

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AGRÁRIAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Salvia officinalis (Lamiaceae) Lin.: caracterização química, atividade
citotóxica e apoptótica em células de mamíferos

CHARLENE SILVESTRIN CELI GARCIA

Caxias do Sul

2014

CHARLENE SILVESTRIN CELI GARCIA

***Salvia officinalis* (Lamiaceae) Lin.: caracterização química, atividade
citotóxica e apoptótica em células de mamíferos**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau
de Mestre em Biotecnologia.**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Roesch Ely

**Co-Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pegas
Henriques**

Caxias do Sul

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

G216s Garcia, Charlene Silvestrin Celi, 1983-
Salvia officinalis (Lamiaceae) Lin. : caracterização química, atividade
citotóxica e apoptótica em células de mamíferos / Charlene Silvestrin
Celi Garcia. – 2014.
xiii, 96 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.
Orientadora: Profa. Dra. Mariana Roesch Ely. Coorientador: Prof. Dr.
João Antonio Pegas Henriques.

1. Análise química qualitativa - Sálvia. 2. Cromatografia a gás. 3.
Antioxidantes. 4. Câncer - Tratamento. 5. Lamiaceae. I. Título.

CDU 2.ed.: 543.061:582.929.4

Índice para o catálogo sistemático:

1. Análise química qualitativa - Sálvia	543.061:582.929.4
2. Cromatografia a gás	543.544.3
3. Antioxidantes	66.094.3-097.8
4. Câncer - Tratamento	616-006
5. Lamiaceae	582.929.4

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Roberta da Silva Freitas – CRB 10/1730

CHARLENE SILVESTRIN CELI GARCIA

Salvia Officinalis (LAMIACEAE) LIN.: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA,
ATIVIDADES CITOTÓXICA E APOPTÓTICA EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul, visando à obtenção do título
de Mestra em Biotecnologia.

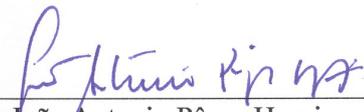
Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Mariana Roesch Ely

Co-orientador Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

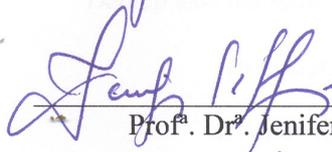
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05 DE SETEMBRO DE 2014.



Prof^ª. Dr^ª. Mariana Roesch Ely



Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques



Prof^ª. Dr^ª. Jenifer Saffi



Prof^ª. Dr^ª. Temenouga Nikolova Guecheva



Prof^ª. Dr^ª. Joséli Schwambach

Dedico este trabalho À Deus, ... “tu cujo o nome é Jeová, Somente

tu és o Altíssimo sobre toda a terra”. (Salmos 83: 18).

A toda minha família por sempre estarem ao meu lado,

em especial ao meu AMADO MARIDO

*Dr. Paulo Miguel Celi Garcia o maior
responsável pela minha formação e por*

“fazer tudo isto acontecer”.

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora Prof^ª. Dr^ª. Mariana Roesch Ely, por ter me incentivado a trilhar este caminho científico e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao meu Co-Orientador Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques, por passar para mim que ter a oportunidade de fazer ciência é algo maravilhoso em nossa vida.

Aos colaboradores desta pesquisa, Prof^ª. Dr^ª. Mirian Salvador, Prof^ª. Dr^ª. Joséli Shuwambach, Prof. Dr. Sidnei Moura, Prof^ª. Dr^ª. Melissa Schwanz, Dr. Thiago Barcellos e demais Professores do Centro de Biotecnologia da UCS pelos auxílios prestados.

Ao Coordenador do PPGB Prof. Dr. Aldo Dillon por disponibilizar sua atenção com todos os alunos. Agradeço a amizade de nossa secretária do PPGB Lucimara Serafini.

Aos meus colegas do Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA, pois durante estes anos, vocês foram minha segunda família, obrigada pelo auxílio e amizade.

À Universidade de Caxias do Sul, e ao apoio financeiro da CAPES e FAPERGS.

À minha mãe Nilve, minha irmã Débora, meu sobrinho Victor e meu cunhado João, pelo carinho amizade e por estarem sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amados avós Lúcia e Leondino. Vô o Senhor sabe que este trabalho foi realizado com a “*sua sálvia*”, obrigada por todos estes anos ter cultivado “*nossa plantinha*”.

Ao meu amado marido Dr. Paulo Miguel Celi Garcia por estar em todos os momentos ao meu lado e por ter me ensinado a ser uma cientista, você é o amor da minha vida.

Por fim, à Jeová por me dar forças quando preciso e estar sempre ao meu lado.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 <i>Salvia officinalis</i> (L.)	16
2.1.1 Composição química da <i>Salvia officinalis</i> (L.)	17
2.1.2 Atividade biológica da <i>Salvia officinalis</i> (L.)	19
2.2 Espécies reativas de oxigênio (ERO)	26
2.3 Morte celular	28
2.4 Considerações gerais sobre o câncer	32
3. OBJETIVOS	36
3.1 Objetivos específicos	36
4. RESULTADOS	37
4.1 CAPÍTULO I	

Avaliação in vitro do potencial biológico da <i>Salvia officinalis</i> (L.) em células tumorais	38
4.2 CAPÍTULO II	
Brazilian <i>Salvia officinalis</i> (Lamiaceae): Chemical characterization, antioxidant activity and antitumor properties in mammal cells	46
5. DISCUSSÃO GERAL	73
6. CONCLUSÕES	81
7. PERSPECTIVAS	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagens de *Salvia officinalis* (L.) (sálvia). **(A):** folhas do arbusto. **(B):** flor em detalhe. Fonte: <http://www.flickr.com/photos/peporion51/8380403575/lightbox/> 4
- Figura 2.** Estimativa do número de novos casos de câncer no Brasil nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste, Centro-Oeste e Norte para 2014. *Fonte: MS/INCA/Estimativa de Câncer no Brasil, 2013 22

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Sobrevivência da linhagem Hep-2 em comparação ao controle com etanol 80% (v/v) e diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. após 1h30min de tratamento 28
- Figura 2.** Sobrevivência da linhagem HepG-2 em comparação ao controle com etanol 80% (v/v) e diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. após 1h30min de tratamento 28
- Figura 3.** Comparação de sobrevivência após tratamento em Hep-2: **(A)** controle negativo de etanol 80% (v/v); **(B)** IC₅₀ 0,38±0,02 mg/mL do extrato de *Salvia officinalis* L..... 29
- Figura 4.** Comparação de sobrevivência após tratamento em HepG-2: **(A)** controle negativo de etanol 80% (v/v); **(B)** IC₅₀ 0,54±0,03 mg/mL do extrato de *Salvia officinalis* L..... 29

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Compounds were identified on GC-MS (gas chromatograph coupled with mass spectrometry) 45

Figura 2. Molecular structures of the main compounds detected in hydroalcoholic and aqueous extracts of *Salvia officinalis* (L) 46

Figura 3. Morphologically changes of cells treated for 24 h with ExtHS and ExtAS at $IC_{(50\%)}$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) compared to negative control. Photomicrographs were taken under light microscopy (200x). Capital letters indicate different cell lines. Cells fixed and stained with Giensa are represented at each first and second columns. Negative controls (untreated group) are represented at top lines and treated group (ExtHS and ExtAS at IC_{50} $\mu\text{g.mL}^{-1}$) at the bottom panel of each line. A: HeK-293 cell line. B: MRC-5 cell line. C: A-375 cell line. D: A-549 cell line. E: HeLa cell line. F: Hep-2 cell line. G: HT-29 cell line 49

Figura 4. Percent of cells immunostained in late apoptosis (Annexin V positive/PI positive) and/or necrosis (PI positive). Results were obtained from three independent experiments. Each bar represents the average percentage of late apoptosis/necrosis \pm SD relative to control, which was normalized to 100%. Letters correspond to statistically significant differences using ANOVA-Tukey test ($p \leq 0.05$) 50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais compostos fenólicos presentes na <i>Salvia officinalis</i> (L.)	5-6
Tabela 2. Avaliação do potencial citotóxico do óleo essencial de <i>S. officinalis</i> em células tumorais (Vasko et al., 2014)	11
Tabela 3. Avaliação do potencial citotóxico do extrato hexânico de <i>S. officinalis</i> em células tumorais (Zare Shahneh et al., 2013b)	12

CAPÍTULO I

Tabela 1. Ensaio de viabilidade celular com linhagens Hep-2 e HepG2. Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular – IC ₅₀ –obtido do extrato hidroalcoólico de <i>Salvia officinalis</i> L. e controles positivos de cisplatina, doxorubicina, <i>t</i> -BOOH e H ₂ O ₂	30
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1. Major constituents (expressed as peak area percentage) of hydroalcoholic extract of <i>S. officinalis</i> identified by GC-MS analysis	44
Tabela 2. Main compounds identified by ESI-QTOF MS/MS analysis of the hydroalcoholic and aqueous extract of <i>Salvia officinalis</i> (L.)	46
Tabela 3. <i>In vitro</i> antioxidant activity, DPPH [•] , ABTS ⁺⁺ , superoxide dismutase- <i>like</i> and catalase- <i>like</i> activities in <i>Salvia officinalis</i> (L.) hydroalcoholic and aqueous extracts	47
Tabela 4. IC ₅₀ values – 50% inhibitory concentration obtained in the MTT assay for tumor and non-tumor cell after <i>S. officinalis</i> exposure	48

LISTA DE ABREVEATURAS

μg	Micrograma
μm	Micrometro
μmol	Micromol
μM	Micromolar
ABTS ^{•+}	radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio)
CAT	enzima catalase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	desvio padrão
DPPH [•]	radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DNA	ácido desoxirribonucleico
ESI	ionização por <i>electrospray</i>
g	Gramas
GC	cromatografia gasosa
GPx	glutathione-peroxidase
HO [•]	radical hidroxila
IC ₅₀	concentração inibitória de 50% do crescimento celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	Litro
mL	Mililitro
MS	espectrometria de massas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico
NCI	<i>United State National Cancer Institute</i>

NHM	<i>Natural History Museum</i>
$O_2^{\cdot-}$	ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	tampão fosfato salino
PS	Fosfatidilserina
PI	iodeto de propídeo
ERO	espécies reativas de oxigênio
SFB	soro fetal bovino
SOD	enzima seróxido-dismutase
TL	tampão de ligação
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

Salvia officinalis (Lamiaceae), conhecida popularmente como sálvia, tem sido muito utilizada no sul do Brasil como condimento nos alimentos, tintura hidroalcoólica e chá para o tratamento de vários distúrbios de saúde. As propriedades dessa planta são estudadas por apontar possíveis mecanismos de ação antioxidante e antitumoral. Neste trabalho, o extrato hidroalcoólico e aquoso de sálvia foram analisados quimicamente por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS) e *electrospray* de alta resolução acoplada a espectrômetro de massas (ESI-QTOF MS/MS) em modo negativo. A identificação química mostrou a presença de ácidos como caféico, rosmarínico, málico, succínico, tartárico, cítrico, ursólico e compostos como luteolina-7-*O*-glucoronide, eucaliptol, β -tujona, β -cariofileno, α -cariofileno, α -tujona, cânfora viridiflorol, mannosol, rosmanol e seus isômeros metilcarnosato e ácido 12-metoxicarnosinico. Os extratos apresentaram compostos polifenólicos com capacidade de varrer os radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), além de atividade catalase (CAT-*like*) e superóxido dismutase (SOD-*like*). Ambos os extratos apresentaram menor citotoxicidade em linhagens não tumorais (HeK-293 e MRC-5) e seletividade para linhagens tumorais (Hep-2, HeLa, A-549, HT-29, A-375 e HepG2). Além disso, verificou-se que o aumento do tempo de exposição ao extrato hidroalcoólico diminuiu a viabilidade em linhagens tumorais. Foram observadas alterações morfológicas por coloração de Giemsa e a avaliação da apoptose com anexina V e iodeto de propídeo mostraram a maioria das células tumorais em estágios finais do processo de apoptose e necrose após 24h de tratamento em ambos os extratos. Sugere-se que o extrato de *Salvia officinalis* (L.) possui atividade biológica em células tumorais, podendo ser objetivo de mais estudos com a finalidade de comprovar sua eficácia como possível agente para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: antioxidantes; apoptose; câncer; citotoxicidade; *Salvia officinalis* (L.).

ABSTRACT

Salvia officinalis (Lamiaceae), popularly known as sage, has been used in south of Brazil as a condiment in foods, as tincture and tea for the treatment various health disorders. The properties of this plant have been studied and suggest possible mechanisms of antioxidant and antitumor action. Here, the sage hydroalcoholic and aqueous extract were chemically analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and by high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (ESI-HRMS) in negative mode. The chemical identification showed the presence of acids as caffeic, rosmarinic, malic, succinic, tartaric, citric, ursolic and compounds like luteolin-7-*O*-glucuronide, eucalyptol, β -thujone, β -caryophyllene, α -caryophyllen and α -thujone, camphor, viridiflorol, mannol, rosmanol and its isomers methylcarnosate and 12-methoxycarnosinic acid. The extracts showed the content of polyphenolic compounds, ability to scavenge the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^{*}) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{*+}), moreover catalase (CAT-like) and superoxide dismutase (SOD-like) activity. Both extracts showed lower cytotoxicity in non-tumor lines (HEK-293 and MRC-5) and selectivity for tumor cell lines (Hep-2, HeLa, A-549, HT-29, A-375 e HepG2). Furthermore, it was found that increasing the treatment exposure time of the hydroalcoholic extract decreases the tumor cell viability. Morphological changes by giemsa were observed and staining for annexin V and propidium iodide showed majority of tumor cells at late stages of the apoptotic process and necrosis after 24h treatment with both extracts. The results of this study suggest that the extract of *Salvia officinalis* (L.) has biological activity against tumor cell and may be the objective of further studies in order to prove its effectiveness as a possible agent for the treatment of cancer.

Key words: antioxidant; apoptosis; cancer; cytotoxicity; *Salvia officinalis* (L.).

1. INTRODUÇÃO

O interesse nas pesquisas em plantas medicinais tem crescido nos últimos anos, principalmente para o tratamento de patologias que apresentam um grande impacto social, como é o caso do câncer, que é a segunda causa de morte na população, precedida apenas por doenças de origem vascular. O estudo de diversas áreas como medicina e biotecnologia para o desenvolvimento de medicamentos provenientes de produtos naturais tem se tornado uma estratégia altamente promissora para identificação de novos agentes antitumorais.

O gênero *Salvia* apresenta cerca de 900 espécies, dentre estas, algumas despertam interesse científico como a *Salvia divinorum* (E.J.) pelo seu efeito psicoativo; *Salvia miltiorrhiza* (D.) utilizada para problemas cardiovasculares; *Salvia sclarea* (L.) pela atividade antibacteriana e adstringente; *Salvia plebeia* (R.) apresenta atividade antioxidante e *Salvia officinalis* (L.) pela sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, hipoglicemiante e, mais recentemente, antitumoral. A *Salvia officinalis* (L.), conhecida popularmente como sálvia, é encontrada no Brasil, adaptou-se muito bem ao estado do Rio Grande do Sul e até hoje é utilizada como condimento diário, na fabricação de cosméticos, assim como em tinturas hidroalcoólicas e chás para o tratamento de várias doenças na medicina tradicional e popular.

As propriedades medicinais da *Salvia officinalis* (L.) veem sendo investigadas por longo tempo e utilizadas para diversas finalidades, porém as pesquisas relacionadas com sua atividade antitumoral são poucas. Alguns estudos com extratos totais de sálvia e de seus compostos químicos estão sendo empregados para determinar a citotoxicidade e seletividade desta planta em linhagens tumorais e não tumorais. Além disso, a determinação de seus compostos fenólicos e sua atividade antioxidante podem elucidar os mecanismos celulares em resposta a ação da planta para prevenir a formação de espécies reativas de oxigênio, no qual

estão envolvidas doenças neurodegenerativas, vasculares e câncer. A sálvia possui, entre outros mecanismos de ação, atividade antiinflamatória e antioxidante, possíveis responsáveis pela atividade antitumoral, bem como compostos químicos associados à sinalização de diversas vias metabólicas, o que induz à parada do ciclo celular e conseqüentemente desencadeia o processo bioquímico que leva à apoptose celular.

A apoptose é um tipo de morte celular programada que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas no organismo dos seres vivos, desempenhando assim um importante papel no processo vital para a manutenção celular através de mecanismos de remoção de células que apresentam danos ao DNA, manutenção da homeostase e regulação fisiológica do tamanho de tecidos. Além disso, a ausência de apoptose pode estar associada a doenças celulares proliferativas, como é o caso do câncer. Estudos do ciclo celular com a utilização de marcadores relacionados a apoptose permitem uma melhor avaliação da indução à morte de células tumorais.

Tendo em vista os resultados promissores obtidos nas últimas décadas com estudos quimiofarmacológicos dos compostos presentes na *Salvia officinalis* (L.) e a atividade biológica de seus extratos, este trabalho teve como objetivo inicial caracterizar quimicamente os extratos hidroalcoólico e aquoso de sálvia por *electrospray* de alta resolução acoplada a espectrômetro de massas (ESI-QTOF MS/MS) e cromatografia gasosas acoplada a massas (GC-MS). Além disso, buscou-se identificar a presença de compostos fenólicos, atividade antioxidante e atividade antitumoral *in vitro* dos extratos, comparando-se a citotoxicidade em cultura de células tumorais de carcinoma de larige humano (Hep-2), hepatoma humano (HepG2), adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa), carcinoma de pulmão (A-549), melanoma (A-375), adenocarcinoma de cólon (HT-29) e não tumorais embrionárias de rim humano (HeK-293) e fibroblasto de pulmão humano (MRC-5). Somado a isso, buscou-se

analisar a morte celular por apoptose pelos ensaios *in situ* utilizando coloração Anexina-V/PI e brometo de etídio/laranja acridina.

2. Revisão bibliográfica

2.1 *Salvia officinalis* (L.)

Salvia officinalis é uma planta medicinal originária da região mediterrânea Oriental, cultivada em vários países, pertencente à família Lamiaceae ou Labiatae, descrita e catalogada na obra Species Plantarum de 1753, por Linnaeus (NHM, 2012). A sálvia (Figura 1) é uma planta herbácea ou arbustiva perene, medindo entre 20 a 80 cm de altura; suas folhas tem coloração verde acinzentada com superfície rugosa e pecíolos mais ou menos longos que as unes ao caule, suas flores são melíferas, muito procuradas pelas abelhas, e apresentam coloração violácea, surgindo em inflorescência na forma de espiga. Esta planta encontra-se geralmente em áreas de clima temperado, onde há luz solar abundante e desenvolve-se bem em solos drenados e argilo-arenosos (Martins et al., 2000).



Figura 1. Imagens de *Salvia officinalis* (L.): **A-** folhas do arbusto. **B-** flor em detalhe.
Fonte: <http://www.flickr.com/photos/peporion51/8380403575/lightbox/>

O gênero sálvia apresenta cerca de 900 espécies em todo o mundo, distribuídas principalmente nas regiões do Mediterrâneo, Sudeste da África, América Central e América do Sul (Kamatou et al., 2008). Cerca de 60 espécies são encontradas no Brasil, onde 16 destas localizam-se na região Sudeste e Sul do país (Serafini et al., 2002; Mossi et al., 2011). Essa planta é conhecida popularmente no Brasil como sálvia, salva-das-boticas, erva-santa, salva-mansa (Bruneton, 2001; Simões et al., 2004). Adaptou-se muito bem ao estado do Rio Grande do Sul e até hoje é utilizada como condimento diário, na fabricação de cosméticos, assim como em tinturas hidroalcoólicas e chás para o tratamento de várias doenças na medicina tradicional e popular (Lu & Foo, 2002; Cunha, 2004).

2.1.1 Composição química da *Salvia officinalis* (L.)

Salvia officinalis (L.) apresenta em sua composição óleo essencial, compostos fenólicos, taninos, saponinas, substâncias estrogênicas e proteínas (Bruneton, 2001; Cunha, 2004), porém a quantidade destes compostos químicos pode variar conforme as estações do ano, local e o tipo de solo (Viecelli & da Cruz-Silva, 2009). Os flavonoides são largamente distribuídos nas espécies de sálvia, e na *Salvia officinalis* (L.) estão presentes em concentrações de 1 a 3% como flavonas (6-hidroxiladas), flavonóis e glicosídeos (Lu & Foo, 2002) (Tabela – 1).

