI [10.5281/zenodo.7447739](https://doi.org/10.5281/zenodo.7447739)

### **RESUMO**

O alho é uma planta utilizada desde a antiguidade, por possuir diversas propriedades curativas, dando enfoque no seu efeito cicatrizante. O objetivo da pesquisa é obter evidências sobre a ação do *Allium sativum* L. durante o processo de cicatrização, estimulando a proliferação de fibroblastos.

A metodologia utilizada foi a realização de testes de avaliação da viabilidade

celular com azul de tripano e o ensaio de redução MTT a formazan, além da quantificação de colágeno em uma linhagem de fibroblastos que foi cultivada em meio IMDM (meio segundo Iscove) e lavada com tampão.

Os resultados obtidos de acordo com a técnica de azul de tripano sugerem que o extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* foi capaz de induzir a proliferação dos fibroblastos. A técnica de redução do MTT confirmou a atividade proliferativa

do extrato hidroalcoólico, mais efetivamente nas concentrações de 80 µg/mL e 100 µg/mL; já em relação à síntese de colágeno, observou-se que a concentração de 100 µg/mL aumentou de modo significativo. Com base nos resultados adquiridos através da pesquisa, pode-se sugerir que o alho possui ação cicatrizante, promovendo proliferação celular, e a deposição de colágeno.

**PALAVRAS-CHAVE:** Allium sativum; cicatrização; fibroblastos; colágeno.

## **ABSTRACT**

Garlic has been used since ancient times, as it has several healing properties, focusing on its healing effect. The objective of the research is to obtain evidence about the action of *Allium sativum* L. during the healing process, stimulating the proliferation of fibroblasts.

The methodology used was to carry out tests to evaluate cell viability with trypan blue and the MTT to formazan reduction assay, in addition to the quantification of collagen in a fibroblast strain that was cultivated in IMDM medium (medium according to Iscove) and washed with plug.

The results obtained according to the trypan blue technique suggest that the hydroalcoholic extract of *Allium sativum* was able to induce the proliferation of fibroblasts. The MTT reduction technique confirmed the proliferative activity of the hydroalcoholic extract, more effectively at concentrations of 80 µg/mL and 100 µg/mL; in relation to collagen synthesis, it was observed that the concentration of 100 µg/mL increased significantly. Based on the results acquired through the research, it can be suggested that garlic has a healing action, promoting cell proliferation and collagen deposition. Keywords: *Allium sativum*; healing; fibroblasts; collagen.

## **INTRODUÇÃO**

O uso de fitoterápicos cresce com o aumento da procura de produtos à base de plantas, sendo utilizado em conjunto com a medicina convencional. Há muitos séculos o homem já utilizava diversos tipos de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades (Gomes, 2011). É nesse contexto que o alho tem sido usado por milhares de anos para fins medicinais.

Há registros da utilização do alho em escrituras antigas do Egito, Grécia e

Roma, onde era usufruído como remédio curativo. Na medicina chinesa, tem sido utilizado há pelo menos 3.000 anos; e em 1958, Louis Pasteur foi o primeiro a demonstrar os efeitos antimicrobianos do alho (Sivam, 2001).

O gênero *Allium* pertence à família Liliaceae, que compreende mais de 700 espécies, entre estas o *Allium sativum*, que é amplamente conhecido como especiaria e remédio popular para várias finalidades. A maioria das propriedades terapêuticas é atribuída a óleos específicos e a componentes organossulfurados, que são responsáveis pelo odor e sabor típico. A alicina e a aliina estão entre os princípios ativos, estando presentes quando o alho é danificado, através da trituração ou corte (Baghalian *et al.*, 2005).

O processo de cicatrização acontece quando há lesão tecidual, posteriormente ocorre a infiltração de células inflamatórias, sucedida pelo aumento da formação de novos vasos (angiogênese), fase na qual há atuação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); o alho atua no processo cicatrizante, estimulando a proliferação de fibroblastos e consequentemente na deposição de

colágeno no tecido, eventos necessários para formação da cicatriz (Dvorak, 2002).

Recentemente, através de pesquisas científicas, tem se obtido bons resultados sobre a eficácia do alho durante a cicatrização (Farnood *et al.*, 2009; Mohammad *et al.*, 2017; Ejaz *et al.*, 2009). Porém, há uma necessidade crescente de obter informações sobre o efeito estimulante de seus princípios ativos durante o processo cicatrizante.

## **OBJETIVO**

Investigar a eficácia do *Allium sativum* L. no processo de cicatrização de tecido lesionado, através de mecanismos como a formação de novos vasos, proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno na área afetada.

Foram coletados dados que demonstraram este crescimento através de uma pesquisa experimental.

## **REFERENCIAL TEÓRICO**

### ***Allium sativum* L.**

A Anvisa (RDC 26) define fitoterápico como um produto obtido através de matéria prima vegetal, com a finalidade profilática, paliativa ou curativa (Brasil, 2014). Além da comprovação da ação

terapêutica de várias plantas que são utilizadas popularmente, a fitoterapia é uma parte importante para a manutenção das condições de saúde da população (Alves e Silva, 2002).

Existem relatos de que o alho tenha surgido na Ásia Central e sua origem no oeste da China. Ele foi muito utilizado por conta do seu poder de cura sobre as enfermidades da época. Sua eficácia sobre as doenças, fez com que logo se disseminasse pelo mundo, tanto no antigo, quanto no novo mundo (Petrovska e Cekovska, 2010). Suas características bioquímicas atribuem propriedades que são importantes na fitoterapia, tendo em vista que o interesse por alimentos saudáveis vem se ampliando (Jabbes *et al*, 2012).

Há uma discussão sobre a correta localização do gênero *Allium* em meio às famílias botânicas. Alguns autores contemporâneos acreditam que ele faça parte da família Alliaceae (Silva e Silva, 2009). Entretanto, de acordo com Joly (1998), o gênero *Allium* pertence à família Liliaceae, e tal classificação é a mais adotada atualmente.

O alho é uma planta constituída por folhas escamiformes e um bulbo ou cabeça utilizada como remédio

medicinal e como tempero (Block, 2010). O alho contém pelo menos 33 compostos sulfurados, diversas enzimas, 17 aminoácidos, vitaminas (A, B6, C, ácido fólico, niacina) e minerais como o selênio e enxofre. Em sua composição fitoquímica ativa, se destacam compostos como a alicina e o ajoeno (Ledezma e Apitzcastro, 2006). Os fitoquímicos são responsáveis tanto pelo odor pungente do alho, quanto por muitos dos seus efeitos medicinais, tais como, ação antiviral, antifúngica, antibiótica, e por ter considerável teor de selênio age como antioxidante. (Corzo-Martínez *et al.*, 2007).

Dentre os compostos é encontrado a aliina e outro componente ativo é a alicina, primeira substância quimicamente isolada na década de 1940; ela não está presente no alho, até que ele seja amassado, partido, cortado ou mastigado. Quando a lise celular ocorre, a enzima aliinase é liberada, e quando elas entram em contato com aliina, elas são convertidas em alicina (Gomez e Sanchez, 2000).

### **O alho e a cicatrização**

O alho possui ação cicatrizante, certos componentes têm o poder de acelerar o processo de cura, através da

ação antiinflamatória, antimicrobiana e favorecendo a reconstrução natural dos tecidos, podendo rapidamente curar feridas, queimaduras e lesões. Seus compostos promovem o crescimento e a reparação celular, aumentando a função imunológica; como a vitamina C que é importante para formação de colágeno (Yaar e Gilchrest, 1990).

A cicatrização ocorre em três fases, que são divididas em: inflamatória, proliferativa e de remodelagem (Clark R.A., 1996). Durante a fase inflamatória, o endotélio lesado e as plaquetas estimulam a cascata de coagulação e a liberação de fatores de crescimento que atraem neutrófilos e macrófagos para a ferida (Broughton e Janis, 2006).

Já na fase proliferativa ocorre o fechamento da lesão, que pode ser dividida em reepitelização, angiogênese, formação do tecido de granulação e deposição de colágeno pelos fibroblastos. A reepitelização ocorre precocemente, as células epiteliais migram em direção a parte superior, e as camadas normais da epiderme são restauradas (Lawrence e Diegelmann, 1994).