Tabela 1. Principais compostos fenólicos presentes na *Salvia officinalis* (L.).

Composto	Referência
<u>Flavonóides</u>	
Apigenina	Cuvelier et al., 1996
Genkvanin	Cuvelier et al., 1996
-7,40-Dimetil éter	Cuvelier et al., 1996
Luteolina	Brieskorn & Biechele, 1971
-7-Metil éter	Brieskorn & Biechele, 1971
Scutelareina	Cuvelier et al., 1996

Hispidulina	Brieskorn & Biechele, 1971
Cirsimaritina	Masterova et al., 1996
-5,6,7,4'-tetrametil éter	Brieskorn & Biechele, 1971
Nipetina ou eupafolina	Brieskorn & Biechele, 1971
Cirsiliol	Brieskorn & Biechele, 1971
Isocutelarina	Cuvelier et al., 1996
Cosmoseiina	Masteronova et al., 1996
-7-glucuronide	Lu & Foo, 2000
-3'-glucuronide	Lu & Foo, 2000
Homoplantagenina	Wang et al., 1998
Salvagenina-5-glicosídeo	Lu & Foo, 2000
6-Hidroxluteolin-7-glicosídeo	Lu & Foo, 2000
Vicenina-2	Lu & Foo, 2000
<u>Ácidos fenólicos</u>	
Ácido 4-hidroxibenzóico	Wang et al., 2000
Ácido vanilínico	Cuvelier et al., 1996
Herniarina	Wang et al., 2000
Ácido cafeico	Wang et al., 2000
Ácido ferúlico	Cuvelier et al., 1996
Ácido rosmarínico	Wang et al., 1998
Ácido salvianolínico I	Lu & Foo, 1999
Metil salvianolato I	Lu & Foo, 1999
Sagecoumarina	Lu & Foo, 1999
Ácido salvianolínico K	Lu & Foo, 1999
<i>trans-p</i> -Coumarico ácido 4-(2apiosil) glicosídeo	Lu & Foo, 2000
6-Feruloil- α -glicose	Lu & foo, 2000
6-Feruloil- β -glicose	Wang et al, 1998
1-(2,3,4-Trihidroxi-3-metil)butil-6-feruloilglicosídeo	Wang et al, 1998
6-Cafeoil-1-fructosil- α -glicosídeo	Wang et al, 2000
1-Cafeoil-6-aposilglicosídeo	Wang et al., 1999
1- <i>p</i> -Hidroxibenzoil-6-aposilglicosídeo	Wang et al, 1999
Piceina	Wang et al, 1998
4-Hidroxiacetofenona 4-(6-aposil)glicosídeo	Wang et al, 1998
4-hidroxiacetofenona 4-(2-(5-siringoil)aposil)glicosídeo	Wang et al, 2000
1-Hidroxipinoresinol 1-glicosídeo	Wang et al, 1998
Isolariciresinol 3 α -glicosídeo	Wang et al, 1998
2-(3-Metoxi-4-glucosiloxifenil)-3-hidroximetil-5-(3-hidroxipropil)-7- metoxi-2,3-dihidrobenzofurano	Wang et al, 1998

Esta planta apresenta óleo essencial (1-2,8%) e entre seus principais constituintes estão: α e β -tujonas (cetonas nonoterpênicas bicíclicas), α -terpineol, linalol livre e

esterificado, óxido de cariofileno, cineol, d-terpinol, α -pineno, mirceno, canfeno, limoneno, ocimeno, alo-ocimeno, p-canfeno, aromadendreno, α e β -cariofileno, humuleno, α -maalieno, α -corocaleno, β -copaeno, isovalerianato de metila, cânfora, viridiflorol, timol, acetato de bormilo, acetato de sabinol e acetato de linalol (Alonso, 2004; Simões et al., 2004; Porte et al., 2013). Também são encontrados compostos amargos diterpênicos como o carnosol, o ácido carnosílico, rosmanol, manool, ácidos úricos, taninos hidrolisáveis e condensados, aspargina, oleorresina, ácido fosfórico, ácido oxálico, ácido ursólico, ácido oleanico, ácido nítrico (Alonso, 2004). Os polissacarídeos em maior concentração são arabinose, galactose, 3-O-metilgalactose, glicose, manose, xilose, fucose e mamnose (Gilli et al., 1994). A constituição da sálvia abrange compostos fenólicos de alta atividade anti-inflamatória e anti-oxidantes, possíveis responsáveis pela atividade antitumoral (Xavier et al., 2009; Ramos et al., 2010).

2.1.2 Atividade biológica da *Salvia officinalis* (L.)

O interesse na pesquisa de plantas medicinais tem aumentado e a maioria dos estudos tem seu foco no tratamento de patologias que têm um grande impacto social. Atualmente, muitos estudos estão sendo realizados com *S. officinalis* (L.) para avaliar a sua atividade. Os resultados têm demonstrado que esta planta apresenta potencial farmacológico como anti-inflamatória (Rodrigues et al., 2012a), antimicrobiana (Weckesser et al., 2007; Garcia et al., 2012a), hipoglicemiante (Shafiee-Nick et al., 2012), antidiabética (Christensen et al., 2010), antioxidante (Generalic et al., 2012), no tratamento de doenças neurodegenerativas (Akhondzadeh et al., 2003), dermatites (Takano et al., 2011) e tratamento de neoplasias (Slamenova et al., 2004; Xavier et al., 2009; Al-Barazanji et al., 2013).

Muito conhecida por suas propriedades anti-sépticas, cicatrizante, bactericida e antioxidante, Pereira et al. (2004) demonstraram que o óleo essencial de *S. officinalis* (L.) apresentou importante atividade antimicrobiana frente a 100 cepas de bactérias isoladas de

indivíduos com diagnóstico de infecção urinária. Após 24 horas o óleo essencial de *S. officinalis* (L.) mostrou eficácia de 100% quando testada em espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*, 96% contra *Escherichia coli*, 83% contra *Proteus mirabilis* e 75% contra *Morganella morganii*.

Alguns fungos que estão presentes na microbiota da pele, das mucosas e trato gastrintestinal são causadores de candidíase oral, vulvovaginites, candidíase cutânea, onicomicoses, podendo evoluir para infecções sistêmicas (Mims, 1999; Butel & Morse, 2009). O óleo essencial de sálvia tem sido usado em formulações farmacêuticas, possuindo um largo espectro de ação antifúngica com atividade contra dermatófitos, *Candida sp.* e fungos filamentosos (Pinto et al., 2007). Segundo Molina et al. (2010) o extrato glicólico de sálvia apresenta capacidade fungicida para 80% das cepas de *Candida albicans*.

Na Jordânia, estudos realizados com sálvia demonstraram que seu óleo essencial, o qual é rico em 1,8-cineol e cânfora, não mostrou em concentrações de IC_{50} $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ atividade citotóxica para células não tumorais de queratinócitos humanos (HaCat). Entretanto, foi observado uma importante atividade anti-inflamatória, pois diminuiu significativamente a produção de óxido nítrico em macrófagos (Abu-Darwish et al., 2013). Neste contexto, Abu-Drawish et al. (2013) relataram que a incorporação do óleo essencial de sálvia em formulações, torna-se uma possibilidade para o tratamento da pele.

Em células tumorais RINm5F de insulinoma de rato, o extrato hexânico de sálvia aumentou os níveis de óxido nítrico, desta forma, ativando a promoção de genes pró-apoptóticos e suprimindo genes anti-apoptóticos (Kontogianni et al., 2013). Experimentos *in vivo* com modelos murinos demonstraram que o tratamento com extrato hidroalcoólico de sálvia nas concentrações de 10, 30 e 100 mg kg^{-1} inibiu a quantidade de leucócitos totais circulantes, reduzindo as fases de inflamação e com efeitos antinoceptivos, atribuídos

principalmente ao ácido ursólico, que pode ter influência modulatória em receptores da dor TRPA1 (Rodrigues et al., 2012a).

Recentemente Taari et al. (2010) demonstrou que o extrato aquoso de *S. officinalis* (L.) da Tunísia tem grande quantidade de compostos polifenólicos ($34,58 \pm 0,97$ mgGAE g^{-1}), determinados pelo ensaio Folin-Ciocalteu, e alta capacidade em eliminar radicais livres DPPH[•] (IC_{50} $46,0 \pm 1,50$ $\mu g mL^{-1}$). Estes achados corroboram com os obtidos para o extrato hexânico de *S. officinalis* (L.) da Sérvia, o qual na concentração de IC_{50} evidenciou-se a capacidade de eliminar o radical DPPH[•] ($78,0 \pm 1,7$ $\mu g mL^{-1}$). Esta atividade antioxidante do extrato foi atribuída ao teor de diterpenos fenólicos, tais como o ácido carnósico e os seus isômeros, o carnosol e rosmanol (Kontogianni et al., 2013).

A análise de 16 chás de sálvia vendidos comercialmente nos Estados Unidos demonstrou pelo ensaio Folin-Ciocalteu que o conteúdo de polifenóis pode variar 6,7 a 15,2 mmol equivalentes de Trolox (TE)/100 mL (Walch et al., 2011). De acordo com Lamaison et al. (1990), algumas espécies do gênero *Salvia* mostram significativa atividade antioxidante em extratos hidroalcoólicos utilizando a metodologia de DPPH[•], tais como *Salvia lavandulifolia* (IC_{50} 80 $\mu g mL^{-1}$), *Salvia officinalis* (IC_{50} 41 $\mu g mL^{-1}$), *Salvia sclarea* (IC_{50} 45 $\mu g mL^{-1}$), e *Salvia triloba* (IC_{50} 50 $\mu g mL^{-1}$). Zhao et al. (2006) mostraram que o potencial antioxidante da sálvia foi maior que *Salvia miltiorrhiza* e *Panax ginseng* usando também reação com DPPH[•].

Em contribuição a atividade antioxidante, Bem Salen et al. (2013) avaliaram o potencial do extrato aquoso de sálvia da Tunísia, o qual apresentou valores de $21,2 \pm 0,93$ e $76,4 \pm 4,03$ equivalentes Trolox/g para os ensaios de DPPH[•] e ABTS^{•+}. Compostos polifenólicos isolados da sálvia como o ácido caféico e ácido rosmarínico quando utilizados em ensaios enzimáticos demonstraram potencial para inibir a taxa de formação de adenocromo com valores entre 260 e 230 unidades de Superóxido dismutase equivalentes

(SOD unidades/mg) (Lu & Yeap Foo, 2001). Estudos realizados com *S.officinalis* (L.) apresentaram quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante que variaram conforme a localização em que a planta é cultivada, um dos fatores que contribuem para esta mudança é o excesso de salinidade no solo, que reduz a quantidade de fenólicos totais que são responsáveis pela atividade antioxidante (Tounekti et al., 2011).

Atualmente, a atividade citotóxica *in vitro* em cultura de células tumorais tem se tornado importante para a identificação de agentes anticâncer e a citotoxicidade celular pode ser avaliada por vários métodos (Finimundy et al., 2013). Uma das alternativas é o ensaio clonogênico que permite verificar de forma direta a capacidade de uma célula em proliferar-se indefinidamente, mantendo assim a sua capacidade reprodutiva e a habilidade de formar colônias após o tratamento com os compostos em estudo, porém esta metodologia envolve um maior tempo e maior variabilidade de análise da amostra (Mirabelli et al., 1985).

Dentre os métodos para avaliar a viabilidade celular o ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) vem se destacando por tratar-se de um teste indireto, preciso e de execução rápida, baseado em uma reação colorimétrica (Frozza et al., 2013). O sal MTT de coloração amarela, quando incubado com células metabolicamente ativas, entra na mitocôndria e é reduzido pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais de formazan, com coloração azul escuro, assim a densidade óptica resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (Sylvester, 2011).

A atividade citotóxica tem sido descrita para vários extratos e óleos essenciais extraído de plantas, como é o caso da *S. officinalis* (L.) (Loizzo et al., 2007). Alguns estudos relataram que a sálvia apresenta atividade antineoplásica, tendo potencial no tratamento do câncer *in vivo* quando utilizada em modelos murinos (Ho et al., 2000). Segundo Vasko et al., (2014), o óleo essencial de *S. officinalis* (L.) adquirido comercialmente da *Calendula ojsc* (Stará

Ľubovňa, Slovakia) foi testado em linhagens tumorais (Tabela – 2), reduzindo a viabilidade após 72 horas de exposição, isto foi atribuído a capacidade que a sálvia teve para modificar o equilíbrio redox destas linhagens tumorais.

Tabela 2. Avaliação do potencial citotóxico do óleo essencial de *S. officinalis* (L.) em células tumorais^a.

Linhagem celular	IC₅₀ µg mL⁻¹
HeLa (carcinoma de colo de útero humano)	158,24
CEM (leucemia timoblástica aguda humano)	57,68
MCF-7 (câncer de mama humano)	115,81
A-549 (carcinoma pulmonar humano)	101,89
MDA (adenocarcinoma de mama humano)	165,79
Caco 2 (adenocarcinoma coloretal humano)	173,09

^a Adaptado de Vasko et al. (2014).

Ensaio de viabilidade com MTT realizados com células tumorais e não tumorais (Tabela 3), demonstraram que o extrato hexânico de *S. officinalis* (L.) apresentou maior citotoxicidade para linhagens tumorais, indicando uma possível seletividade para estas células (Zare Shahneh et al., 2013a). Além disso, comprovou-se que o extrato metanólico de sálvia pode ter atividade citotóxica em células tumorais (Zare Shahneh et al., 2013b).

Neste contexto, recentemente Zare Shahneh et al. (2013b) demonstraram que o tempo de exposição ao extrato metanólico pode diminuir a viabilidade celular. Após 12 horas de tratamento a célula tumoral Raji apresentou IC₅₀ 239,692 µg mL⁻¹ e com o aumento do tempo de exposição para 24 horas ocorreu diminuição da viabilidade celular IC₅₀ 163,187 µg mL⁻¹ e 48 horas IC₅₀ 130,597 µg mL⁻¹, para a linhagem U937 após 12 horas IC₅₀ 304,322 µg mL⁻¹ e decréscimo da viabilidade em 24 horas IC₅₀ 229,312 µg mL⁻¹ 48 horas IC₅₀ 161,825 µg mL⁻¹. O mesmo também foi observado para KG-1A em 12 horas IC₅₀ 345,623 µg mL⁻¹ e diminuição

da viabilidade IC_{50} 214,377 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com tratamento de 24 horas e IC_{50} 152,182 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 48 horas.

Tabela 3. Avaliação do potencial citotóxico do extrato hexânico de *S. officinalis* (L.) em células tumorais^a.

Linhagem celular	IC_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$
Raji (linfoma de células B não-Hodkin humano)	166,89
U937 (linfoma de monócitos humanos)	205,11
KG-1A (leucemia mieloide aguda humana)	179,00
MCF-7 (câncer de mama humano)	142,43
PC3 (câncer de próstata humano)	75,78
WEHI-164 (fibrosarcoma de rato)	39,95
HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana)	>600

^a Adaptado de Zare Shahneh et al. (2013a).

S. officinalis (L.) apresenta em sua composição três diterpeno-quinonas: roioleanone (SAR 3), horminone (SAR 26) e 7-*O*-acetil-horminone (SAR 43), que são capazes de causar condutividade de prótons em membranas lipídicas, exercendo ação desacopladora da respiração e fosforilação mitocondrial *in vitro* (Spiridonov et al., 2003). Segundo estudos realizados com linhagens de células humanas de carcinoma de cólon (Caco-2) e hepatoma (HepG2) quando tratadas com diterpenóide-quinonas, isoladas da *S. officinalis*, podem causar a inibição da enzima topoisomerase I, induzir a parada do ciclo celular e a ativação da cascata bioquímica da apoptose, agindo citotoxicamente nas células, causando dano ao DNA e aumentando a apoptose celular (Slamenova et al., 2004).

Segundo El Hadri et al. (2010) o alfa-humuleno e trascariofileno presentes na *S. officinalis* (L.) podem contribuir para inibição do crescimento de células tumorais. Pesquisas evidenciam que a sálvia inibiu o crescimento de adenocarcinoma renal (ACHN) e carcinoma

de próstata (LNCaP), demonstrando atividade citotóxica frente a estas células (Loizzo et al., 2007).

A angiogênese é um dos processos envolvidos na promoção do câncer e metástases, segundo Keshavarz et al. (2010), a *S. officinalis* (L.) inibiu a formação de tubo capilar diminuindo a angiogênese em células endoteliais de ratos, além de mostrar uma atividade dose-dependente sobre a migração nestas células. Em adição, Xavier et al. (2009) mostraram que *S. officinalis* (L.) induziu a apoptose e inibiu a proliferação em células de carcinoma cólon retal que apresentam mutações na cascata das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK/ERK) que estão relacionados ao aumento da proliferação do câncer.

As proteases estão envolvidas nas fases de progressão do câncer, incluindo o aumento da proliferação celular, metástases, diminuição da apoptose e indução a resistência de medicamentos antitumorais (Rakashanda et al., 2012). Segundo Jedinák et al. (2006), o ácido β -ursólico isolado da *S. officinalis* (L.) tem capacidade de inibir proteases de serina (trombina, tripsina e uroquinase) e diminuir significativamente o número de colônias B16-F10 (metástese pulmômar de melanoma) em pulmões de ratos, indicando uma possível atividade anticancerígena.

Neste contexto, alguns estudos com a sálvia comprovam o aumento da indução da apoptose, tais como nas células de hepatoma (Hep-G2) (Slamenova et al., 2004), carcinoma colorretal (HT-29) (Xavier et al., 2009). Além disso, estudos *in vitro* com extrato hexânico das folhas de *S. officinalis* (L.) demonstraram fragmentação do DNA associado à histona (oligonucleossomo) através do ensaio ELISA, o qual caracteriza evento final do processo apoptótico em linhagens tumorais Raji, KG-1A e U937, sugerindo um efeito antiproliferativo do extrato, possivelmente por uma via dependente de apoptose (Zare Shahneh et al., 2013b).

2.2 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

A formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), nos eucariotos, ocorrem principalmente na mitocôndria durante os processos metabólicos endógenos de transferência de elétrons (Hekimi et al., 2011). O termo *estresse oxidativo* refere-se ao desequilíbrio celular entre os níveis de espécies reativas de oxigênio e suas defesas antioxidantes (Halliwell, 2007).

Destacam-se como principais ERO consideradas radicais livres, o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}). Além destes, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que não apresenta elétrons desemparelhados em sua última camada é uma espécie reativa considerada como composto não radicalar (Halliwell, 2007; Suzuki-Karasaki et al., 2014).

A redução de oxigênio durante o transporte de elétrons mitocondrial pode gerar o ânion superóxido, este pode participar na formação do radical hidroxila através da redução de quelatos de Fe^{3+} formando Fe^{2+} (Reação de Haber-Weiss) ou ser reduzido e produzir peróxido de hidrogênio, que pode atravessar facilmente membranas e reagir com proteínas ligadas ao ferro (Denicola & Radi, 2005). O radical hidroxila é formado a partir de peróxido de hidrogênio na presença de Fe^{2+} ou outro metal de transição (Reação de Fenton), este reage amplamente com aminoácidos, ácido desoxirribonucleico e ácido ribonucleico, além de estar envolvido na lipoperoxidação, processo de oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular (Halliwell, 2007; Valko et al., 2007).

Os antioxidantes reduzem os níveis de ERO, minimizando efeitos biológicos nocivos as células, podendo ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos (Simic & Jovanovic, 1994; Halliwell, 2007). Dentre os antioxidantes enzimáticos os mais estudados são a enzima superóxido dismutase (SOD) que é capaz de reduzir o $O_2^{\bullet -}$ formando H_2O_2 , o qual é menos reativo e pode ser degradado pelas enzimas catalase (CAT) ou glutiona peroxidase

(GPx), as quais exercem uma importante manutenção do equilíbrio redox celular (Chaillou & Nazareno, 2006).

Quanto aos não enzimáticos são formados por vitaminas, carotenoides e compostos fenólicos que podem atuar como antioxidantes primários ou sequestradores de radicais livres e secundários ou de prevenção (Choo et al., 2014). Os primários reagem diretamente com os radicais livres, doam átomos de hidrogênio transformando-os em espécies menos reativas, bloqueando reações de propagação da oxidação (Shahidi & Wanasundara, 1992). Os secundários reduzem taxa de oxidação, reparam antioxidantes primários, são supressores de oxigênio *singlete* ($^1\text{O}_2$) e quelantes de íons metálicos que catalizam reações de peroxidação lipídica (Chaillou & Nazareno, 2006).

O desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e antioxidantes enzimáticos/não enzimáticos pode ocasionar doenças inflamatórias, estresse oxidativo do tecido afetado e posteriormente o desenvolvimento de carcinogênese (Roessner et al., 2008). Estudos clínicos demonstraram que células cancerígenas utilizam ERO para estimular a proliferação, invasão, migração e angiogênese, inibindo os mecanismos de apoptose (Roessner et al., 2008; Kwee, 2014).

Atualmente, muitas pesquisas *in vitro* demonstram que frutas, vinhos, vegetais e chás, apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica, e estes benefícios á saúde têm sido atribuídos a presença de compostos fenólicos (Granato et al., 2014). Uma das metodologias mais utilizadas pra verificar o conteúdo de compostos polifenólicos totais presentes em extratos e produtos é a técnica de Folin-Ciocalteu (Rodrigues et al., 2012b). Este ensaio consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotúngico que se encontram no estado de oxidação, porém na presença de compostos fenólicos ocorre a formação de complexos molibdênio-tungstênio reduzidos, o qual ocasiona

a mudança da coloração do meio de amarelo para azul (Singleton et al., 1999; Ainsworth & Gillespie, 2007).

A determinação enzimática de antioxidantes pode ser realizada espectrofotometricamente através de experimentos que mimetizam a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Cassini et al., 2011). No ensaio *SOD-like* é avaliada a oxi-redução da adrenalina, formação de adrenocromo e redução da atividade da enzima (Bannister & Calabrese, 1987). Para o ensaio *CAT-like* avalia-se a velocidade de decomposição de H₂O₂ em diferentes intervalos de tempo na amostra estudada (Aebi, 1984).

Além destes, o ensaio de varredura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]) é um método indireto que determina de forma precisa e rápida a habilidade de compostos antioxidantes transferirem átomos de hidrogênio para o radical DPPH[•] (Brand-William et al., 1995; Cheng et al., 2006). O ensaio do cátion radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio) (ABTS^{•+}) avalia a presença de compostos antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos doadores de hidrogênio, e mede-se a diminuição da formação deste radical por espectrofotometria (Re et al., 1999; Kuskoski et al., 2005).

2.3 Morte celular

A morte celular pode ocorrer por dois mecanismos distintos: a apoptose e a necrose (Elmore, 2007). A apoptose é diferente da morte celular accidental por necrose, ocorre de forma programada e nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de diversos tecidos maduros, na resposta inflamatória e na eliminação de células após o dano celular por agentes genotóxicos (Elmore, 2007; Galluzzi et al., 2012). Alterações na coordenação da morte celular por apoptose, podem estar implicadas nos processos de tumorigênese (Grivicich et al., 2007).

Evidências demonstram que a resistência a apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos e o acúmulo de células tumorais em alguns tipos de câncer pode estar relacionado com o funcionamento anormal, por exemplo, das vias proliferativas Ki-67 (Kruger et al., 2013). A análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode acontecer em vários momentos do desenvolvimento tumoral. Uma vez que se explore o potencial apoptótico de células cancerosas, será possível desenvolver terapias alternativas menos tóxicas para células não tumorais devido aos mecanismos fisiológicos inerentes de controle de sobrevivência destas células (Hengartner, 2000).

O processo de morte celular programada ocorre com a retração da célula, a cromatina sofre condensação, o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear e a membrana celular forma prolongamentos que aumentam de número e tamanho, esses se rompem e originam estruturas contendo o material celular (Wyllie, 2010). Estas porções celulares são denominadas de corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório. Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação do DNA, por ativação de endonucleases (Saraste & Pulkki, 2000).

Entre muitas proteínas que participam do mecanismo de apoptose, algumas regulam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, como o Bcl-2, com ação anti-apoptótica, e um de seus antagonistas, o Bax, que mostra atividade pró-apoptótica (Hengartner, 2000). Já a proteína p53 tem sua expressão acumulada quando o DNA encontra-se danificado e previne a replicação celular, interrompendo o ciclo celular durante a interfase, dando tempo para que a célula se repare. Entretanto, se o dano ao DNA for extensivo e não houver reparo celular, p53 induzirá apoptose (Arrigo, 2007).

As vias de ativação apoptótica podem ocorrer por estímulos externos (via receptor - citoplasmática) ou por estímulos internos (via mitocondrial) (Fulda & Debatin, 2006). A via intrínseca da apoptose é ativada por estresse intracelular ou extracelular por falta de regulação nos fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes, os sinais transduzidos em resposta convergem principalmente para a mitocôndria (Hengartner, 2000).

A mitocôndria integra os estímulos de morte celular, induzindo ao aumento da sua permeabilidade e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma, sem a participação dos receptores de morte (Kumar et al., 2004). Além da liberação de moléculas, como o citocromo c que ativa a cascata das caspases, a perda da homeostasia celular interrompe a síntese de ATP e aumenta ainda mais a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Kroemer & Reed, 2000).

Já a via extrínseca é desencadeada por ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (Hengartner, 2000). Neste caso, são ativados receptores de morte (DR) que contêm um domínio citoplasmático, envolvido nas interações proteína-proteína, chamado de domínio de morte (Kumar et al., 2004). Quando os DR reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas que têm a capacidade de ativar a cascata das caspases, executando assim a morte por apoptose (Daniel et al., 2001).

Estudos relacionados com a morte de células cancerosas podem auxiliar no desenvolvimento de terapias alternativas menos tóxicas para células não tumorais, devido aos mecanismos fisiológicos inerentes de controle de sobrevivência destas (Hengartner, 2000). Deste modo, a avaliação de citotoxicidade e apoptose *in vitro* são metodologias que permitem explorar a atividade biológica de produtos isolados de diferentes fontes como primeira escolha em busca de moléculas com potencial atividade anticâncer (Frezza et al., 2014).

A apoptose celular pode ser avaliada pelo ensaio de fluorescência com brometo de etídio e laranja acridina (BE/LA) (Willingham, 1999). O laranja acridina consegue atravessar membranas celulares íntegras e ligar-se ao DNA, conferindo uma coloração esverdeada para a região do núcleo de células viáveis, além disso, também marca as células que se encontram na fase inicial de apoptose, de modo que são observadas manchas verdes nos núcleos das células, marcando a cromatina condensada. Entretanto o brometo de etídio atravessa apenas membranas não íntegras e coram preferencialmente células com apoptose tardia/necrose, que são visualizadas em microscopia de fluorescência em uma cor laranja-avermelhada (McGahon et al., 1995).

Outra metodologia que se destaca para avaliar a apoptose é o ensaio de anexina V conjugada ao isotiocinato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídeo (PI). Células que estão sob efeito de eventos celulares apoptóticos (ativação de caspases, estresse oxidativo e alterações citoplasmáticas na concentração de cálcio) sofrem uma desorganização, na qual modulam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, desestabilizando a interação entre o complexo citocromo c – cardiolipina (Sturm et al., 2006; Wu et al., 2006). O citocromo c é então liberado do espaço mitocondrial interno tendo função de uma peroxidase que oxida a fosfatidilserina (PS) permitindo sua translocação da superfície interna para a superfície externada da bicamada lipídica (Vanden Berghe et al., 2013).

Dessa forma, com a translocação da PS para a superfície da bicamada lipídica, esta fica exposta a marcadores celulares, como a anexina V que é uma proteína que tem alta afinidade de ligação a fosfolípidos de membrana, especialmente à fosfatidilserina, ligando-se através das suas cargas negativas na presença de íons cálcio (Watanabe et al., 2002; Moss & Morgan, 2004). A taxa de associação e dissociação sugere que a anexina V não penetra na membrana, comportando-se como uma proteína extrínseca. Assim, a translocação da PS e a ligação da

anexina V é uma forte evidência de apoptose inicial (Mochizuki et al., 2003; Boersma et al., 2005).

Ao conjugar a anexina V ao FITC é possível identificar e quantificar as células apoptóticas por citometria de fluxo e microscopia de imunofluorescência. Isso é possível através da avaliação dos níveis de PS expostas na membrana externa que se associaram à anexina V, indicando fase inicial de apoptose (precoce) (Sturm et al., 2006). Já o marcador nuclear fluorescente PI quando associado à anexina V, pode mensurar células com permeabilidade de membrana, o que pode indicar células apoptóticas tardias ou necróticas (Pec et al., 2003).

O PI é uma molécula que se intercala no DNA, desde que a membrana celular esteja permeável, pois o seu elevado peso molecular e tamanho, não o deixa penetrar na célula intacta (Sturm et al., 2006). Desse modo, corar as células simultaneamente com anexina V/FITC (fluorescência verde) e com PI (fluorescência vermelha), permite a avaliação da expressão de células viáveis (anexina V/FITC negativo e PI negativo), em início de apoptose (anexina V/FITC positivo e PI negativo) e em apoptose tardia ou necrose (anexina V/FITC positivo PI positivo) (Foucher et al., 2013).

2.4 Considerações gerais sobre o câncer

Câncer é um termo utilizado para nominar um conjunto de mais de 100 doenças que apresentam crescimento desordenado de células com localizações e aspectos biológicos múltiplos e podem afetar qualquer parte do corpo. Esta doença acomete a humanidade há mais de 3 mil anos a.C., já detectada em múmias egípcias, mas somente entre 460 a 377 a.C. Hipócrates, o pai da medicina, descreveu e nominou esta patologia como câncer, palavra que deriva do grego *karkinos* que quer dizer caranguejo (INCA, 2011).

Atualmente, o índice global de câncer continua aumentando em grande parte por causa do envelhecimento e crescimento da população mundial. Baseado em estimativas do GLOBOCAN 2008, dos 12,7 milhões de casos de câncer são calculadas 7,6 milhões de mortes; destes, 64% das mortes aconteceram no mundo economicamente em desenvolvimento (Jemal et al., 2011)

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, pode-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com a doença. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixa e média renda.

No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 serão válidas também para o ano de 2015 e apontam a ocorrência de aproximadamente 580.000 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes (Figura 2) serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireoide para o sexo feminino (INCA, 2013).

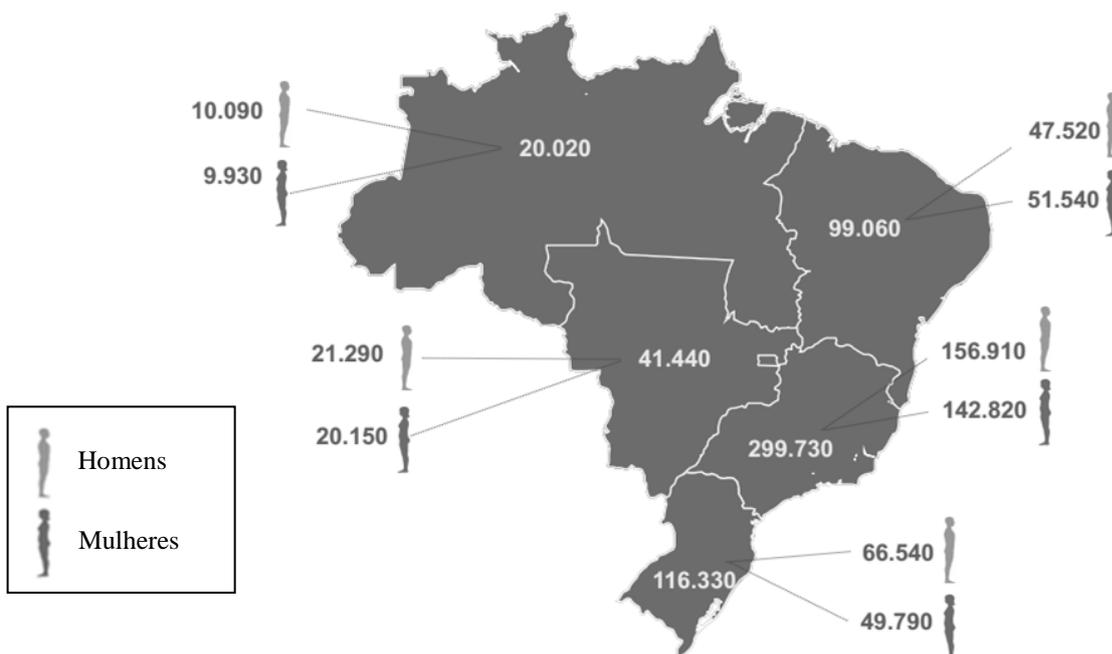


Figura 2. Estimativa do número de novos casos de câncer no Brasil nas regiões Sul, Sudeste, Nordeste, Centro-Oeste e Norte para 2014 e 2015. *Fonte: MS/INCA/Estimativa de Câncer no Brasil, 2013.

Uma das principais características dos tumores é a diferenciação do crescimento celular. As células tumorais são resistentes a morte, apresentam desenvolvimento rápido, agressivo e incontrolável, formando outras novas células anormais (WHO, 2013; Williams et al., 2013). Além disso, podemos classificar os tumores em benignos ou malignos. Os tumores benignos ou neoplasias benignas apresentam crescimento lento, de forma organizada, com limites e bordas definidas, não apresentam metástase, mas podem comprimir tecidos e órgãos adjacente (WHO, 2013).

Já os tumores ou neoplasias malignas manifestam crescimento quase autônomo, crescendo para além dos seus limites usuais, podendo invadir partes adjacentes e espalhando-se para outras regiões do corpo, processo denominado de metástase (WHO, 2013). Deste modo, a metástase pode caracterizar um tumor como maligno, pois os benignos não metastizam (Kumar et al., 2004). Além disso, a metástase pode ser resistente ao tratamento e causar a morte dos pacientes (WHO, 2013).

Deste modo, o desenvolvimento do câncer está associado ao rompimento do equilíbrio entre o crescimento e a morte celular: o balanço entre a taxa de proliferação e de apoptose determina a taxa de crescimento do tumor. Alterações entre esses fatores podem ser a chave para o crescimento descontrolado de tumores malignos e posteriormente, sua capacidade de invasão (Hajra & Liu, 2004). Sendo que, a definição bioquímica para esta doença é uma perda do controle dos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular (Williams et al., 2013).

A carcinogênese ou oncogênese, ou seja, processo de formação de câncer, em geral se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa se prolifere e dê origem a um tumor visível (INCA, 2013). Este processo é composto por três estágios: a) Iniciação: no qual os genes sofrem ação de agentes cancerígenos, tais como, fatores externos

(tabaco, organismos infecciosos, produtos químicos e radiação) e fatores internos (mutações hereditárias, hormônios, condições imunológicas e mutações que ocorrem a partir de metabolismo); b) Promoção: os agentes oncopromotores atuam na célula alterada; c) Progressão: caracterizado pela multiplicação descontrolada e irreversível da célula (ACS, 2013).

Atualmente, uma porcentagem significativa de cânceres pode ser tratada, por cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, especialmente se eles forem detectados precocemente (WHO, 2013). Porém, o tratamento continua sendo um desafio médico, embora tenhamos tido avanços significativos nas últimas décadas. O tratamento clínico geralmente utiliza agentes antiproliferativos sistêmicos que destroem preferencialmente células em divisão (Bracke et al., 2008). Contudo, esses fármacos não são seletivos para células cancerosas e sua eficácia terapêutica fica limitada devido ao dano que podem causar às células e tecidos normais (Duarte, 2010). Dessa forma, estudos com substâncias naturais podem colaborar para o maior entendimento da capacidade das mesmas em permitir a modulação de sinais de apoptose (Nobili et al., 2009).

3. OBJETIVOS

Avaliar a atividade biológica de extratos obtidos a partir da *Salvia officinalis* (L.) em cultivo de células tumorais de carcinoma de laringe humano (Hep-2), hepatoma humano (HepG2), adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa), carcinoma de pulmão (A-549), melanoma (A-375), adenocarcinoma de cólon (HT-29) e não tumorais embrionárias de rim humano (HeK-293) e fibroblasto de pulmão humano (MRC-5).

3.1 Objetivos específicos

- Obter e caracterizar quimicamente os extratos hidroalcoólico e aquoso de *Salvia officinalis* (L.) por *electrospray* de alta resolução acoplada a espectrômetro de massas (ESI-QTOF MS/MS) e cromatografia gasosas acoplada a massas (GC-MS);
- Verificar a presença de compostos fenólicos nos extratos hidroalcoólico e aquoso de *Salvia officinalis* (L.);
- Verificar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos hidroalcoólico e aquoso de *Salvia officinalis* (L.);
- Determinar a viabilidade celular frente ao efeito biológico dos extratos de *Salvia officinalis* (L.) em culturas de células tumorais e não tumoral através do ensaio de redução do MTT;
- Avaliar a expressão de marcadores envolvidos na apoptose celular com uso de imunocitoquímica em cultura de células tumorais e não tumoral;
- Propor os prováveis mecanismos da atividade antitumoral dos extratos de *Salvia officinalis* (L.).

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de dois artigos científicos. O primeiro (Capítulo I), intitulado *Avaliação in vitro do potencial biológico da Salvia officinalis L. em células tumorais*, publicado na Scientia Medica em 2012, volume 22, número 3, páginas 131-137. O segundo (Capítulo II), intitulado *Brazilian Salvia officinalis (Lamiaceae): Chemical characterization, antioxidant activity and antitumor properties in mammal cells*, o qual será submetido a Revista Food Chemistry.

4.1 Capítulo I

Avaliação *in vitro* do potencial biológico da *Salvia officinalis* L. em células tumorais

In vitro evaluation of the biological potential of Salvia officinalis L. in tumor cells

Charlene Silvestrin Celi Garcia¹, Ana Paula Franco Lambert²,
João Antonio Pêgas Henriques³, Mariana Roesch Ely⁴

1 Farmacêutica pela Universidade de Caxias do Sul. Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

2 Farmacêutica com habilitação em Análises Clínicas e Mestre em Gerontologia Biomédica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Pesquisadora e Professora da Faculdade de Farmácia da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

3 Farmacêutico bioquímico pela UFRGS. Mestre em Biofísica pelo Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Docteur D'Etat et Sciences Naturelles, Institut Curie, Université Paris XI, França. Pós-Doutorado no Institut für Mikrobiologie, J. W. Goethe Universität,

Frankfurt, Alemanha. Professor titular colaborador convidado junto ao Departamento de Biofísica, coordenando o Laboratório de Reparação de DNA de Eucariotos, UFRGS. Orientador nos Programas de Pós-Graduação em Bioquímica, Biologia Celular e Molecular e Genética e Biologia Molecular da UFRGS. Professor titular e orientador no Programa de Pós-Graduação de Biotecnologia do Instituto de Biotecnologia da UCS.

4 Cirurgiã Dentista pela PUCRS. Mestre em Odontologia (Estomatologia e Patologia) pela Universidade Federal da Paraíba. Doutora em Odontologia (Biologia Molecular) pela Ruprecht-Karls Universität Heidelberg, Alemanha. Pesquisadora e Professora da Graduação e Pós-Graduação da UCS.

Estudo realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

Objetivos: Determinar a viabilidade celular frente ao efeito biológico do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. em culturas de células tumorais de laringe (Hep-2) e células de hepatoma humano (HepG2).

Métodos: Células tumorais Hep-2 e HepG2 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) em estufa a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Na segunda etapa foram semeadas (5×10⁴ células/mL) em placas de 96 poços durante o período de 24 horas até obtenção de 60-70% de confluência e realizou-se o tratamento das células com extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L., controle negativo de etanol 80% (v/v) e controles positivos de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH), doxorubicina e cisplatina. A viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT (brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio). Os resultados foram analisados pelo teste de Tukey no programa SPSS v.19.

Resultados: O extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. mostrou atividade citotóxica para células tumorais Hep-2 IC₅₀ 0,38±0,02 mg/mL e para HepG2 IC₅₀ 0,54±0,03 mg/mL em comparação ao controle negativo, ficando acima do IC₅₀ obtido para seus controles positivos. A cisplatina apresentou IC₅₀ abaixo do extrato de sálvia, porém para a obtenção do seu IC₅₀ aumentou-se o tempo de exposição em seis horas.