A angiogênese é estimulada pelo

fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ela é uma etapa fundamental, onde há formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Folkman e Shing, 1992). Esses novos vasos vão participar na formação do tecido de granulação (parte final da fase proliferativa) (Li J *et al.*, 1999).

Os fibroblastos e as células endoteliais são os principais componentes da fase proliferativa. Os fibroblastos dos tecidos vizinhos migram para a ferida, onde produzem colágeno tipo I e transformam-se em miofibroblastos, o que promove a contração da ferida (Witte e Barbul, 1997). Eles têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo, pela síntese de colágeno (Junqueira e Carneiro, 2013). O colágeno e a elastina produzidos pelos fibroblastos são responsáveis pela retirada do tecido desvitalizado de uma ferida e pelo remodelamento fisiológico celular (Hildebrand *et al.*, 2005).

Na fase de remodelagem há recuperação da estrutura do tecido, nesta fase, há tentativa de repor o tecido lesionado. É a última fase do processo de cicatrização, a quantidade de células e

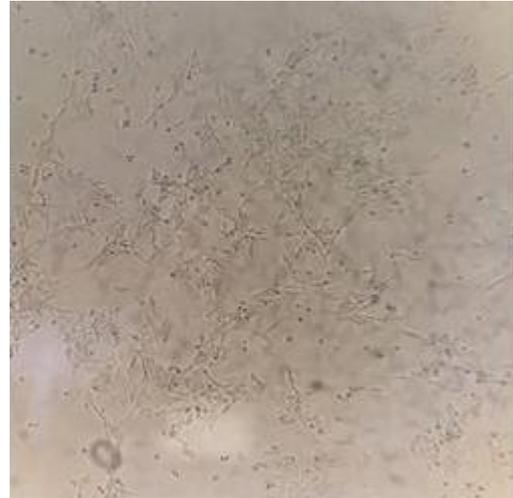
de vasos da ferida diminui, pois acabam saindo do local, o que leva a formação da cicatriz; enquanto há maturação das fibras de colágeno, e posteriormente ocorre uma reorganização da matriz extracelular, havendo uma mudança, pois esta passa a ser definitiva (Gabbiani *et al.*, 1972).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* foi adquirido no laboratório fitoterápico Panizza. O extrato foi avaliado, *in vitro*, em relação à sua possível atividade proliferativa ou citotóxica sobre fibroblastos humanos (CCD-1072sK; ATCC). Foram preparadas soluções com diferentes concentrações para realização dos testes.

### **Linhagem celular CCD1072SK**

A linhagem de fibroblastos humanos CCD1072SK (ATCC), mostrada na figura 1, foi adquirida através do banco de células do Rio de Janeiro e mantida em cultura na Universidade Federal de São Paulo (Unifesp).



**Figura 1:** Aspecto morfológico da linhagem de fibroblastos CCD1072sk. Aumento de 200x

As células foram cultivadas em meio IMDM com 10% de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 100 IU/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e remoção do meio e lavagem da cultura com tampão fosfato salino (PBS). Todos os experimentos realizados com a linhagem de fibroblastos foram submetidos ao teste de viabilidade celular utilizando o corante azul de tripano e realizando a leitura em câmara hemocitométrica por microscopia óptica. Todos os experimentos descritos foram realizados quando a viabilidade celular foi igual ou superior a 90%.

### **Preparo do meio base**

Para a preparação do meio base RPMI (Roswell park memorial Institute) foi ne-

cessário colocar 300 mL de água deionizada em um becker e levar ao agitador, após o ajuste da velocidade, foi acrescentado 5g do meio em pó, junto à 1g de agente tamponante de ácido sulfônico e 1g de bicarbonato de sódio até completa solubilização. O conteúdo foi vertido para um balão volumétrico e completo com água deionizada até a marcação de 500 ml.

No fluxo laminar uma unidade de filtração de 0.22 µm foi acoplada a bomba de vácuo, o meio foi vertido, e em seguida a bomba foi ligada. Após o processo, a unidade de filtração foi desacoplada da garrafa do meio e a tampa que acompanha o kit foi fechado com filme de parafina plástica.