Conclusões: Sugere-se que o extrato de *Salvia officinalis* L. tem atividade biológica em células tumorais, podendo ser objetivo de mais estudos com a finalidade de comprovar sua eficácia como possível agente para o tratamento do câncer.

DESCRIPTORIOS: SALVIA OFFICINALIS; SOBREVIVÊNCIA CELULAR; ANTINEOPLÁSICOS; TERAPÊUTICA.

ABSTRACT

Aims: To determine cell viability compared to the biological effect of *Salvia officinalis* L. extract on cultured tumor cells of the larynx (Hep-2) and in human hepatoma cells (HepG2).

Methods: Tumor cells Hep-2 and HepG2 were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum and 1% antibiotics (Penicillin/Streptomycin), incubated at 37°C and 5% CO₂. In the second step they were plated (5×10⁴ cells/mL) in 96 well plates during 24 hours to obtain 60-70% confluency, and treated with the hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* L., negative control with 80% ethanol (v/v) and positive control of hydrogen peroxide (H₂O₂), *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BOOH), doxorubicin and cisplatin. Cell viability was determined by MTT reduction (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Results were analyzed by Tukey test using the SPSS v.19.

Results: The hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* L. showed cytotoxic activity to tumor cells Hep-2 IC₅₀ 0,38±0,02 mg/mL for HepG2 IC₅₀ 0,54±0,03 mg/mL compared to negative control, staying above the IC₅₀ obtained for their positive controls. Cisplatin showed IC₅₀ below the extract of sage, but to obtain the IC₅₀ exposure time was increased in six hours.

Conclusions: The results of this study suggest that the extract of *Salvia officinalis* L. has biological activity against tumor cell; further studies are needed to confirm its efficacy and its potential role in cancer treatment.

KEYWORDS: SALVIA OFFICINALIS; CELL SURVIVAL; ANTINEOPLASTIC AGENTS; THERAPY.

Endereço para correspondência/Corresponding Author:

Charlene Silvestrin Celi Garcia
Rua Thomas Edson, 20 - Apt. 701
CEP 95180-000, Farroupilha, RS, Brasil
Telefone: (54) 9987-4443
E-mail: charlenescgarcia@hotmail.com

Recebido: março de 2012. Aceito: julho de 2012

INTRODUÇÃO

A natureza é um ambiente rico em diversidade biológica e química. O interesse nas pesquisas em plantas medicinais tem crescido nos últimos anos, principalmente para o tratamento de doenças que apresentam grande impacto social, como é o caso do câncer, que é a segunda causa de morte na população, representando aproximadamente 17% dos óbitos de causas conhecidas.¹⁻³ O desenvolvimento de medicamentos provenientes de produtos naturais tem se tornado uma estratégia rápida e altamente promissora para identificação de novos agentes antitumorais.⁴

A *Salvia officinalis* L. é uma planta medicinal pertencente à família das *Lamiaceas*, originária da região mediterrânica oriental, cultivada em vários países, em terrenos de clima temperado e com muita luz. Essa planta é conhecida popularmente no Brasil como sálvia, salva-das-boticas, erva-santa ou salva-mansa. Tem uso muito difundido, sendo utilizada pelos gregos para má digestão e na medicina popular como remédio para curar inflamações cutâneas.⁵⁻⁷ Apresenta como constituintes óleos essenciais como cinerol, cânfora, borneol, tujona, ácido rosmarínico, flavonóides, taninos, substância estrogênica, saponinas, dentre outros.^{5,6,8} Sua constituição abrange compostos fenólicos com atividade anti-inflamatória e anti-oxidantes, possíveis responsáveis pela atividade antitumoral.^{9,10} Alguns estudos relataram que a sálvia apresenta atividade antineoplásica, tendo potencial no tratamento do câncer *in vivo* quando utilizada em modelos murinos.¹¹

A *Salvia officinalis* L. apresenta em sua composição três diterpenos/quinonas: *royaleanone* (SAR 3), *horminone* (SAR 26) e *7-O-acetil-horminone* (SAR 43). Estes podem causar a inibição da enzima topoisomerase, podendo resultar na ativação de estresse, associados à sinalização de vias, induzindo a parada do ciclo celular e a ativação da cascata bioquímica da apoptose. Segundo estudos realizados com linhagens de células humanas de carcinoma de cólon (Caco-2) e hepatoma (HepG2) esses compostos agem citotxicamente causando dano ao DNA e aumentando a apoptose celular.¹² Hadri et al.¹³ relataram que o alfa humuleno e o triscariofileno presentes na *Salvia officinalis* L. inibem o crescimento de células tumorais.

A angiogênese é um dos processos envolvidos na promoção do câncer e metástases. Segundo Keshavarz et al.,⁴ a *Sálvia officinalis* L. inibiu a formação de tubo capilar em células endoteliais da veia umbilical (HUVEC) de ratos, demonstrando ter atividade

terapêutica ou preventiva contra as doenças relacionadas com angiogênese. A *Salvia officinalis* L. quando utilizada em carcinoma de cólon retal demonstrou indução da apoptose, inibição da proliferação celular, sugerindo que sua atividade está relacionada à inibição da via MAPK/ERK.⁹ As proteases desempenham um papel regulador em diferentes doenças, incluindo o câncer. Estudos mostraram que o ácido beta ursólico isolado da *Salvia officinalis* L. tem capacidade de inibir proteases de serina (trombina, tripsina e uroquinase), indicando atividade anticancerígena.¹⁴

O presente estudo objetivou determinar a viabilidade celular frente ao efeito biológico do extrato de sálvia em culturas de células tumorais de laringe (Hep-2) e em células de hepatoma humano (HepG2).

MÉTODOS

Material vegetal

A planta em estudo *Salvia officinalis* L. foi coletada no município de Farroupilha (N: 037°33'59" e E:126°058'00"), estado do Rio Grande do Sul. Apresenta depósito nº 37944 registrado pelo Museu de Ciências Naturais da Universidade de Caxias do Sul. As folhas, hastes e flores foram submetidas à secagem em estufa a 40-45 °C com ar circulante durante sete dias. Após, realizou-se a moagem da planta seca em moinho de facas, obtendo-se um pó que foi armazenado em frasco âmbar, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.¹⁵

Obtenção de extratos de Sálvia

Para a obtenção do extrato de *Salvia officinalis* L. foram adaptadas metodologias das monografias presentes na Comissão Permanente da Farmacopéia Brasileira.^{16,17} Inicialmente pesou-se o pó obtido de sálvia nas proporções de 1:10 (p/v) e submeteu-se à maceração em solução hidroalcoólica 80% (v/v), durante o período de nove dias. Após este período, realizou-se a filtragem do extrato sob pressão reduzida, armazenando-o em frasco âmbar, em temperatura ambiente, e ao abrigo da luz para realização de posteriores ensaios.

Cultura de células e tratamento

As células tumorais Hep-2 e HepG2 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) e suplementadas com 10% soro fetal bovino inativado e 1% de antibiótico (Penicilina/Estreptomomicina). As células foram mantidas em garrafas para cultura de tecido em estufa a 37°C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂. O

tratamento foi realizado após as células serem lavadas com tampão PBS e soltas da garrafa com solução de tripsina. Antes do tratamento com os extratos, as células foram semeadas em placas de 96 poços (5×10^4 células/mL) com meio completo e incubadas para crescimento por no mínimo 24 horas, para atingir 60-70% de confluência. O tratamento foi realizado com tempo de 1 hora e 30 minutos, com as diferentes concentrações de extrato de sálvia e do controle negativo (solução hidroalcoólica 80%), não ultrapassando a porcentagem de 4% de etanol em cada poço.

Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) de acordo com metodologia descrita por Denizolt e Lang.¹⁸ Após remoção do meio com o tratamento foi acrescentado 0,1 mL de meio DMEM sem soro contendo MTT (1 mg/mL). A mistura foi incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por período de 2 horas. O meio com MTT foi então retirado e o precipitado formado foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) com posterior agitação por 30 minutos e protegido da luz. A leitura espectrofotométrica foi feita a 570 nm e os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade. A absorbância do controle negativo (células que não receberam tratamento com os extratos, somente solução hidroalcoólica 80%) correspondeu a 100% de viabilidade e os valores das células tratadas foram calculados como porcentagem do controle. O controle positivo foi efetuado com tratamento utilizando-se H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) e *t*-BOOH (*tert*-butil hidroperóxido) como agentes geradores de estresse oxidativo e com o uso de doxorrubicina e cisplatina como quimioterápicos de uso na medicina terapêutica tradicional.

Análise estatística

Para os ensaios de viabilidade celular, foram analisadas três réplicas biológicas. A estatística levou em consideração a obtenção de dados paramétricos utilizando o teste de comparação de múltiplas médias Tukey ($p \leq 0,05$) no programa SPSS v.19.

RESULTADOS

O extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L., produzido a partir de folhas, hastes e flores, mostrou atividade biológica significativa frente às duas linhagens celulares utilizadas neste estudo. Células Hep-2 foram mais sensíveis ao extrato, enquanto as células HepG2 demonstraram menor sensibilidade. Os

resultados da avaliação da atividade antitumoral *in vitro* frente às linhagens celulares estão apresentados nas Figuras 1 e 2.

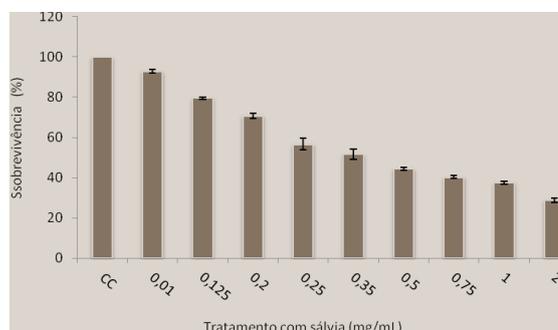


Figura 1. Sobrevivência da linhagem Hep-2 em comparação ao controle com etanol 80% (v/v) e diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. após 1h30 min de tratamento. Cada barra representa a porcentagem de sobrevivência média±DP em relação ao controle, que foi normalizado como 100%. Letras correspondem à diferença estatística usando ANOVA-Tukey ($p \leq 0,05$).

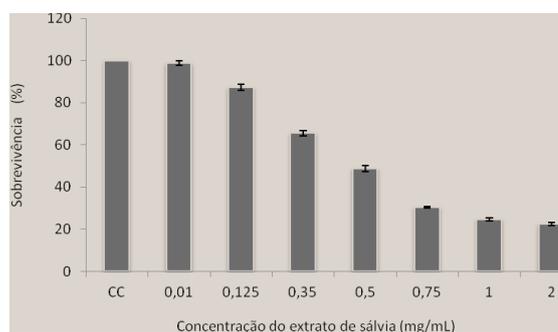


Figura 2. Sobrevivência da linhagem HepG2 em comparação ao controle com etanol 80% (v/v) e diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. após 1h30min de tratamento. Cada barra representa a porcentagem de sobrevivência média±DP em relação ao controle, que foi normalizado como 100%. Letras correspondem à diferença estatística usando ANOVA-Tukey ($p \leq 0,05$).

Os resultados expressos na Figura 1 mostram que o extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. (1:10) nas concentrações 0,35 a 2 mg/mL reduziu significativamente a viabilidade das células Hep-2 para 52 a 29% em relação ao controle. Em relação à linhagem HepG2 (Figura 2), a redução da viabilidade celular foi significativa nas concentrações 0,5 a 2 mg/mL com porcentagem de sobrevivência de 49 a 22% em relação ao controle.

As células do controle negativo de solução hidroalcoólica 80% (v/v) após o

tratamento por 1h30min apresentam-se arredondadas ou com prolongamentos (Figuras 3A e 4A), envoltas em citoplasma abundante, bem definido e íntegro, caracterizando uma cultura de células saudável. As culturas de células que receberam o tratamento de *Salvia officinalis* L., utilizando o mesmo parâmetro de tempo do controle, apresentam perda dos filamentos de colágeno e refringência (Figuras 3B e 4B), número reduzido de células, com morfologia alterada, mostrando a atividade biológica do extrato e sugerindo atividade citotóxica frente às linhagens tumorais Hep-2 e HepG2.

O extrato de *Salvia officinalis* L., quando utilizado na linhagem tumoral Hep-2, durante o tratamento de 1h30min, apresentou IC_{50} $0,38 \pm 0,02$ mg/mL, ficando acima dos controles positivos que apresentaram IC_{50} de $0,0013 \pm 0,00001$ mg/mL para doxorubicina, $0,046 \pm 0,02$ mg/mL para *t*-BOOH e $0,08 \pm 0,03$ para H_2O_2 , utilizando-se o mesmo tempo de tratamento do extrato. Somente a cisplatina necessitou exposição por seis horas de tratamento para a obtenção do IC_{50} que ficou em $0,21 \pm 0,01$ mg/mL. Podemos observar o mesmo para a linhagem tumoral HepG2, que apresentou IC_{50} $0,54 \pm 0,03$ mg/mL, ficando acima dos controles positivos que apresentaram IC_{50} de $0,003 \pm 0,00002$ mg/mL

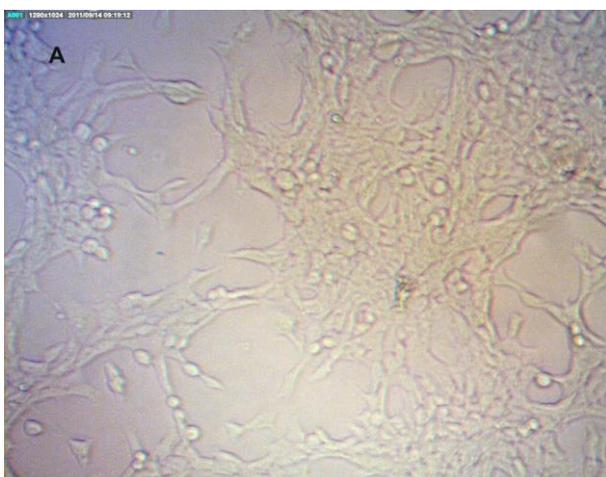


Figura 3. Comparação de sobrevivência após tratamento em Hep-2: (A) controle negativo de etanol 80% (v/v); (B) IC_{50} $0,38 \pm 0,02$ mg/mL do extrato de *Salvia officinalis* L.

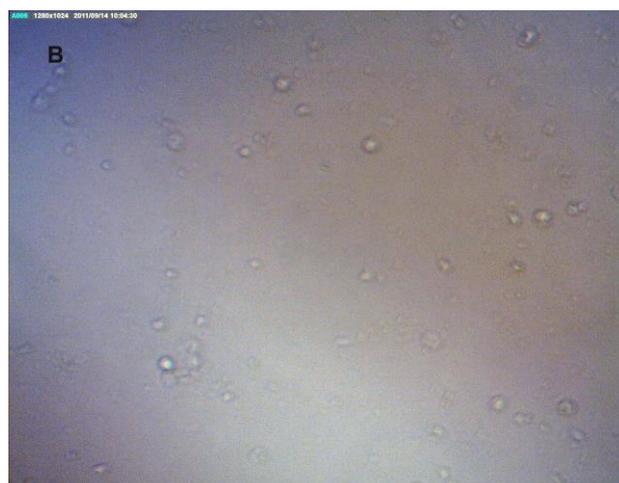


Figura 4. Comparação de sobrevivência após tratamento em HepG2: (A) controle negativo de etanol 80% (v/v); (B) IC_{50} $0,54 \pm 0,03$ mg/mL do extrato de *Salvia officinalis* L.

Tabela 1. Ensaio de viabilidade celular com linhagens Hep-2 e HepG2. Concentração inibitória de 50% da viabilidade celular – IC₅₀ – obtido do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. e controles positivos de cisplatina, doxorubicina, t-BOOH e H₂O₂.

Substância	Hep-2 IC ₅₀ (mg/mL) (média±DP)	HepG2 IC ₅₀ (mg/mL) (média±DP)
Extrato de <i>Salvia officinalis</i> L.*	0,38±0,02	0,54±0,03
Cisplatina*	0,21±0,01	0,5±0,02
Doxorrubicina*	0,0013±0,00001	0,003±0,00002
Tert-butil hidroperóxido (t-BOOH)*	0,046±0,02	0,054±0,03
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)*	0,08±0,03	0,08±0,04

* Tratamento nas células de 1h30min; ** Tratamento nas células de 6h.

para doxorubicina, 0,054 ± 0,03 mg/mL para t-BOOH e 0,08 ± 0,04 para H₂O₂ utilizando-se o mesmo tempo de tratamento do extrato. Somente a cisplatina necessitou exposição por seis horas para a obtenção do IC₅₀ que neste caso ficou em 0,5 ± 0,02 mg/mL (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi possível observar que o IC₅₀ obtido para a extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. para as linhagens Hep-2 e HepG2 quando expostos com o mesmo tempo de tratamento, ficaram acima do IC₅₀ dos agentes geradores de estresse oxidativo, que danificam e quebram as bases do DNA¹⁹ e da doxorubicina, antibiótico pertencente à classe das antraciclinas, que altera a membrana celular, promove formação de radical livre e forma ligações interfilamentares com o DNA, bloqueando a síntese de DNA e RNA.²⁰ A cisplatina, que pertence à classe dos complexos de coordenação da platina que atua na inibição seletiva da síntese de DNA, alterando as ligações DNA-proteína,²¹ apresentou valor de IC₅₀ abaixo do IC₅₀ do extrato de sálvia, porém o tempo de exposição foi de 4 horas e 30 minutos a mais do que o extrato de sálvia. Dessa forma, os dados apresentados neste trabalho requerem mais estudos para esclarecer a relação entre o extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. e os mecanismos envolvidos em sua atividade antitumoral.

A *Salvia officinalis* L. apresenta compostos que podem ter atividade biológica, tais como quercetina, apigenina, luteolina, ácido caféico, ácido rosmarínico, taninos, ácido carnósico e seu produto de oxidação o carnosol, dentre outros.^{5,6,8} Existem vários estudos com relação aos compostos citados, os quais estão presentes no extrato, podendo ser os responsáveis pela atividade antitumoral observada.

A quercetina, molécula que pertence à família dos flavonóides, destaca-se por seu efeito antioxidante. Em pequenas concentrações, de 10 a 25 μ mol/L, ela atua

contra espécies reativas de oxigênio (ERO), prevenindo o processo tumorigênico e, em concentrações mais elevadas, acima de 50 μmol/L, tem efeito pró-oxidante e citotóxico, apresentando tendência a indução da apoptose nas células. Estudos em nível molecular utilizando a metodologia de *Western blot* com células de melanoma e HepG2 sugerem que este composto atua como agente anticâncer por reduzir a expressão de oncogenes, aumentar a ativação de caspases, induzir a fosforilação de p53, aumentando o conteúdo total desta proteína, e estimular a expressão de proteínas que controlam o ciclo celular, entre elas p21, p27 e ciclina D1, dessa forma favorecendo a parada do ciclo celular.^{22, 23}

Segundo Freitas,²⁴ culturas de células de glioblasto multiforme humano, quando expostas a apigenina acima de 50 μM, apresentam um fenótipo irregular, com citoplasma retraído, núcleo bastante refringente, prolongamentos delgados e uma redução do número de células aderidas à placa, sugerindo que este composto altere a viabilidade celular, inibindo o crescimento das células, atrasando o ciclo celular e induzindo a apoptose. Semelhante aspecto morfológico pôde ser observado neste estudo em linhagens tumorais de Hep-2 e HepG2 após o tratamento com o extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. durante 1h30min, como pode ser observado nas Figuras 3 e 4. Ensaio utilizando *Western blot* com células de carcinoma cervical humano demonstraram que a apigenina induz a apoptose celular por atuar nas proteínas p53, p21, atrasando o ciclo celular na fase G1. Esse flavonóide atua também reduzindo significativamente os níveis de Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, o que induz as vias apoptóticas.²⁵

Pesquisas *in vitro* com células de fibroblasto humano e murino utilizando o teste de *Western blot* sugerem que o ácido rosmarínico inibe genes relacionados com o promotor NF-KB detectado no câncer.²⁶ Outros compostos polifenólicos que estão presentes na *Salvia officinalis* L., como o ácido caféico,

afetaram o crescimento do tumor através da inibição da síntese de DNA e exerceram efeito antitumoral através da indução de apoptose das células tumorais.²⁷

Extratos vegetais ricos em taninos demonstram grande importância para o meio científico por serem eficientes na captura de compostos reativos que causam diversos males à saúde. Estudos *in vitro* com células tumorais de esôfago e cólon demonstraram que os taninos têm atividade antitumoral e podem estar envolvidos na redução da proliferação do câncer.^{28, 29} Outros compostos presentes na *Salvia officinalis* L. são o ácido carnósico e seu produto de oxidação, o carnosol; ambos apresentam propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas e neuroprotetoras, além de possuir atividade antioxidante. A atividade do carnosol foi relatada em células de melanoma murino. Foi possível observar, através dos ensaios de quimioluminescência e *Western blot*, que este composto inibiu a fosforilação da tirosina-quinase, inibindo a ativação de fatores de transcrição e restringindo a capacidade de invasão de células cancerígenas, o que indica que o mesmo pode ser de grande valia para o tratamento do câncer.³⁰ As propriedades antitumorais da luteolina, por sua vez, são amplamente discutidas na literatura. Seus efeitos citotóxicos foram descritos para várias linhagens de células tumorais, estando relacionados ao bloqueio do ciclo celular entre a fase G2 e a mitose, seguido de apoptose, além de modular várias proteínas celulares. Além disso, a luteolina mostra-se capaz de inibir a angiogênese, prevenir a carcinogênese e sensibilizar as células tumorais a agentes quimioterápicos.^{31, 32}

A *Salvia officinalis* L. é uma planta medicinal que há algum tempo desperta interesse científico por apresentar flavonóides que são constituídos por estruturas polifenólicas e possuir significativa atividade antioxidante.³³ É necessário elucidar todos os mecanismos que estão envolvidos na atividade antitumoral da classe vegetal em estudo. Provavelmente tais compostos, que foram citados anteriormente, e que fazem parte da constituição da *Salvia officinalis* L. podem ter contribuído para sua atividade citotóxica em linhagens tumorais de Hep-2 e HepG2. Estudos *in vitro* descrevem que a *Salvia officinalis* L. apresenta atividade anticancerígena, induz a parada do ciclo celular e a ativação da cascata bioquímica da apoptose, inibe o crescimento de células tumorais e reduz a angiogênese, inibindo metástases e o crescimento de células tumorais.^{4, 12-14} Na atualidade, os modelos

experimentais *in vitro*, como a cultura de células, são de grande ajuda para a descoberta de novos tratamentos para o câncer.