#### Preparo do meio suplementado

Para a preparação do meio suplementado IMDM de Iscove, o qual é uma modificação do meio DMEM (modified Dulbecco's medium), homogenizou-se 50ml de Soro fetal bovino e 5 ml de Penicilina/Estreptomicina, acrescentando-os ao meio nas proporções indicadas. O meio antigo era retirado e descartado, e a garrafa lavada com 5 ml de PBS; O meio foi incubado a 37°C com 1 ml de tripsina por 5 minutos, em seguida a tripsina foi

retirada da garrafa e depois foi necessário completar com 10 ml de meio de cultura e ser colocado na estufa.

#### **Avaliação da viabilidade celular**

A avaliação da viabilidade celular pelo método de incorporação do corante azul de tripano foi realizada após a aplicação em diferentes concentrações do extrato do alho, a saber: 20, 40, 60, 80 e 100 µg/ml, onde após o período de incubação de 24h o conteúdo de cada poço das culturas de fibroblastos foi recolhido em tubos estéreis de plástico de 15 mL, e centrifugado a 1500 rpm por 8 minutos. Os pellets foram ressuspensos em 1 ml de meio RPMI. Após isso, as soluções de células foram diluídas (1:2) em corante de azul de tripano e a contagem das células viáveis e inviáveis foi realizada em câmara hematócitométrica por microscopia óptica. A soma da contagem de células totais (viáveis e inviáveis de cada poço) foi considerada como 100% de células, sendo realizados os cálculos para verificar as porcentagens correspondentes às células viáveis e as inviáveis analisadas no experimento.

#### **Ensaios de redução MTT**

O teste de redução MTT à forma-

zan ([3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazólio]) é usado com grande sucesso para estimar o número de células viáveis em uma análise inicial de fármacos. Assim, às células tratadas com diferentes concentrações do extrato do *Allium sativum*, em diferentes períodos de tempo, conforme descrito no item anterior, e na concentração  $5 \times 10^4$  células por poço, foram adicionados 10  $\mu$ l da solução de MTT 5 mg/ml em cada poço. Após 4 horas, a placa foi centrifugada, o sobrenadante de cada poço descartado e o pellet com os cristais formado no fundo da placa foi dissolvido com 100  $\mu$ L de etanol puro e em seguida homogeneizado em agitador de placas por 15 minutos. A densidade óptica foi medida pelo leitor de microplacas em 540 nm. A percentagem de sobrevivência celular na presença dos compostos em estudo foi calculada da seguinte maneira:

Absorbância por poço (com droga) x 100

Absorbância do controle (sem droga)  
= % Células viáveis

### **Quantificação de colágeno com corante ácido Sirius Red**

As células foram cultivadas e tratadas conforme descrito anteriormente.

Após cultivo, o meio foi retirado e os poços lavados três vezes com PBS 0,1M. Foram adicionados 100  $\mu$ L de fluido de Bouin (ácido pícrico, formaldeído e ácido acético glacial) para fixação durante 1 h. As amostras foram lavadas com PBS, em seguida, foi adicionado o corante Sirius Red. Após 1 h, foi removido o máximo do corante e procedeu-se a lavagem com 150  $\mu$ L de solução de ácido hidrolórico 0,01M por 30 segundos para remoção do corante que não se ligou ao colágeno. Em seguida, o corante foi retirado das camadas celulares com a adição de solução de NaOH 0,1M durante 30 min. Alíquotas de 100  $\mu$ L das soluções contidas nos poços foram transferidas para uma nova placa. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 570 nm.

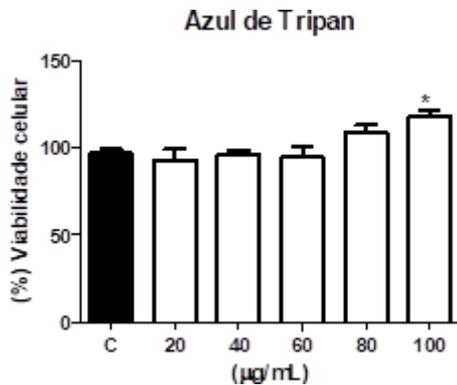
### **Análise Estatística**

O delineamento experimental, para todos os bioensaios, foi inteiramente casualizado, em modelo hierárquico, com dois fatores e cinco repetições. Procedeu-se à análise de variância dos dados obtidos pelo teste ANOVA e as médias foram comparadas pelo POST HOC de Tukey,  $P < 0,05$  (5%). Os dados foram analisados pelo

programa estatístico IBM SPSS Statistics 22.

## RESULTADOS

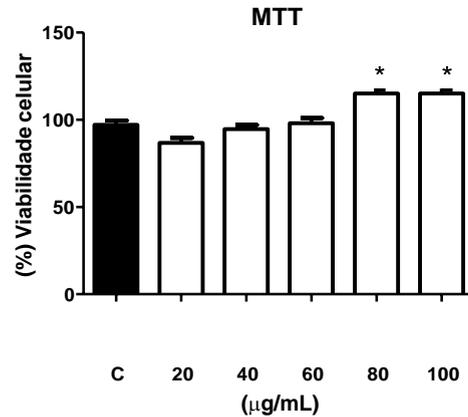
De acordo com a técnica de azul de tripano, os resultados obtidos sugerem que o extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* foi capaz de induzir a proliferação dos fibroblastos. A figura 2 mostra as diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* que foram utilizadas para o teste.



**Figura 2:** Teste de incorporação do azul de tripano. Efeitos da exposição do extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* sobre linhagem de fibroblastos humanos CCD-1072SK. Exposição por 24 horas. Durante as 24h anteriores, as culturas de fibroblastos foram carenciadas de soro bovino fetal. (\*)  $P < 0,05$  ANOVA, Tukey.

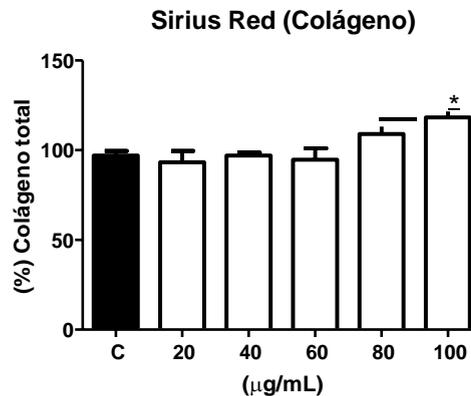
No mesmo sentido, a técnica de redução do MTT foi realizada com o objetivo de confirmar a atividade proliferativa do extrato hidroalcoólico de *Allium sativum*. A figura 3 mostra os resultados obtidos com as diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de

*Allium sativum*.



**Figura 3:** Teste de redução do MTT. Efeitos da exposição do extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* sobre linhagem de fibroblastos humanos CCD-1072SK. Exposição por 24 horas. Durante as 24h anteriores, as culturas de fibroblastos foram carenciadas de soro bovino fetal. (\*)  $P < 0,05$  ANOVA, Tukey.

A quantificação do colágeno produzido pelos fibroblastos CCD-1072SK foi obtida pelo método que emprega o corante ácido *Sirius Red*. Os resultados mostraram que o extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* estimulou os fibroblastos testados a produzirem colágeno durante o período de 24 horas (figura 4).



**Figura 4:** Teor de colágeno. Efeitos da exposição do extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* sobre linhagem de fibroblastos humanos CCD-1072SK. Exposição por 24 horas. Durante as 24h anteriores, as culturas de fibroblastos foram carenciadas de soro bovino fetal. (\*)  $P < 0,05$  ANOVA, Tukey.

## **DISCUSSÃO**

Para avaliar a viabilidade dos fibroblastos e verificar o estímulo do alho, foram utilizados dois métodos. O método com azul de tripano, o qual é utilizado para determinar o número de células viáveis em uma suspensão celular; este teste se baseia no princípio de que células vivas e com a membrana celular intacta são capazes de excluir o corante, enquanto as células inviáveis, com a membrana rompida ou comprometida, conseguem incorporá-lo (Strober, 2001).

Outro método utilizado para avaliar a viabilidade celular, foi o ensaio de redução do MTT, um corante utilizado para distinguir as células vivas, das células mortas. A redução do sal do MTT à formazan é realizada pelo citocromo das células viáveis e resulta em cristais de formazan insolúveis de cor violeta, a intensidade da cor resultante é uma medida direta da viabilidade e da

atividade metabólica mitocondrial (local de ocorrência da redução) (Mosmann, 1983).