Algumas das limitações do presente trabalho estão relacionadas com a coloração escura do extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L., que pode ser passível de interferência espectral para concentrações maiores que as usadas neste ensaio de sobrevivência, mudando valores de absorvância. Outro fator limitante é a diluição do extrato, que foi realizada em etanol 80% (v/v). Apesar de termos respeitado os valores máximos de etanol residual (4%) em cada tratamento, o controle de etanol 80% (v/v) apresentou uma pequena redução de sobrevivência (5%±0,5) em comparação ao controle com meio DMEM, mas os valores finais foram ponderados em relação ao controle negativo.

Os resultados apresentados sugerem que a *Salvia officinalis* L. possui um potencial biológico em células tumorais, podendo ser um recurso promissor para o tratamento combinado do câncer. Estes achados evocam adicionais estudos para esclarecer a relação entre esta planta e os mecanismos envolvidos em sua atividade antitumoral, pois novas terapias podem surgir para o tratamento de neoplasias.

AGRADECIMENTOS

Às agências FAPERGS e CNPq pelo apoio.

REFERÊNCIAS

1. Heinrich M, Bremner P. Ethnobotany and Ethnopharmacy – Their role for anti-cancer drug development. *Curr Drug Targ.* 2006;7:239-45.
2. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, et al. Cytotoxic Activity of Essential Oils from Labiatae and Lauraceae Families Against *in vitro* Human Tumor Models. *Anticancer Res.* 2007;27:3293-300.
3. INCA. Instituto Nacional de Câncer. [Acesso 05 de agosto de 2011]. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>
4. Keshavarz M, Mostafaie A, Mansouri K, et al. *In vitro* and *ex vivo* antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*. *Phytother Res.* 2010;24:1526-31.
5. Bruneton J. Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales. 2ª ed. Zargoga: Acibia; 2001.
6. Cunha AP. Plantas e produtos vegetais em cosméticos e dermatologia. Lisboa, Portugal: Fundação Colouste Gulbenkin; 2004.
7. Simões MO, Gosman G, Scenkel EP. Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento. 4ª ed. UFRGS; 2004.

8. Viecelli CA, Cruz-Silva CT. A. Efeito sazonal no potencial alelopático de *Sálvia*. *Semina Ciênc Agr*. 2009;30: 39-46.
9. Xavier CP, Lima CF, Fernandes-Ferreira M, et al. *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and *Rosmarinic acid* induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutr Cancer*. 2009;61:564-71.
10. Ramos AA, Azqueta A, Pereira-Wilson C, et al. Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *J. Agric Food Chem*. 2010;58:65-71.
11. Ho CT, Wang M, Wei GJ, et al. Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage. *Biofactors*. 2000;13:161-6.
12. Slamenová D, Masterová I, Lájáb J, et al. Cytotoxic and DNA-Damaging Effects of Diterpenoid Quinones from the Roots of *Salvia officinalis* L. on Colonic and Hepatic Human Cells Cultured *in vitro*. *Bas Clin Pharmacol Toxicol*. 2004;94:282-90.
13. Hadri A, Río MAG, Sanz J, Coloma et al. Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *An R Acad Nac Farm*. 2010;76:343-56.
14. Jedinák A, Mucková M, Kost'álová D, et al. Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*. *Z Naturforsch C*. 2006;61:777-82.
15. Radünz, LL, Mossi AJ, Zakrzewski CA, et al. Análise da cinética de secagem de folhas de *sálvia*. *Rev Bras Eng Agr Amb*. 2010;14:979-86.
16. Comissão permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira. *Farmacopeia Brasileira*. Parte II, III e IV. 4ª ed. Rio de Janeiro, 1988.
17. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira. *Farmacopeia Brasileira*. Parte II, III e IV. 4ª ed. Rio de Janeiro, 2001.
18. Denizolt F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986;89:271-77.
19. Valko M, Izakovic M, Mazur M, et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 2004;266:37-56.
20. Katzung BG. *Farmacologia: básica e clínica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2005.
21. Goodman LS, Gilman A, Brunton LL. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 11ª ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.
22. Thangasamy T. Tyrosinase overexpression promotes ATMdependent p53 phosphorylation by quercetin and sensitizes melanoma cells to dacarbazine. *Cell Oncol*. 2008;30:371-87.
23. Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008;72: 797-804.
24. Freitas SRVB. Efeito dos flavonóides de *Croton Betulaster* Mull no controle do crescimento da regulação de citocinas pró-angiogênicas VEGF e TGF- β em células de glioblastoma multiforme humano. [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia. 2009.
25. Zheng P, Chian G L, Lin C. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sciences*. 2005;76:1367-79.
26. Lee J, Jung E, Kim Y, et al. *Rosmarinic acid* as a downstream inhibitor of IKK-beta in TNF-alpha-induced upregulation of CCL 11 and CCR3. *Br J Pharmacol*. 2006;148:366-75.
27. Orsolic N, Terzic S, Mihaljevic Z, et al. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. *Biol Pharm Bull*. 2005; 28:1928-33.
28. Pessuto MB, Costa IC, Souza AB, et al. Atividade antioxidantes de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* MART. ex REISS. *Quim Nova*. 2009;32:412-6.
29. Awika JM, Yang L, Browning JD, et al. Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential sorghum (*Shorghum bicolor*) varieties. *Food Science Technol*. 2009;42:1041-6.
30. Huang SC, Ho CT, Lin-Shiau SY, et al. Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-Kappa B and c-Jun. *Biochem Pharmacol*. 2005;69: 221-32.
31. Lin Y, Shi R, Wang X, et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targ*. 2008;8:634-46.
32. Gomes RF, Santos HS, Albuquerque MRJR. *Blainvillea rhomboidea*: constituintes químicos e atividade citotóxica. *Quim Nova*. 2010;33:1122-5.
33. Ollanketo M, Peltoketo A, Hartonen K, et al. Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. *Eur Food Res Technol*. 2002;215:158-63.

4.2 Capítulo II

Brazilian *Salvia officinalis*: chemical, antioxidant, and antitumor properties

Charlene Silvestrin Celi Garcia^a, Caroline Menti^a, Ana Paula Franco Lambert^b, Thiago Barcellos^c, Sidnei Moura^c, Caroline Calloni^d, Cátia Santos Branco^d, Mirian Salvador^d, João Antonio Pêgas Henriques^a and Mariana Roesch-Ely^{a*}

^aLaboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

^b Faculty of Pharmacy, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

^c Laboratory of Biotechnology of Natural and Synthetic Products, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

^dLaboratory of Oxidative Stress and Antioxidants, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

*Corresponding author: Mariana Roesch-Ely, Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil. Phone: +55-54-3218-2100, Fax: +55-54-3218-2664. E-mail address: mrely@ucs.br.

ABSTRACT

Salvia officinalis (Lamiaceae) has been used in south Brazil as food condiment, tincture and tea, being the most consumed beverage applied for the treatment of several disorders in folk medicine. Chemical identification for hydroalcoholic (ExtHS) and aqueous (ExtAS) sage extracts revealed the presence of acids and phenolic compounds. *In vitro* antioxidant analysis for both extracts indicated promising activities. Selectivity for tumor cell lines (Hep-2, HeLa, A-549, HT-29 and A-375) were more evident using MTT assay after 24 h both extracts treatment compared to non-tumor (HEK-293 and MRC-5) cells. Morphological changes by giemsa were observed after extracts treatment and staining for annexin V/propidium iodide, presenting a majority of tumor cells at late stages of the apoptotic process and necrosis. Sage has been reported to generate beneficial effects on health, the findings here reported can help to increase the knowledge in the chemical characterization and cytotoxicity and contribute to life sciences research.

Key words: antioxidant; apoptosis; cancer; chemical; *Salvia officinalis* (L.).

Chemical compounds studied in this article

α -caryophyllene (PubChem CID: 5281520); β -caryophyllene (PubChem CID: 5281515); α -thujone (PubChem CID: 261491); β -thujone (PubChem CID: 91456); camphor (PubChem CID: 2537); caffeic acid (PubChem CID: 689043); citric acid (PubChem CID: 311); 12-methoxycarnosinic acid (PubChem CID: 9974918); eucalyptol (PubChem CID: 2758); luteolin-7-*O*-glucoronide (PubChem CID: 44258068); malic acid (PubChem CID: 525); mannol (PubChem CID: 10727); rosmarinic acid (PubChem CID: 5281792); succinic acid (PubChem CID: 1110); tartaric acid (PubChem CID: 875); ursolic acid (PubChem CID: 64945); viridiflorol (PubChem CID: 94174).

1. Introduction

The importance of plants traditionally used by the population can lead us to search for new active compounds with application in chemoprevention or anticancer therapy. In Brazil, the use of plants to treat numerous diseases is part of the local culture (Ceolin, Ceolin, Heck, Noguez, & Zdanski de Souza, 2014). The genus *Salvia* presents about 900 species worldwide, mainly distributed in the areas of the Mediterranean, Southeast Africa, Central and South America (Kamatou, Makunga, Ramogola, & Viljoen, 2008). Around 60 species of *Salvia* are found in Brazil, where 16 are located in the southeast and south (Serafini, Santos, Touguinha, Agostini, & Dalfovo, 2002).

Originally found in the East Mediterranean region, *Salvia officinalis* Linné, is a perennial shrubby herb belonging to the Lamiaceae family, that is being extensively researched. Plants of this family are commonly used in food, tea (Berdowska et al., 2013). Greeks used sage for its healing properties, and consumed it as a remedy in the treatment for various diseases (Cunha, 2004; Generalic et al., 2012; Viecelli & da Cruz-Silva, 2009). The species *S. officinalis* (L.) are well adapted to the south region of Brazil, mainly in the state of Rio Grande do Sul, because its typical sub-tropical humid climate. Also it has been used as a diary condiment in food, hydroalcoholic tincture and tea, being the most consumed beverages for the treatment of several disorders in traditional and folk medicine (Viecelli & da Cruz-Silva, 2009).

Drug development derived from natural products became a highly promising strategy for identification of new antitumor agents (Jemal et al., 2011). *In vitro* cytotoxic activity of tumor cells in culture is an important instrument for the assessment of anticancer agents and has been reported for various plant extracts, including *Salvia officinalis* (L.) (Loizzo et al., 2007).

The interest in medicinal plants research has increased, most studies focus in treating pathologies that have a large social impact. Currently, several reports are using *S. officinalis* (L.) pointed the pharmacological activity and studies have shown its potential as anti-inflammatory (Rodrigues et al., 2012), antimicrobial (Garcia et al., 2012a), hypoglycemic (Shafiee-Nick, Ghorbani, Vafae Bagheri, & Rakhshandeh, 2012), anti-diabetic (Christensen et al., 2010), antioxidant (Generalic et al., 2012), to prevent neurodegenerative disease (Takano, Inokuchi, & Kurachi, 2011) and antitumor activity (Al-Barazanji, Dizaye, & Al-Asadye, 2013; Xavier, Lima, Fernandes-Ferreira, & Pereira-Wilson, 2009). This plant present essential oils and among the chemical compounds found, it can be highlighted cinerol, camphor, borneol, thujone, rosmarinic acid, flavonoids (flavonols and flavones), tannins, saponins and estrogenic substances (Dent, Dragovic-Uzelac, Penic, Bosiljkov, & Levaj, 2013)

Phenolic diterpenes, flavonoids and phenolic acids present in the hydroalcoholic extracts of sage showed strong antitumor, high anti-inflammatory and antioxidant activities (Ramos, Azqueta, Pereira-Wilson, & Collins, 2010). Keshavarz et al., (2010) demonstrated that the hydroalcoholic and aqueous extract of *Salvia officinalis* (L.) were able to induce apoptosis and inhibit cell proliferation in colorectal carcinoma cells, with useful therapeutic activity or preventive properties against diseases related to angiogenesis.

The aqueous extracts of *S. officinalis* (L.) demonstrate high phenolic content, which could be used in the management and prevention of degenerative diseases associated with oxidative stress (Generalic et al., 2012), and anti-tumor activity in skin and colorectal carcinoma in murine models (Karmokar et al., 2012; Sharmila & Manoharan, 2012). Tumor cells exposed to sage extracts may reduce cell viability by mechanisms not well elucidated, but it is believed that this plant exerts its antitumor effect by changing the redox equilibrium, inducing apoptosis pathways and cell cycle arrest (Vasko, Vaskova, Fejercakova, Mojziso, & Poracova, 2014; Zare Shahneh et al., 2013b).

Given sage extract promising biological activities, the aim of this study is to investigate the major compounds presented in the hydroalcoholic (ExtHS) and aqueous (ExtAS) sage extracts, its antioxidant activity and cytotoxic effect against well-known tumor cell lines: human laryngeal carcinoma (Hep-2), human cervix adenocarcinoma (HeLa), human lung carcinoma (A-549), human colorectal adenocarcinoma (HT-29) and human melanoma (A-375). Cytotoxic effects were also tested in normal cell lines: non-malignant human embryonic kidney (Hek-293) and human lung fibroblast (MRC-5). Moreover, this study also evaluated the morphological alterations and induction of apoptosis and necrosis after exposure to hydroalcoholic and aqueous sage extract.

2. Material and methods

2.1. Salvia officinalis (L.) sample

Salvia officinalis (L.) was collected in September in Farroupilha city, district of Rio Grande do Sul, Brazil (Lat. 29°13'30"S by Lon. 51°20'52"W) and deposited at the *UCS Herbarium (HUCS - 37944)*, University of Caxias do Sul (UCS). The leaves were dried in a circulating air oven (Fabbe) at 40-45±1 °C for seven days. The dried material was ground in a knife mill (Wiley) and stored in amber bottles for further tests.

2.2. Salvia officinalis (L.) extracts

The hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* (L.) (ExtHS) was obtained from a dried ground sample (1 g) with 80% (v/v) EtOH-H₂O mixture (10 mL) through maceration process at room temperature for seven days in an amber bottle, under controlled shaking conditions. The extract was filtered and the solution evaporated to dryness, yielding a dark-green fine powder. The dry extract was stored at -20 °C for further experiments. The powder was resuspended in 70% (v/v) EtOH-H₂O at different concentrations and aliquots were

ultrafiltered through a 0.22 μm polyethersulfone membrane (TPP, Techno Plastic Products, Switzerland).

The aqueous extract of *S. officinalis* (L.) (ExtAS) was obtained from a dried ground sample (1 g) with infusion, using distilled water at 100 °C for 10 minutes (10 mL). The extract was filtered with reduced pressure and lyophilized, producing a dark-brown fine powder. The dry extract was kept frozen at -20 °C until use. The powder was resuspended in distilled water, at different concentrations, and further ultrafiltered through a 0.22 μm polyethersulfone membrane (TPP, Techno Plastic Products, Switzerland).

2.3 Chemical characterization

The major chemical constituents of dried *S. officinalis* hydroalcoholic and aqueous extracts were evaluated by high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (ESI-QTOF MS/MS). The hydroalcoholic extract was further analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). ESI-QTOF MS/MS analysis was performed on a Bruker Daltonics micrOTOF-Q II instrument in negative mode. The samples were solubilized in HPLC-grade methanol containing formic acid, 99.9/0.1 (v/v), and injected into the ESI source by means of a syringe pump at a flow rate of 5.0 $\mu\text{L min}^{-1}$. The follow instrument parameters were applied: capillary and cone voltages were set to +3500 V and +40 V, respectively, with a desolvation temperature of 180 °C. MS/MS experiments with 10-40 eV collision energies were optimized for each analyte to facilitate the molecular identifications. For data acquisition and processing, Compass 1.3 for micrOTOF-Q II software (Bruker Daltonics, USA) was used. The data were collected in the m/z range of 50–1200 at the speed of two scans per second, providing resolution of 50.000 (FWHM) at m/z 200. Diagnostic ions were identified by the comparison of their ESI(-)-MS/MS dissociation patterns with previous studies.

GC-MS analyses were performed with an Agilent 6890 chromatograph equipped with an electron impact detector at 70 eV and a DB-5 fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm) using helium as carrier gas with a constant flow rate of 1.0 mL min^{-1} (split = 1:20). Analytical conditions: splitless injection mode, injector temperature, 250 $^{\circ}\text{C}$; oven temperature programmed from 40 $^{\circ}\text{C}$ to 240 $^{\circ}\text{C}$ at 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, and subsequently held for 20 min. Identification of the constituents was carried out comparing the obtained mass spectra with NIST 2005 library spectra.

2.4. Total phenolic content analysis

ExtHS and ExtAS total phenolic content (10 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) was measured using the Folin-Ciocalteu colorimetric method as described by Singleton & Rossi (1999). Briefly, 200 μL of the extract were assayed in 1000 μL Folin-Ciocalteu reagent and 800 μL of sodium carbonate aqueous solution (7.5%, w/v). The mixture was shaken and diluted (1:10 w/v) in distilled water. The absorbance was measured at 765 nm (Shimadzu UV-1700 spectrophotometer, Kyoto, Japan) after 30 min of reaction. Gallic acid was used as standard to produce the linear regression curve ($r^2=0.998$). Total phenolic content was expressed in μg of gallic acid equivalents (GAE) μL^{-1} of extract.

2.5. Radical scavenging activity, superoxide dismutase-like and catalase-like activities

ExtHS and ExtAS antioxidant activity was evaluated through the ability to donate electrons to the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS $^{+\cdot}$). The DPPH \cdot assay was performed using a modified Yamaguchi method (Yamaguchi, Takamura, Matoba, & Terao, 1998). Briefly, the hydroalcoholic and aqueous stock solutions of *S. officinalis* were diluted to different concentrations (0.12 to 2.5 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) using hydroalcoholic solution (70% v/v) for ExtHS and

distilled water for ExtAS. The results are expressed as IC₅₀ (the amount of the extract needed to scavenge 50% of DPPH*).

The capacity of the extract to reduce ABTS^{•+} radical cation was determined following a previously published method (Re et al., 1999). ABTS^{•+} radical scavenging ability was calculated as percentage of inhibition (% I) = (A734 of blank – A734 of sample)/A734 of blank ×100%. The blank solution was previously prepared with ABTS^{•+} and ethanol only for ExtHS and ABTS^{•+} and distilled water only for ExtAS. The results are expressed in IC₅₀ (amount of extract needed to reduce 50% of the ABTS^{•+} radical cation), obtained by linear regression of the % I values. Gallic acid was used as control.

To evaluate enzyme-*like* activities, ExtHS and ExtAS were prepared in a concentration of 10 µg mL⁻¹. The superoxide dismutase (Sod)-*like* assay was measured as the inhibition of the self-catalytic adrenochrome formation rate at 480 nm in a reaction medium containing 1 mmol L⁻¹ adrenaline (pH 2.0) and 50 mmol L⁻¹ glycine (pH 10.2) (Bannister & Calabrese, 1987). This reaction was performed at 30 °C for 3 minutes. The results are expressed as superoxide dismutase units (USOD). One unit of Sod is defined as the amount of extract that inhibits the rate of adrenochrome formation by 50%. Catalase-*like* assay was measured according to the method described by Aebi (1984). The assay determines the rate of H₂O₂ decomposition at 240 nm. The reaction was conducted at 30 °C for 1 minute. The results are expressed as catalase units (UCAT). One unit of Cat is defined as the amount of extract that decomposes 1 mmol of H₂O₂ in 1 minute at pH 7.4. Gallic acid was used as positive control (0.05 µg µL⁻¹).

2.6. Cytotoxicity

Cell viability was measured using the MTT assay, which is based on the conversion of MTT to formazan crystals by mitochondrial dehydrogenases (Alley et al., 1988). Briefly, tumor (Hep-2, HeLa, HT-29, A-549, A-375) and non-tumor (HEK-293 and MRC-5) cells were seeded at a density of 8×10^4 cells mL^{-1} in 100 μL of supplemented culture media. After 24 h, cells were treated with different concentrations (5-625 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of ExtHS and different concentrations (5-5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of ExtAS. Negative controls were treated with the same amounts of hydroalcoholic (residual amount ethanol = 3% on cells) and aqueous solution without extract, incubated at 37 °C in 5% CO_2 for 24 h. The medium was removed and 1 mg mL^{-1} MTT dye in serum-free medium was added to the wells. Plates were incubated at 37 °C for 2 h in humidified 5% CO_2 atmosphere. Subsequently, the MTT solution was dissolved in 100 μL DMSO. Absorbance was measured using a microplate reader at 570 nm (Spectra Max190, Molecular Devices, USA). All readings were compared with the control, which represented 100% viability.

2.7. Morphological examination and induction of apoptosis in different cell lines

Cell morphology of Hep-2, HeLa, HT-29, A-549, A-375, HEK-293 and MRC-5 lines was monitored using an inverted microscope under a conventional Giemsa staining protocol (Dolan, 2011). Changes in the cellular morphology were observed and documented after 24 h ExtHS and ExtAS treatment exposure at its IC_{50} . The negative control group was treated with EtOH-H₂O 70% (v/v), respecting the residual amount ethanol of 3% for ExtHS and destilate water for ExtAS for the same period of time.

For apoptosis analysis, all cell lines were seeded on coverslips into 24-well plates at a density of 8×10^4 cells mL^{-1} in 500 μL of supplemented culture media (DMEM). After 24

hours, cells were treated with different concentrations of ExtHS and ExtAS at its IC₅₀, followed by extract incubation at 37 °C in 5% CO₂ for 24 hours. Next, treatment with sage extract was removed, washed with phosphate buffered saline, followed by primary antibody incubation using 2.5 µg mL⁻¹ of Annexin V (Abcam® - ab14196) at 37 °C, in 5% CO₂ atmosphere, for 1 hour. Samples were washed with ligation buffer solution and incubate with secondary antibody, 2.5 µg mL⁻¹ Dylight® 488 (Abcam® - ab115637) at 37 °C, in 5% CO₂ atmosphere for 30 minutes. Next, cells were stained with 0.5 µg mL⁻¹ propidium iodate (PI) (Sigma-Aldrich®- P4170) for 30 minutes, washed with ligation buffer and fixed with formaldehyde 4% at room temperature, for 15 minutes. The percentage of cells undergoing early apoptosis (annexin V positive), late apoptosis (annexin V positive and PI positive) and/or necrosis (PI positive) was estimated by counting four fields for each condition using a fluorescence microscope (BX43, Olympus). To confirm cell apoptosis, we used the technique of staining with dye acridine orange (100 µg mL⁻¹) and ethidium bromide (100 µg mL⁻¹), data not shown.

2.8. *Statistical analysis*

All biological measurements were conducted on the basis of three independent experiments. Statistical significance was evaluated using *t*-test and oneway analysis of variance (ANOVA) with post hoc multiple comparisons test (Tukey) to assess statistical differences in case of normal distribution. Significance was accepted at *p* lower than 0.05 using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 19.0) for Windows.

3. Results

3.1. Chemical characterization

The GC-MS analysis showed major essential oil components present in the *S. officinalis* hydroalcoholic extract (**Table 1**). Identified molecules include monoterpene eucalyptol, α -thujone, β -thujone, camphor; sesquiterpenes β -caryophyllene, α -caryophyllene, viridiflorol and diterpene manool. These compounds were commonly found in the essential oil of *S. officinalis*, however, with different concentrations depending on plant geographic origin and harvest season.

Table 1. Major constituents expressed as peak area percentage of hydroalcoholic extract of *S. officinalis* identified by GC-MS analysis.

entry	RT	Identified compound ^a	% peak area
1	8.61	eucalyptol (1,8-cineole)	9.44
2	11.32	α -thujone	23.15
3	11.73	β -thujone	5.94
4	12.82	Camphor	13.26
5	24.18	β -caryophyllene	5.34
6	25.55	α -caryophyllene (α -humulene)	4.08
7	30.93	Viridiflorol	13.12
8	46.60	Manool	10.21

^a The compounds were identified on GC-MS (gas chromatograph coupled with mass spectrometry) and listed according to their elution. RT = retention time.

The highest intense peaks shown in the ESI-QTOF analysis (negative ionization mode) from the hydroalcoholic extract (**Table 2, entries 1-4**) were the deprotonated molecules $[M-H]^-$ at m/z 345.2086 and m/z 455.3773, which correspond to a nominal mass of 346 u and 456 u, respectively. According to literature data, compounds isolated from *Salvia* genus, such as rosmanol and its isomers, methyl carnosate, and 12-methoxycarnosinic acid possess nominal mass of 346 u. Rosmanol and its isomers were discarded due to high difference between the accurate mass and the exact mass of these compounds. A tandem MS/MS

analysis of the peak at m/z 345.2086 shows a major fragment at m/z 301, which represents a loss of neutral CO₂ molecule (MW = 44).

This fragmentation behavior identified the 12-methoxycarnosinic acid it is compared the fragment pathway between 12-methoxycarnosinic acid and methyl carnosate. The deprotonated molecules [M-H]⁻ with m/z 455.3573 (**entry 4**) was attributed to the ursolic acid [M-H]⁻; 455.3531 that is present in different *Salvia* species. This assignment was confirmed by comparison with HRMS analysis of commercially available ursolic acid (Sigma-Aldrich - USA). The rosmarinic acid that is frequently found in sage extracts and considered a potent antioxidant molecule was also present in both hydroalcoholic and aqueous extracts (**Table 2, entries 3 and 10**). This compound was identified due to the accurate m/z of 359.0783 (**entry 3**) and 359.0785 (**entry 10**). The MS² analyses revealed the major fragments at m/z 197, 179 and 161.

Table 2. Main compounds identified by ESI-QTOF MS/MS analysis of the hydroalcoholic and aqueous extract of *Salvia officinalis* (L.).

Entry	Observed mass [M-H] ⁻	Major fragments (intensity %)	Calculated mass	Identified compound	Experimental error (ppm)
hydroalcoholic					
1	179.0356	non fragmented	179.0339	Caffeic acid	9.4
2	345.2086	301 (100)	345.2060	12-methoxycarnosinic acid	7.5
3	359.0783	197 (66), 179 (7), 161 (100)	359.0761	Rosmarinic acid	6.3
4	455.3573	non fragmented	455.3530	Ursolic acid	9.0
aqueous					
5	133.0129, [M-H] ⁻	non fragmented	133.0142	Malic acid	-9.0
6	117.0190, [M-H] ⁻	non fragmented	117.0193	Succinic acid	-2.5
7	149.0100, [M-H] ⁻	non fragmented	149.0092	Tartaric acid	5.3
8	179.0357		179.0339	Caffeic acid	10
9	191.0200	non fragmented	191.0197	Cítric acid	1.5
10	359.0785	197 (42), 179 (10), 161 (100)	359.0761	Rosmarinic acid	6.8
11	461.0701	285 (100)	461.0725	Luteolin-7-O-glucoronide	-5.2

3.2. Total polyphenol content and antioxidant activity

The total phenolic content were analyzed through Folin-Ciocalteu assay and showed polyphenols in the ExtHS that presents 1.88 ± 0.01 mgGAE mL⁻¹ and ExtAS shows 1.61 ± 0.95 mgGAE mL⁻¹. The ExtHS and ExtAS were able to donate electrons to the stable radicals DPPH[•] and ABTS^{•+} and showed promising SOD-like and CAT-like activities, being the CAT-like activity of ExtHS and ExtAS higher to that presented by gallic acid, a standard antioxidant (**Table 3**).

Table 3 - *In vitro* antioxidant activity, DPPH[•], ABTS^{•+}, superoxide dismutase-like and catalase-like activities in *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic and aqueous extracts.

Sample	DPPH [•] (radical scavenging %)	ABTS ^{•+} (radical scavenging %)	Superoxide dismutase-like (USOD)	Catalase-like (UCAT)
Hydroalcoholic	0.77 ± 0.03^a	1.57 ± 0.07^a	$2.71 \pm 0.20^*$	$3.56 \pm 0.27^*$
Aqueous	0.73 ± 0.03^a	1.53 ± 0.03^a	$2.87 \pm 0.08^*$	$2.38 \pm 0.22^*$
Gallic acid	4.26 ± 0.25^b	6.77 ± 0.10^b	2.01 ± 0.02	1.22 ± 0.13

Results presented as mean \pm SD. ^aAmount (mg mL⁻¹) of the *S. officinalis* extracts required to scavenge 50% of the DPPH[•] and ABTS^{•+} radical. ^bAmount (μ g mL⁻¹) of the gallic acid required to scavenge 50% of the DPPH[•] and ABTS^{•+} radical. USOD = One unit of Sod is defined as the amount of extract (uL) that inhibits the rate of adrenochrome formation by 50%. UCAT = One unit of Cat is defined as the amount of extract (uL) that decomposes 1 mmol of H₂O₂ in 1 min at pH 7.4. *Values statistically different using t-test for independent samples ($p \leq 0.05$).

3.3. Cytotoxicity assay

Cytotoxicity activity after 24 hours treatment with ExtHS showed 50% inhibitory concentration that varied according to each tumor cell line investigated, ranging from 45 to 235 μ g mL⁻¹. The Hep-2 revealed the lower fifty percent inhibitory concentration (45 ± 1 μ g mL⁻¹) whereas A-549 presented the highest level for IC₅₀ (235 ± 1 μ g mL⁻¹). Non-tumor lines IC₅₀ values were above 335.00 μ g mL⁻¹. The ExtAS treatment showed less promising 50% inhibitory concentration, which varied also according to the tumor cell line, from 1500 to

5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tumor-cells A-549 revealed the lowest fifty percent inhibitory concentration (1500 \pm 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$), whereas A-375 presented the highest level for IC₅₀ (above 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Non-tumor cells Hek-293 and MRC-5 IC₅₀ values were again above the ones found in the tumor lines, 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Both non-tumor cells treated with ExtHS an ExtAS showed higher IC₅₀ compared to the tumor lines, indicating a selective cytotoxic activity (**Table 4**).

Table 4 – IC₅₀ values – 50% inhibitory concentration obtained in the MTT assay for tumor and non-tumor cell after *S. officinalis* exposure 24h treatment.

Cell line	IC ₅₀ Hydroalcoholic extract ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IC ₅₀ Aqueous extract ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Tumor		
Hep-2	45.00 \pm 1.00	4550.00 \pm 2.90
HeLa	75.00 \pm 4.10	3500.00 \pm 4.10
HT-29	130.00 \pm 2.10	4600.00 \pm 3.80
A-375	165.00 \pm 5.00	>5000.00
A-549	235.00 \pm 1.00	1500.00 \pm 2.50
Non Tumor		
HeK-293	335.00 \pm 4.30	>5000.00
MRC-5	>625.00	>5000.00

3.4. Morphological examination of cancer cells and apoptosis analysis

Morphological cells alterations after ExtHS and ExtAS treatment with IC₅₀ compared to the untreated groups were monitored under a light microscope (Olympus BX43). Modifications in morphology after Giemsa staining could be observed after 24 h extract treatment. Changes include cell shrinkage and apoptotic body formation, suggesting the induction of apoptosis as a consequence of extracts exposure. Negative controls here treated exclusively with distilled water and hydroalcoholic solvent 70 % (v/v) and presented no alterations on cell morphology. However, modifications in morphology were more expressive in tumor cells when compared a non-tumor cells (**Figure 1**).

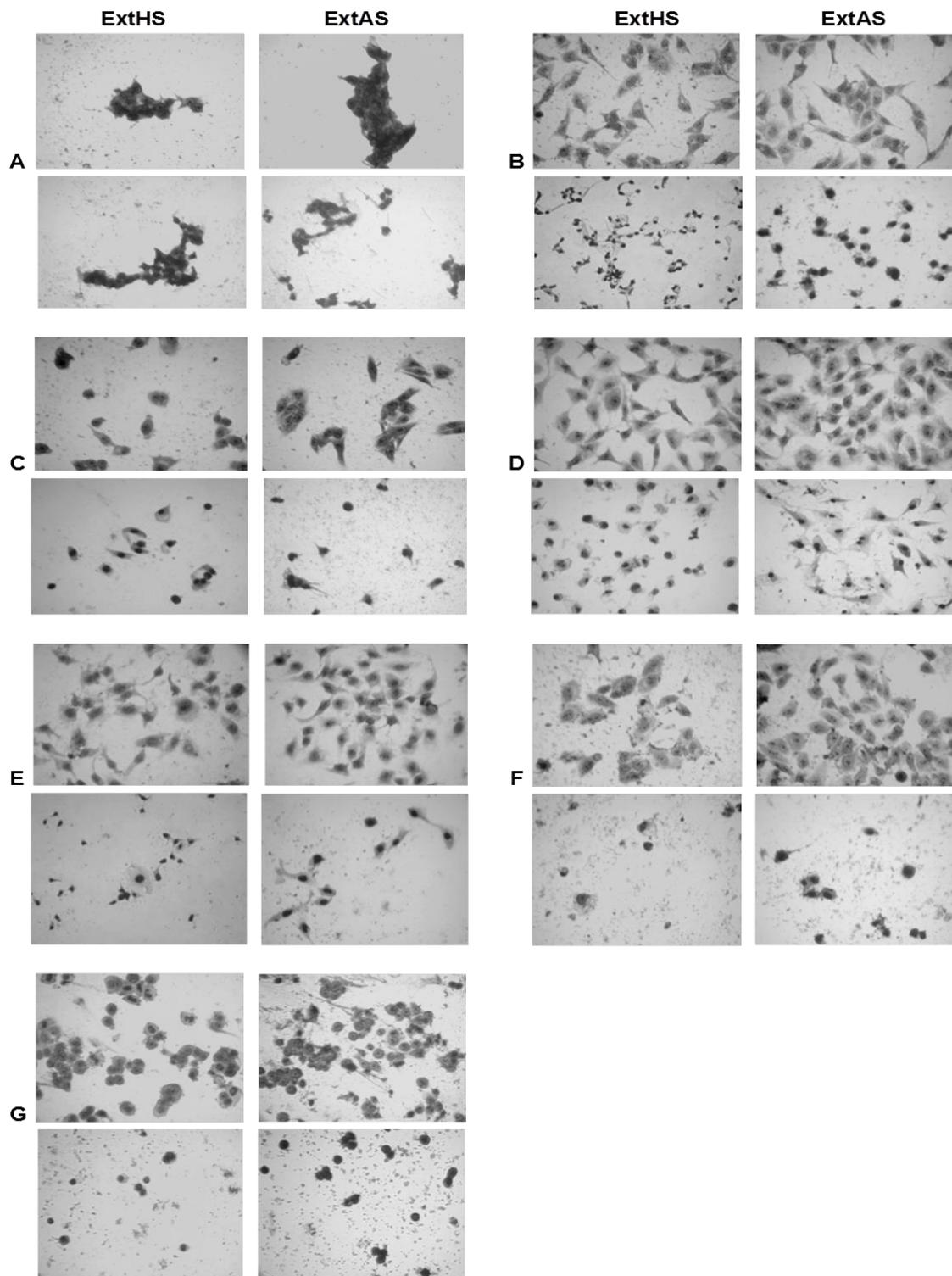


Figure 1. Morphologically changes of cells treated for 24 h with ExtHS and ExtAS at IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) compared to negative control. Photomicrographs were taken under light microscopy (200x). Capital letters indicate different cell lines. Cells fixed and stained with Giensa are represented at each first and second columns. Negative controls (untreated group) are represented at top lines and treated group (ExtHS and ExtAS at IC_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$) at the bottom panel of each line. A: HeK-293 cell line. B: MRC-5 cell line. C: A-375 cell line. D: A-549 cell line. E: HeLa cell line. F: Hep-2 cell line. G: HT-29 cell line.

The apoptotic potential was assessed by indirect immunofluorescence with annexin V/FITC - PI and confirmed with acridine orange/ethidium bromide staining (data not shown). Tumor and non-tumor cells were treated with ExtHS and ExtAS at IC₅₀ for 24 h. Signaling for cell death was observed in the majority of the cell treated with ExtHS compared to the untreated control group, similar patterns were observed for ExtAS but in lesser proportions (**Table 4**). Percent of cells immunostained in late apoptosis (Annexin V positive/PI positive) and/or necrosis (PI positive) are represented in **Figure 2**. Significantly lower percentages of late apoptosis/necrosis events were observed for the two extracts of non-tumor cells Hek-293 and MRC-5 compared to the tumor lines Hep-2, HeLa, HT-29, A-549 and A-375.

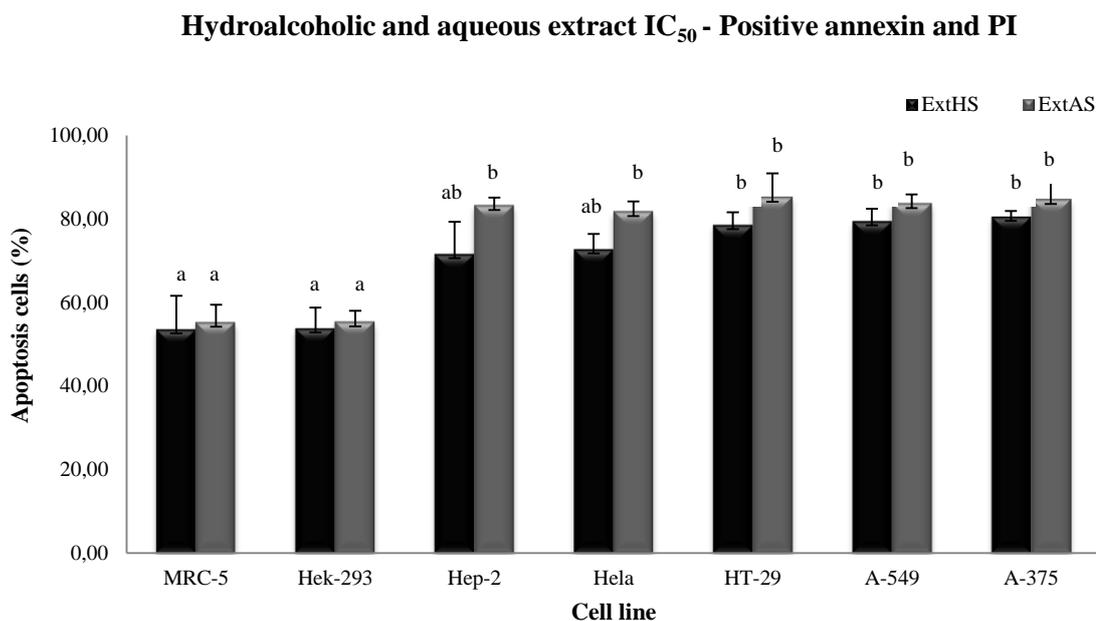


Figure 2. Percent of cells immunostained in late apoptosis (Annexin V positive/PI positive) and/or necrosis (PI positive). Results were obtained from three independent experiments. Each bar represents the average percentage of late apoptosis/necrosis \pm SD relative to control, which was normalized to 100%. Letters correspond to statistically significant differences using ANOVA-Tukey test ($p \leq 0.05$).