Já para obter a quantificação de colágeno (importante durante o reparo tecidual), foi utilizado o corante ácido Sirius Red; o qual, por meio dos seus grupos de ácido sulfônico, se liga a molécula de colágeno, reagindo com os grupos básicos presentes na mesma, proporcionando a análise quantitativa das fibras colágenas, de acordo com o tipo e espessura da fibra, pois estas possuem diferentes birrefringências, devido a intensidade da cor obtida (Junqueira, 1979).

Os resultados apresentados neste artigo trouxeram evidências de que o *A. sativum* possui efeito cicatrizante, o teste azul de tripano demonstrou que as concentrações testadas do extrato do alho induzem a proliferação de fibroblastos, confirmado pela viabilidade celular superior a 100%; o teste redução do MTT também confirma a viabilidade, sendo maior nas concentrações de 80 µg/ml e 100 µg/ml. Já através do teste de quantificação de colágeno com Sirius Red, demonstra a hipótese de que o alho aumenta a

produção de fibras colágenas pela linhagem de fibroblastos, principalmente na concentração de 100 µg/ml. Estas evidências nos indicam que o alho acelera o processo de cicatrização, fato que foi previamente comprovado por outros estudos (Farnhood, 2009; Saifzadeh et al., 2006; Mohammad, 2017 e Ejaz et al., 2009).

O estudo de Farnhood (2009) investigou a eficácia do extrato do alho em 10 coelhos, foi criada uma ferida retangular nas costas de cada um, e elas foram tratadas com 5 ml do extrato durante 21 dias, no final foi comprovado que o uso tópico do alho diminui o tamanho da ferida e o tempo de cicatrização. Outro estudo semelhante feito por Saifzadeh et al., (2006) teve o objetivo de testar 1% de extrato aquoso (0,5 ml) em feridas criadas em 5 cães; que também demonstrou a aceleração da cicatrização.

Sob um olhar mais fisiológico Mohammad (2017) conduziu um estudo para avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico do alho em feridas de ratos; foi aplicado topicamente 2% do extrato de alho em feridas criadas na pele de 72 ratos Wistar por 21 dias. Eles observaram que houve neovascularização

no tecido, aumento da deposição de colágeno, reepitelização, aumento do número de fibroblastos e encurtamento da fase inflamatória, confirmando a eficácia do extrato

No estudo de Ejaz et al., (2009), testou-se topicamente o extrato envelhecido do alho em diferentes concentrações (1%, 5%, 10% e 15%) em feridas feitas em 90 galinhas por 6 dias; o estudo revelou que houve aumento da angiogênese, da formação de neocolágeno e de sua maturação, além de resultados positivos sobre a reepitelização do tecido.

## **CONCLUSÃO**

Neste artigo observamos que as concentrações do extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* se mostraram efetivas em promover proliferação dos fibroblastos e aumento do colágeno na área lesionada. O alho estimula estes efeitos através do mecanismo de angiogênese, pois com o aumento do número de vasos no local, auxilia na formação do tecido cicatricial. Os resultados obtidos sugerem que o extrato do alho é eficaz durante o processo de cicatrização.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos ao nosso orientador Prof. Dr. Fernando Rodrigues por todo suporte, pelas suas correções e incentivos. E ao Prof. Dr. Carlos Rocha Oliveira e Prof. Dr. Daniel M. Garcia, por toda dedicação e foco durante a pesquisa experimental. Além dos nossos amigos e familiares pelo apoio incondicional.