4. Discussion

Some of the compounds herein identified, such as tartaric acid, malic acid and citric acid, exhibit antimicrobial activity and are widely used in the food industry to control the oxidative instability, acting as antioxidant by sequestering free radicals (Subhasree, Baskar, Laxmi Keerthana, Lijina Susan, & Rajasekaran, 2009). Similarly, we found these compounds in aqueous extract of *S. officinalis* (L.), indicating that sage actually presents molecules with promising antioxidant activity. These organic acids may be related to the increase in the permeability of the membrane cell, leading to apoptosis (Ryu & Beuchat, 1998).

Another interesting molecule found in the aqueous extract (ExtAS) is the succinic acid, an intermediate of the citric acid cycle that may participate on the immune system regulation. It has been attributed that dicarboxylic acids increases mitochondrial calcium levels, forming pores in the mitochondrial membrane and releasing cytochrome c into the cytosol, activating caspases (Rubic et al., 2008). The 12-methoxycarnosinic acid which was found in the hydroalcoholic extract (ExtHS), previously was reported to interact with the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor (PPARs) in mouse embryonic fibroblasts, and plays an important role in anti-diabetic responses, once they regulate glucose homeostasis, lipid metabolism and inflammation (Christensen et al., 2010).

Other compounds herein identified participate in apoptosis induction mechanisms. The eucalyptol (50 mM) was able to regulate activity of p38 and caspase-3, inducing apoptosis and suppressing proliferation in the colorectal human cancer (Murata et al., 2013). Camphor has been attributed to present cytotoxic activity in human squamous cell carcinoma (HSC-2) tumor cells (IC_{50} 29.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Cherneva, Pavlovic, Smelcerovic, & Yancheva, 2012). Ursolic acid was able to induce apoptosis in ovarian cancer cells (IC_{50} of 50 and 65 μM) via activation of caspase and reduction of glycogen and protein synthesis by phosphorylation of

the enzyme of glycogen synthase kinase – 3 β (GSK-3 β) (Song et al., 2012a). This molecule was able to up-regulate Bax and down-regulate Bcl-2 levels, releasing cytochrome c to the cytosol and decreasing mitochondrial membrane potential, thereby activating extrinsic and intrinsic apoptosis pathway in human breast cancer cell line (Kim et al., 2011).

Furthermore, rosmarinic acid, also found in the both hydroalcoholic (ExtHS) and aqueous (ExtAS) extracts, was suggested to inhibit proliferation and induce apoptosis in tumor cells Caco-2 and HSC T6, by down-regulating Bcl-2 and decreasing the expression of CyclinD1, inhibiting phosphorylation of STAT3, responsible for the progression and invasion of cancer (Zhang et al., 2012). Other compound found in both extracts was the caffeic acid. Previous studies using A-549 cell model reported that this compound may cause apoptosis on S/G2 cell cycle arrest, up-regulating Bax and down-regulating Bcl2 proteins (Ulasli et al., 2013).

Chemical analysis using GC-MS revealed compounds like β -caryophyllene, α -caryophyllene, eucalyptol, α -thujone, β -thujone, viridiflorol, manool, camphor and luteolin-7-*O*-glucuronide in the ExtHS, that are known to present antioxidant, bactericidal, anti-inflammatory and analgesic activity (Fischedick, Standiford, Johnson, & Johnson, 2013; Kaliora, Kogiannou, Kefalas, Papassideri, & Kalogeropoulos, 2014). β -caryophyllene has been attributed to inhibit growth of cell lines and induce apoptosis in lymphoma and neuroblastoma at 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, through ROS-mediated and cascade of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) inhibition (Park et al., 2011). Extracts with α -caryophyllene showed cytotoxic activity in murine macrophage RAW264.7 (IC_{50} 41.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and colon cancer (IC_{50} 73.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (El Hadri et al., 2010). Here, ExtHS presented cytotoxic activity in human colorectal adenocarcinoma (HT-29) with IC_{50} 165.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and was able to induced morphological changes and late apoptosis/necrosis in cells.

The hydroalcoholic and aqueous *S. officinalis* (L.) extracts presents a range of several family compounds, including phenolic ones, that exhibit antioxidant capacity and ability to scavenge free radicals (Generalic et al., 2012). The ExtHS and ExtAS obtained from sage leaves were rich in polyphenols compounds with *in vitro* ability to scavenge the free radicals DPPH and ABTS^{•+}. Polyphenol compounds are commonly found in sage, however crude extracts will present different concentrations of polyphenols depending on several conditions like extraction method, plant geographic origin and harvest season.

It is known that superoxide dismutase and catalase enzymes have an important role in maintaining the physiologic redox equilibrium. Superoxide dismutase catalyzes the superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) in H_2O_2 , and CAT catalyzes the direct decomposition of H_2O_2 to ground-state O_2 and H_2O (Halliwell, 2007). The two extracts used in this study presented important *in vitro* SOD-like and CAT-like activities compared with the standard gallic acid. This study verified the antioxidant properties of hydroalcoholic and water-based extracts, which are widely used in Brazil as plant tincture and tea, and may have an important role in maintaining the redox equilibrium, decreasing oxidative stress. These properties could contribute to play a key role to various diseases, such neurodegenerative disorders, inflammation and cancer.

Cytotoxicity analysis with MTT is widely used for measuring cytotoxic potential of drugs on established cell lines or primary cultures. Reports using crude extract of *S. officinalis* (L.) also describe potential cytotoxic effects, with IC_{50} ranging from $78 \mu g mL^{-1}$ to $500 \mu g mL^{-1}$ on several tumor cell lines, like renal adenocarcinoma, prostate carcinoma, rhabdomyosarcoma and murine mammary adenocarcinoma (Al-Barazanji et al., 2013; Loizzo et al., 2007) and reduced cytotoxic effect on non-tumor endothelial cell from human umbilical vein (Zare Shahneh, Baradaran, Orangi, & Zamani, 2013a).

Previous studies of our group demonstrated that crude hydroalcoholic extract of *S. officinalis* (L.) prepared from plant leaves, stems and flowers were able to promote inhibition of proliferation on Hep-2 strains with 1h30min treatment, showing IC_{50} $380 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Garcia et al., 2012b). In this study, the hydroalcoholic extract with longer incubation time (24 h) on Hep-2 cells reduced IC_{50} levels to $45 \mu\text{g mL}^{-1}$. Furthermore, the present study used only leaves, in a different harvest season, with modified extraction method for obtaining hydroalcoholic extract, all those altered parameters may have influenced biological activity and consequently the viability of the cell lines tested.

Most important, non-tumor cell lines presented a higher IC_{50} compared to the tumor lines at the same extract exposure time, indicating less cytotoxicity. Also to be considered, the ExtAS treatment showed less promising 50% inhibitory concentrations in tumor cell lines. Non-tumor cell lines presented, as observed to the ExtHA, a higher IC_{50} after incubation with ExtAS, indicating increase resistance when exposed to the aqueous extract and selective cytotoxic activity.

The colorimetric technique gives a good high-contrast polychromatic stain and shows morphology alterations compatible with apoptosis. Here, negative control cells were shown as rounded-like structures, with abundant and intact cytoplasm. The cells treated with ExtHS and ExtAS at its inhibitory 50% concentration presented several modifications in morphology and reduced number of cells .

Death response mechanisms after extract exposure was also investigated, indicating that most cells died in late stages of apoptosis or necrosis. Apoptosis is a programmed form of cell death observed in tissues during development and maintains tissue homeostasis through elimination of excessive or injured cells (Sola, Morgado, & Rodrigues, 2013). Cells in late apoptosis or necrosis demonstrate similar patterns, once both annexin V and PI crosses the

cell membrane after permeabilization, thus cannot be distinguished. Overlapping of annexin V and PI was considered to be a late apoptosis and/or necrosis event and signaling for cell death was observed in the majority of the cell treated with ExtHS compared to the untreated control group.

The same was observed for ExtAS, but in less proportion, findings that were confirmed using acridine orange and ethidium bromide staining. Those results are in accordance with the literature, Slamenova et al. (2004) and Zare Shahneh et al., (2013b) demonstrated that hydroalcoholic, aqueous and hexene extracts of sage were responsible to break lipid membrane bilayer, causing the inhibition of the enzyme topoisomerase I, inducing cell cycle arrest and activation of the biochemical cascade of apoptosis in several lines like colon carcinoma, human hepatoma, human B-cell non-Hodgkin's lymphoma, lymphoma human monocytes and human acute myeloid leukemia. The two extracts of *S. officinalis* (L.) investigated in the present study were able to induce late apoptosis, but more studies are needed to elucidate which pathways are involved in this process.

In summary, these results demonstrate that the different concentrations of compounds can be dependent on plant geographic origin, season and extraction method. Cytotoxic potential was more promising in ExtHS, however changes in extraction methodology may potentiate its activity in tumor cells. In addition, all compounds are of pharmaceutical importance and the presence or not of synergistic, antagonistic or additive combinations of bioactive compounds present in the extracts, should be investigated for better comprehension of the effects of natural products in humans. These findings evoke additional studies to clarify the relationship of compounds here identified and the molecular mechanisms involved in its biological activity. Brazilian *Salvia officinalis* (L.) used as condiment and tea presents compounds in the crude extracts with good cytotoxic response, generating morphological

changes and induction of apoptosis, and also presenting selectivity for tumor cells. Its compounds may lead to new drug discovery with reduction of toxic side effects in cancer patients.

Acknowledgments

We thank the Biotechnology Institute from the University of Caxias do Sul, the Research Foundation of the Rio Grande do Sul (FAPERGS) and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq).

References

- Al-Barazanji, R., Dizaye, K., & Al-Asadye, A. (2013). Cytotoxic and cytogenetic effects of *Salvia officinalis* on different tumor cell lines. *Middle East Journal of Internal Medicine*, 13(4): 15-25.
- Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H., & Boyd, M. R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, 48(3): 589-601.
- Bannister, J. V., & Calabrese, L. (1987). Assays for superoxide dismutase. *Methods of Biochemical Analysis*, 32: 279-312.
- Berdowska, I., Zielinski, B., Fecka, I., Kulbacka, J., Saczko, J., & Gamian, A. (2013). Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Food Chemistry*, 141(2): 1313-1321.
- Ceolin, T., Ceolin, S., Heck, R. M., Noguez, P. T., & Zdanski de Souza, A. D. (2014). Relato de experiência do curso de plantas medicinais para profissionais de saúde. *Revista Baiana de Saúde Pública*, 37(2).
- Cherneva, E., Pavlovic, V., Smelcerovic, A., & Yancheva, D. (2012). The effect of camphor and borneol on rat thymocyte viability and oxidative stress. *Molecules*, 17(9): 10258-10266.
- Christensen, K. B., Jorgensen, M., Kotowska, D., Petersen, R. K., Kristiansen, K., & Christensen, L. P. r. (2010). Activation of the nuclear receptor PPAR by metabolites isolated from sage *Salvia officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1): 127-133.
- Cunha. (2004). *Plantas e rodutos vegetais em cosmética e dermatologia*. Lisboa: Fundação Colauste Gulbenkin.

- Dent, M., Dragovic-Uzelac, V., Penic, M., Bosiljkov, T., & Levaj, B. (2013). The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technology & Biotechnology*, 51(1).
- Dolan, M. (2011). The role of the Giemsa stain in cytogenetics. *Biotechnic & Histochemistry*, 86(2): 94-97.
- El Hadri, A., Gomez del Rio, M. A., Sanz, J. S., Gonzalez Coloma, A., Idaomar, M., Ozonas, B. R., Gonzalez, J. B., & Sanchez Reus, M. I. (2010). Cytotoxic activity of alpha-humulene and trans-caryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 76: 343-356.
- Fischedick, J. T., Standiford, M., Johnson, D. A., & Johnson, J. A. (2013). Structure activity relationship of phenolic diterpenes from *Salvia officinalis* as activators of the nuclear factor E2-related factor 2 pathway. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(9): 2618-2622.
- Garcia, C. S. C., Lambert, A. P. F., Henriques, J. A. P., & Roesch-Ely, M. (2012b). Avaliação in vitro do potencial biológico da *Salvia officinalis* L. em células tumorais. *Scientia Medica*, 22(3).
- Garcia, C. S. C., Roesch-Ely, M., Wasum, R. A., de Antoni-Zoppa, B. C., Wollheim, C., Neves, G. A., Weiss-Angeli, V., & de Souza, K. C. B. (2012a). Assessment of *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic extract for possible use in cosmetic formulation as inhibitor of pathogens in the skin. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33(4): 509-514.
- Generalic, I., Skroza, D., Surjak, J., Mozina, S. S., Ljubenkovic, I., Katalinic, A., Simat, V., & Katalinic, V. (2012). Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & Biodiversity*, 9(2): 441-457.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 35(Pt 5): 1147-1150.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: Cancer Journal Clinicians*, 61(2): 69-90.
- Kaliora, A. C., Kogiannou, D. A., Kefalas, P., Papassideri, I. S., & Kalogeropoulos, N. (2014). Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? *Food Chemistry*, 142: 233-241.
- Kamatou, G. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P., & Viljoen, A. M. (2008). South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. *Journal Ethnopharmacology*, 119(3): 664-672.
- Karmokar, A., Marczylo, T. H., Cai, H., Steward, W. P., Gescher, A. J., & Brown, K. (2012). Dietary intake of rosmarinic acid by Apc(Min) mice, a model of colorectal

carcinogenesis: levels of parent agent in the target tissue and effect on adenoma development. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(5): 775-783.

- Keshavarz, M., Mostafaie, A., Mansouri, K., Bidmeshkipour, A., Motlagh, H. R., & Parvaneh, S. (2010). In vitro and ex vivo antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*. *Phytotherapy Research*, 24(10): 1526-1531.
- Kim, K. H., Seo, H. S., Choi, H. S., Choi, I., Shin, Y. C., & Ko, S. G. (2011). Induction of apoptotic cell death by ursolic acid through mitochondrial death pathway and extrinsic death receptor pathway in MDA-MB-231 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 34(8): 1363-1372.
- Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A. M., Statti, G. A., & Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. *Anticancer Research*, 27(5A): 3293-3299.
- Murata, S., Shiragami, R., Kosugi, C., Tezuka, T., Yamazaki, M., Hirano, A., Yoshimura, Y., Suzuki, M., Shuto, K., & Ohkohchi, N. (2013). Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer. *Oncology Reports*, 30(6): 2647-2652.
- Park, K.-R., Nam, D., Yun, H.-M., Lee, S.-G., Jang, H.-J., Sethi, G., Cho, S. K., & Ahn, K. S. (2011). beta-Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*, 312(2): 178-188.
- Ramos, A. A., Azqueta, A., Pereira-Wilson, C., & Collins, A. R. (2010). Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(12): 7465-7471.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9): 1231-1237.
- Rodrigues, M. R., Kanazawa, L. K., das Neves, T. L., da Silva, C. F., Horst, H., Pizzolatti, M. G., Santos, A. R., Baggio, C. H., & Werner, M. F. (2012). Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *Journal Ethnopharmacology*, 139(2): 519-526.
- Rubic, T., Lametschwandtner, G., Jost, S., Hinteregger, S., Kund, J., Carballido-Perrig, N., Schwarzler, C., Junt, T., Voshol, H., Meingassner, J. G., Mao, X., Werner, G., Rot, A., & Carballido, J. M. (2008). Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nature Immunology*, 9(11): 1261-1269.
- Ryu, J. H., & Beuchat, L. R. (1998). Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 45(3): 185-193.

- Serafini, L. A., Santos, A. C. A., Touguinha, L. A., Agostini, G., & Dalfovo, V. (2002). *Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais. Caxias do Sul: EDUCS. 54p.*
- Shafiee-Nick, R., Ghorbani, A., Vafae Bagheri, F., & Rakhshandeh, H. (2012). Chronic administration of a combination of six herbs inhibits the progression of hyperglycemia and decreases serum lipids and aspartate amino transferase activity in diabetic rats. *Advances in Pharmacological Sciences, 2012*: 789796.
- Sharmila, R., & Manoharan, S. (2012). Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Indian Journal of Experimental Biology, 50*(3): 187-194.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymology, 299*: 152-178.
- Slamenova, D., Masterova, I., Labaj, J., Horvathova, E., Kubala, P., Jakubikova, J., & Wsolova, L. (2004). Cytotoxic and DNA-damaging effects of diterpenoid quinones from the roots of *Salvia officinalis* L. on colonic and hepatic human cells cultured in vitro. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 94*(6): 282-290.
- Sola, S., Morgado, A. L., & Rodrigues, C. M. (2013). Death receptors and mitochondria: two prime triggers of neural apoptosis and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta, 1830*(1): 2160-2166.
- Song, Y. H., Jeong, S. J., Kwon, H. Y., Kim, B., Kim, S. H., & Yoo, D. Y. (2012a). Ursolic acid from *Oldenlandia diffusa* induces apoptosis via activation of caspases and phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 beta in SK-OV-3 ovarian cancer cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin, 35*(7): 1022-1028.
- Subhasree, B., Baskar, R., Laxmi Keerthana, R., Lijina Susan, R., & Rajasekaran, P. (2009). Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. *Food Chemistry, 115*(4): 1213-1220.
- Takano, N., Inokuchi, Y., & Kurachi, M. (2011). Effects of ethanol extracts of herbal medicines on dermatitis in an atopic dermatitis mouse model. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 131*(4): 581-586.
- Ulasli, S. S., Celik, S., Gunay, E., Ozdemir, M., Hazman, O., Ozyurek, A., Koyuncu, T., & Unlu, M. (2013). Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester and resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo(a)pyrene. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP, 14*(10): 6159-6164.
- Vasko, L., Vaskova, J., Fejercakova, A., Mojziso, G., & Poracova, J. (2014). Comparison of some antioxidant properties of plant extracts from *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Eleutherococcus senticosus* and *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal, 50*(7): 614-622.

- Viecelli, C. A., & da Cruz-Silva, C. T. A. (2009). Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de Sálvia. *Semina: Ciências Agrárias*, 30(1): 39-46.
- Xavier, C. P., Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2009). *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. *Nutrition and Cancer*, 61(4): 564-571.
- Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., & Terao, J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62(6): 1201-1204.
- Zare Shahneh, F., Baradaran, B., Orangi, M., & Zamani, F. (2013a). In vitro Cytotoxic Activity of Four Plants Used in Persian Traditional Medicine. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(2): 453-455.
- Zare Shahneh, F., Valiyari, S., Baradaran, B., Abdolalizadeh, J., Bandehagh, A., Azadmehr, A., & Hajiaghaee, R. (2013b). Inhibitory and cytotoxic activities of *Salvia officinalis* L. Extract on human lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(1): 51-55.
- Zhang, Y., Smuts, J. P., Dodbiba, E., Rangarajan, R., Lang, J. C., & Armstrong, D. W. (2012). Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36): 9305-9314.

5. DISCUSSÃO GERAL

A busca por agentes antitumorais a partir de fontes vegetais teve início na década de 50 com a descoberta dos alcaloides da vinca (vimblastina e vincristina). Com isso, o *United State National Cancer Institute* (NCI) deu início a um amplo programa de coleta de plantas na década seguinte, o que levou a descoberta de muitos quimioterápicos com atividade citotóxica (Cragg & Newman, 2005). Desde o ano de 2002, a Organização Mundial da Saúde considera fundamental que se realizem investigações experimentais acerca das plantas utilizadas para fins medicinais e de seus princípios ativos, para garantir sua eficácia e segurança terapêutica (OMS, 2002).

As plantas pertencentes à espécie *S. officinalis*, tem despertado grande interesse científico, pois apresentam em sua constituição compostos com atividade antimicrobiana e são amplamente utilizadas na indústria de alimentos para controlar a instabilidade oxidativa. Observou-se que a caracterização química do extrato aquoso de sálvia (ExtAS) e extrato hidroalcoólico de sálvia (ExtHS) por ESI-QTOF MS/MS (Capítulo II, Tabela 2) possui uma variedade de compostos químicos, que podem estar relacionados com a atividade farmacêutica da planta.