## **REFERÊNCIAS**

- ALVES, D.L.; SILVA, C.R. Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo, ed. Atheneu, 105 p., 2002.
- BAGHALIAN, K et al. Evaluation of allicin content and botanical traits in Irania garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. *Sci. horticult.*, v. 103, p. 155-166, 2005
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 26. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014..
- BLOCK, E. Garlic and other alliums: The lore and the science. Royal society of chemistry, 429 p., 2010.
- BROUGHTON, G; JANIS, J.E, ATTINGER, C.E. The basic science of wound healing. *Plast. reconstr. surg.*; v. 117, p. 12-34, 2006.
- CLARK, R.A. The molecular and cellular biology wound repair. New York: plenum press, ed. 2, p. 3-35, 1996.
- CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. Biological Properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, n. 12, p. 609-625, 2007.
- DVORAK, H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin. oncol.* v. 20, p. 4368-4380, 2002
- EJAZ, S; CHEKAROVA, I; CHO, J.W; LEE, S.Y; ASHRAF, S; LIM, C.W. Effect of aged garlic extract on wound healing: a new frontier in wound management. *Drug chem. toxicol.*, v. 32, n.3, p. 191-203, 2009.
- FARNOOD, S.S.J; HOSSEIN, T; SHAHRAM, J; BAHADOR, H.M; SAEED, S.A. The efficacy of alcoholic extract of garlic on the healing process of experimental burn wound in the rabbit. *Journal of Animal and veterinary advances*, Medwell journals, p. 655-659, 2009.
- FOLKMAN, J; SHING, Y. Angiogenesis. *Journal of biological*

chemistry, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, 1992.

GABBIANI, G.; HIRSCHL, B.J.; RYAN, G.B.; STATKOV, P.R.; MAJNO, G. Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J. Exp. med.*, v. 135, p. 719-734, 1972.

GOMES, V. T. L. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana da Myracrodruon urundeuva. Universidade estadual da Paraíba, centro de ciências biológicas e da saúde, ed. 21, p.11-14, 2011.

GOMEZ, L.J.G.; SANCHEZ-MUNIZ, F.J. Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Archivos latinoamericanos de nutricion*, Caracas, v. 50, n. 3, p. 219-229, 2000.

HILDEBRAND, K.A. et al. The basics of soft tissue healing and general factors that influence such healing. *Sports med. arthrosc.*, v. 13, n. 3, p. 136-144, 2005.

JABBES, N. et al. Agromorphological markers and organosulphur compounds to assess diversity in Tunisian garlic landraces. *Scientia horticulturae*, Amsterdam, n. 148, p. 47-54, 2012.

JOLY, A.B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo:

nacional, v. 4, ed. 12, p. 777, 1998.

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.*, v. 11, p. 447-455, 1979..

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica – texto e atlas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, ed. 12, p. 90-116, 2013.

LAWRENCE, W.T; DIEGELMANN, R.F. Growth factors in wound healing. *Clinics in dermatology*, v. 12, p. 157-169, 1994

LEDEZMA, E.; APITZ-CASTRO, R. Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), um nuevo agente antifúngico. *Revista iberoamericana de micrologia*, Bilbao, v. 23, n. 2, p. 75-80, 2006.

LI, J et al. TGF-beta3, but not TGF-beta1, protects keratinocytes against 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced cell death *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Biol. Chem.*, v. 274, n.7, p. 4213-4219, 1999.

MOHAMMAD, R.F; SAEED, H; DARAB, F; RASOUL, Z; MOHAMMAD, A. *Hydroethanolic*

Allium sativum extract accelerates excision wound healing: evidence for roles of mast-cell infiltration and intracytoplasmic carbohydrate ratio. Brazilian journal of phar. sciences, p. 1-11, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. immunol methods. v. 65, p. 55-63, 1983.

SAIFZADEH, S.; TEHRANI, A; JALALI, F.S.S; OROUJZADEH, R. Enhancing effect of aqueous garlic extract on wound healing in the dog. Clinical and histopathological studies. J. anim. vet. adv., v. 5, p. 1101-1104, 2006.

SIVAM, G.P. Protection against Helicobacter pylori and other bacterial infections by Garlic. J. Nutr., v. 131, p. 1106-1108, 2001.

SILVA, E. C.; SILVA, R. J. Botânica e cultivares. Cultura do alho. Tecnologias modernas de produção. Lavras: UFLA, p. 19-28, 2009.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. Curr. protoc. immunol., Appendix 3B, DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs21. Disponível em: PMID: 18432654, 2001.

PETROVSKA, B.B;

CEKOVSKA, S. Extracts from the history and medical properties of garlic. Pharmacognosy review, v. 4, p. 106-110, 2010.

WITTE, M.B; BARBUL, A. General principles of wound healing. Surg. clinics of North Am., v. 77, p. 509-528, 1997.

YAAR, M; GILCHREST, B.A. Cellular and molecular mechanisms of cutaneous aging. J. dermatol. surg. oncol., v. 16, p. 915-922, 1990.