No ExtAS verificou-se a presença de ácido tartárico, málico e cítrico que já foram descritos por apresentarem atividade anti-inflamatória, cardioprotetora e antioxidante (Tang et al., 2013). Além destes compostos, identificou-se o ácido succínico, que atua na regulação do sistema imunológico e pode aumentar os níveis de cálcio, formar poros na membrana mitocondrial, assim liberar o citocromo c no citosol, ativando proteases intracelulares, como as caspases, que estão envolvidas no processo de apoptose celular (Rubic et al., 2008).

No ExtHS encontrou-se o ácido 12-metoxicarnosico, sua atividade antidiabética foi descrita em fibroblastos de ratos, onde observou-se que este composto pode reagir com receptores nucleares ativadores de peroxissomo (PPARs), responsáveis por regular a homeostase da glicose, metabolismo lipídico e processos inflamatórios (Christensen et al., 2010). O ácido ursólico, encontrado no ExtHS, recentemente descrito por Song et al. (2012b), mostrou capacidade de induzir apoptose via ativação de caspases em células de câncer de ovário (IC₅₀ 50 e 65 µM). Este composto, conforme observado em células de câncer de mama, aumentou os níveis de proteínas pró-apoptóticas Bax e diminuiu os níveis de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, induzindo a liberação do citocromo c para o citosol e diminuindo o potencial da membrana mitocondrial, com consequente ativação da via intrínseca e extrínseca da apoptose (Kim et al., 2011).

Identificou-se em ambos os extratos, hidroalcoólico e aquoso de sálvia, analisados no Capítulo II (Tabela 2), ácido rosmarínico e cafeico. O ácido rosmarínico, que tem demonstrado atividade antitumoral promissora, diminuiu níveis de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, em linhagens tumorais Caco-2 e HSC T6 e inibiu a proliferação celular por induzir a proteína Ciclina D1 envolvida nos processos de apoptose na fase G1/S do ciclo celular (Zhang et al., 2012). Recentemente, Ulasli et al. (2013) demonstraram em células A-549 que o ácido cafeico tem atividade apoptótica na fase S/G2 do ciclo celular, por aumentar a regulação de expressão de Bax, proteína pró-apoptótica e diminuir a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

A metodologia de cromatografia gasosa (CG-MS) utilizada no Capítulo II (Tabela 1) deste estudo possibilitou a identificação somente de compostos no ExtHS, pois o método de extração do ExtAS mostrou interferência na análise final de compostos voláteis. Desta forma, no ExtHS foram detectados compostos voláteis como os monoterpenos eucaliptol, α -tujona,

β -tujona, cânfora; sesquiterpenos β -cariofileno, α -cariofileno, viridiflorol; e o diterpeno manool, os quais são conhecidos por sua atividade antioxidante, bactericida, anti-inflamatória e analgésica (Fischedick et al., 2013; Hamrouni-Sellami et al., 2013; Kaliora et al., 2014).

Os trabalhos recentes de Park et al. (2011) e Sain et al. (2014) mostraram que o β -cariofileno em células de linfoma e neuroblastoma na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi capaz de inibir o crescimento e induzir apoptose celular. Além desta atividade, tem sido relatado que o α -cariofileno apresenta atividade citotóxica em macrófagos murino RAW264.7 (IC_{50} 41,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e câncer de cólon (IC_{50} 73,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (El Hadri et al., 2010).

Outra molécula encontrada no ExtHS foi a cânfora, que apresenta atividade (IC_{50} 29,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em células escamosas de carcinoma humanas (HSC-2) (Nakano et al., 2004; Cherneva et al., 2012). Neste contexto, Murta et al. (2013) mostraram que o eucaliptol (50 mM), também presente no ExtHS, foi capaz de ativar p38 e caspase-3, induzindo a apoptose e suprimindo a proliferação tumoral em células de câncer colorretal humano (HT-29). É importante salientar que no Capítulo II deste trabalho (Tabela 4), também foi detectada atividade citotóxica do ExtHS em células de adenocarcinoma colorretal humano (HT-29) com IC_{50} 165,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em adição, no ExtAS, uma menor atividade citotóxica (IC_{50} 4600,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Tabela 4) foi observada, entretanto que ambos extratos induziram mudanças morfológicas e apoptose tardia/necrose nesta linhagem tumoral (Tabela 4, Figura 4).

A *S. officinalis* (L.) é uma planta que apresenta uma grande quantidade de compostos aromáticos, dentre estes, os compostos fenólicos, muito estudados por terem a capacidade de eliminar espécies reativas e atuarem como antioxidantes (Farhat et al., 2014; Shahrzad et al., 2014). No Capítulo II, ambos os extratos ExtHS e ExtAS apresentaram 1,88 $\mu\text{gGAE } \mu\text{L}^{-1}$ e 1,61 $\mu\text{gGAE } \mu\text{L}^{-1}$ de polifenóis totais, respectivamente, com uma boa capacidade de varrer o radical livre DPPH $^{\bullet}$ e ABTS $^{+\bullet}$ *in vitro* (Tabelas 3). Entretanto, o índice antioxidante foi menor

quando comparados aos descritos para a sálvia oriunda da Sérvia ($0,078 \mu\text{gGAE } \mu\text{L}^{-1}$) (Kontogianni et al., 2013). Neste contexto, nos ensaios enzimáticos antioxidantes *in vitro* apresentados no Capítulo II, o ExtHS mostrou maior capacidade de reagir com o ânion superóxido (*Sod-like*, Tabela 3), reduzindo a taxa de formação de adenocromo e menor atividade para decompor peróxido de hidrogênio (*Cat-like*, Tabela 3) em comparação ao ExtAS.

No presente trabalho, procurou-se utilizar diferentes métodos para a obtenção dos extratos, com o objetivo de buscar similaridade aos produtos comercializados oriundos da sálvia, que são amplamente utilizados no Brasil. No Capítulo II deste trabalho, não identificou-se elevada atividade antioxidante dos extratos. Salienta-se, que a quantidade de compostos fenólicos, principais responsáveis pela atividade antioxidante, reduz conforme a localização que a planta é cultivada e o excesso de salinidade no solo (Tounekti et al., 2011). O solvente e o método de extração também podem ser modificados de diversas formas, podendo contribuir majoritariamente na extração de diferentes compostos com atividade biológica, incluindo polifenólicos.

A análise de propriedade citotóxica foi realizada pela metodologia de conversão de MTT em cristais de formazan por células viáveis. Este ensaio é amplamente utilizado para medir o potencial citotóxico de drogas em linhagens celulares estabelecidas ou em culturas primárias (van Meerloo et al., 2011). Os resultados do Capítulo I (Tabela 1) evidenciaram que o extrato hidroalcoólico de sálvia exposto a 1h30min de tratamento, mostrou IC_{50} $380 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a linhagem tumoral Hep-2 e IC_{50} $540 \mu\text{g mL}^{-1}$ para linhagem tumoral HepG-2. Conforme esperado, os controles positivos de doxorubicina, *tert*-butil hidroperóxido, peróxido de hidrogênio e cisplatina apresentaram IC_{50} menores para estas linhagens tumorais.

O presente trabalho também teve a finalidade de comparar a citotoxicidade dos extratos hidroalcoólicos de sálvia e controles positivos de doxorubicina, cisplatina, *tert*-butil hidroperóxido e peróxido de hidrogênio na linhagem tumoral Hep-2. Salienta-se, que no Capítulo II foram realizadas modificações no processo de extração, com a utilização somente das folhas da planta. Somado a isso, o tempo de exposição foi aumentado para 24h de tratamento. Em relação aos resultados, para a linhagem tumoral Hep-2, foi observado IC₅₀ 45 µg mL⁻¹ (Capítulo II, Tabela 4), valor reduzido ao obtido no Capítulo I (Tabela 1) para a mesma linhagem tumoral.

Em comparação aos controles positivos com agentes antitumorais, para a linhagem Hep-2, o extrato hidroalcoólico de sálvia obtido (24h de tratamento) no Capítulo II demonstrou IC₅₀ inferior que aquele observado para a cisplatina (6h de tratamento) que atua na inibição seletiva da síntese de DNA alterando as ligações DNA-proteína, e IC₅₀ superior (1h30min de tratamento) a doxorubicina que bloqueia a síntese de DNA e RNA. Para os agentes geradores de estresse oxidativo que causam danos ao DNA foi observado IC₅₀ igual ao *tert*-butil hidroperóxido e inferior que o peróxido de hidrogênio para 1h30min de tratamento (Capítulo I, Tabela 1).

Deste modo, em analogia aos Capítulo I e II, evidenciou-se que os extratos hidroalcoólicos de sálvia podem reduzir o valor de IC₅₀ e apresentar relação entre viabilidade celular e tempo de exposição. Neste contexto, observou-se também que as partes utilizadas da planta no Capítulo I, tais como, hastes, folhas e flores e o período de coleta da planta no mês de março, em contraste ao extrato do Capítulo II que foi preparado somente com folhas e coleta da planta no mês de setembro, pode influenciar na quantidade de compostos que apresentam atividade biológica e conseqüentemente na citotoxicidade observada na linhagem Hep-2.

No Capítulo II, buscou-se verificar a citotoxicidade do extrato hidralcoólico (ExtHS), citado anteriormente, e de um novo extrato, o aquoso (ExtAS), em um número maior de células tumorais e em células não tumorais que foram utilizadas como controle para um parâmetro de citotoxicidade. Observou-se que os valores de IC_{50} tiveram variações de 45 a $235 \mu\text{g mL}^{-1}$ para linhagens tumorais após 24h de tratamento com ExtHS. O ExtAS mostrou concentração inibitória de 50% em linhagens tumorais variando entre 1500 a $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que, a linhagem A-549, foi a mais suscetível ao extrato com IC_{50} de $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Neste contexto, o ExtHS mostrou maior efeito citotóxico em linhagens tumorais quando comparado ao ExtAS, contudo ambos extratos apresentaram valores de IC_{50} maiores para as linhagens não tumorais, indicando uma possível atividade citotóxica seletiva em células tumorais (Capítulo II, Tabela 4).

Os achados observados neste estudo corroboram com os dados encontrados para ensaios de viabilidade celular usando a mesma metodologia de MTT, os quais demonstraram que o extrato bruto de *S. officinalis* (L.) apresenta efeitos citotóxicos com IC_{50} que variam de $78 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ em linhagens tumorais de adenocarcinoma renal, carcinoma da próstata e adenocarcinoma mamário murino (Loizzo et al., 2007; Al-Barazanji et al., 2013) e menor efeito citotóxico em linhagens não tumorais endoteliais da veia umbilical humana (Zare Shahneh et al., 2013a).

Neste trabalho, procurou-se observar as alterações morfológicas causadas pelos extratos de sálvia nas células usadas, através de microscopia e coloração de Giemsa. Nos Capítulo I e II, para o controle negativo, utilizou-se somente o veículo da preparação de cada extrato, ambos os resultados demonstraram células com aspecto morfológico arredondado e íntegro. As células tratadas com os extratos de sálvia, na concentração inibitória de 50% mostraram modificações em sua morfologia e número reduzido de células (Capítulo I, Figuras

3 e 4; Capítulo II, Figura 3). De forma similar ao ensaio de MTT, foram observadas alterações mais intensas em linhagens tumorais quando comparado as não tumorais, demonstrando possível atividade biológica seletiva em linhagens tumorais.

Além de avaliar a viabilidade celular e alterações morfológicas a fim de elucidar a citotoxicidade da *S. officinalis* (L.), no Capítulo II, investigou-se os mecanismos de resposta a morte celular programada nas células expostas aos extratos aquoso e hidroalcoólico. Com este objetivo, levou-se em consideração que células em apoptose tardia ou necrose demonstram padrões semelhantes, uma vez que a anexina V e o PI entram no citosol e atravessam a membrana celular após a permeabilização, portanto, não podem ser distinguidos. Sendo assim, foi utilizada a sobreposição das imagens como parâmetro para avaliar eventos de apoptose inicial, apoptose tardia e/ou necrose.

Os resultados apresentados no Capítulo II demonstraram que a marcação de apoptose tardia/necrose foi observada na maioria das células tratadas com ExtHS em relação ao grupo controle de células que não receberam tratamento. O mesmo foi observado para ExtAS, mas em menor proporção, esses achados foram confirmados pela coloração de laranja de acridina e brometo de etídio (Capítulo II, Figura 4). Em adição, a apoptose tardia/necrose foi observada em maior magnitude em células tumorais quando comparada as células não tumorais.

Neste contexto, nossos resultados gerados no Capítulo II em relação a apoptose, estão em conformidade com os descritos por Slamenova et al. (2004) e Zare Shahneh et al. (2013b), os quais constataram que extratos hidroalcoólico, aquoso e hexânico de sálvia são capazes de induzir a parada do ciclo celular e ativar a cascata bioquímica da apoptose em células de carcinoma de cólon, células de hepatoma humano, linfoma de células B não-Hodkin humano, linfoma de monócitos humanos e leucemia mieloide aguda humana. Deve-se ressaltar que

como continuidade da pesquisa, deve-se proceder a uma investigação mais detalhada para verificar quais vias estão envolvidas no processo de apoptose, bem como para elucidar a hipótese de atividade citotóxica seletiva nas células tumorais empregadas neste trabalho.

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo demonstraram que os extratos de *S. officinalis* (L.) investigados causam alterações morfológicas e atividade citotóxica em linhagens tumorais. Adicionalmente, os extratos obtidos no Capítulo II, apresentam compostos compatíveis com a literatura e, de acordo com dados nela descritos, possuem variada atividade biológica. Outro evento considerável observado foi a apoptose tardia/necrose em maior intensidade em células tumorais quando comparada as células não tumorais.

A presença ou não de combinações sinérgicas, antagonistas ou aditivas dos compostos bioativos presentes nos extratos deve ser investigada para uma melhor compreensão dos efeitos de produtos naturais em humanos, visto que, atualmente, a fitoterapia tornou-se uma fonte de tratamento inserida no Sistema Básico de Saúde (SUS). Por fim, o estudo de plantas medicinais, como a sálvia, revelaram atividades diferenciadas desta planta, que podem ajudar no entendimento das vias de sinalização envolvidas em diversas doenças e, deste modo, levar a descoberta de novas drogas com atuação direta nas células tumorais e com redução de efeitos tóxicos em pacientes com câncer.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho mostraram que a *Salvia officinalis* (L.) possui compostos com significativa atividade farmacológica. Adicionalmente, os solventes utilizados para a extração, as partes utilizadas da planta, o tempo de exposição aos extratos podem influenciar na atividade citotóxica e alterações morfológicas observadas nas linhagens tumorais. Neste sentido, a continuidade da pesquisa torna-se relevante para uma investigação mais detalhada dos resultados obtidos relacionados ao processo de apoptose, bem como para elucidar a hipótese de atividade citotóxica seletiva nas células tumorais empregadas neste estudo.

6.1 Conclusões específicas

- A caracterização química por ESI-QTOF MS/MS em modo negativo do extrato aquoso de sálvia (ExtAS) e extrato hidroalcoólico de sálvia (ExtHS) demonstrou a presença de compostos químicos com importante atividade biológica, tais como: rosmanol e seus isômeros metilcarnosato e ácido 12-metoxicarnosinico, luteolina-7-*O*-glucoronide, além de vários ácidos como cafeico, rosmarínico, málico, succínico, tartárico, cítrico e ursólico;
- A metodologia de GC-MS para a identificação de compostos voláteis mostrou-se adequada para extratos ExtHS, em que se verificou a presença de eucaliptol, α -tujona, β -tujona, cânfora, β -cariofileno, α -cariofileno, viridiflorol e manol;
- A utilização de diferentes solventes para obtenção dos extratos podem modular a quantidade de compostos fenólicos, e conseqüentemente a atividade antioxidante, citotóxica e indutora de apoptose.

- Os extratos estudados apresentaram conteúdo de compostos polifenólicos, capacidade de varrer o radical livre DPPH[•] e ABTS^{•+}, atividade SOD-like maior no extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* (L.) e atividade CAT-like maior no extrato aquoso de *S. officinalis* (L.);
- O tempo de exposição aos extratos de *S. officinalis* (L.) interferem diretamente na viabilidade de linhagens celulares;
- Os extratos de *S. officinalis* (L.) apresentaram menor citotoxicidade em células não tumorais embrionárias de rim humano (HeK-293) e fibroblásto de pulmão humano (MRC-5) em comparação as linhagens tumorais utilizadas neste estudo;
- Os extratos de *S. officinalis* (L.) induziram eventos de apoptose tardia e/ou necrose em células tumorais tratadas com ExtHS e ExtAS em relação ao grupo controle de células que não receberam tratamento. O mesmo foi observado para células não tumorais, mas em menores proporções;
- A seletividade de células tumorais expostas ao extrato de *S. officinalis* (L.) pode levar a descoberta de novas drogas com redução de efeitos tóxicos em pacientes com câncer.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho seria importante:

- ✓ Testar outros tipos de solventes e metodologias de extração para a obtenção de extratos de *S. officinalis* (L.);
- ✓ Realizar o fracionamento químico dos extratos de *S. officinalis* (L.);
- ✓ Avaliar a citotoxicidade da *S. officinalis* (L.) em estudos *in vivo*;
- ✓ Avaliar a expressão de proteínas envolvidas na apoptose e diferencialmente expressas através de Western blot;
- ✓ Avaliar a expressão de marcadores do ciclo celular, apoptose celular e proliferação celular através de imunocitoquímica;
- ✓ Avaliar danos ao DNA utilizando ensaios genotóxicos através do teste cometa.

8. REFERÊNCIAS

- Abu-Darwish, M. S.; Cabral, C.; Ferreira, I. V.; et al. (2013). Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. **Biomed. Res. Int.** 2013: 538940.
- ACS (2013) ACS - AMERICAN CANCER SOCIETY, INC. Cancer Facts & Figures 2013. Atlanta: American Cancer Society, 2013. **Disponível (online)** em:<http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2013/index>. (junho 2014).
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 105: 121-126.
- Ainsworth, E. A.; Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nat. Protoc.** 2: 875-877.
- Akhondzadeh, S.; Noroozian, M.; Mohammadi, M.; et al. (2003). *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. **J. Clin. Pharm. Ther.** 28: 53-59.
- Al-Barazanji, R.; Dizaye, K.; Al-Asadye, A. (2013). Cytotoxic and cytogenetic effects of *Salvia officinalis* on different tumor cell lines. **Middle East J. Int. Med.** 13: 15-25.
- Alley, M. C.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; et al. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Res.** 48: 589-601.
- Alonso, J. (2004). **Tratado de Fitofarmacos y Nutracéuticos**. Rosário, Argentina: Corpus Libras: 954-959.
- Arrigo, A. P. (2007). The cellular "networking" of mammalian Hsp27 and its functions in the control of protein folding, redox state and apoptosis. **Adv. Exp. Med. Biol.** 594: 14-26.
- Awika, J. M.; Yang, L.; Browning, J. D.; et al. (2009). Comparative antioxidant, antiproliferative and phase II enzyme inducing potential of sorghum (*Sorghum bicolor*) varieties. **J. Food Sci. Technol.** 42: 1041-1046.
- Bannister, J. V.; Calabrese, L. (1987). Assays for superoxide dismutase. **Methods Biochem. Anal** 32: 279-312.
- Ben Salem, I.; Fekih, S.; Sghaier, H.; et al. (2013). Effect of ionising radiation on polyphenolic content and antioxidant potential of parathion-treated sage (*Salvia officinalis*) leaves. **Food Chem.** 141: 1398-1405.
- Berdowska, I.; Zielinski, B.; Fecka, I.; et al. (2013). Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. **Food Chem.** 141: 1313-1321.

- Boersma, H. H.; Kietselaer, B. L.; Stolk, L. M.; et al. (2005). Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **J. Nucl. Med.** 46: 2035-2050.
- Bracke, M. E.; Vanhoecke, B. W.; Derycke, L.; et al. (2008). Plant polyphenolics as anti-invasive cancer agents. **Anticancer Agents. Med. Chem.** 8: 171-185.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate oxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, 28: 25-30.
- Brasil. 1988. **Comissão permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira. Farmacopeia Brasileira. Parte II, III e IV. 4ª ed. Rio de Janeiro, 1988.**
- Brasil. 2001. **Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira. Farmacopeia Brasileira. Parte II, III e IV. 4ª ed. Rio de Janeiro, 2001.**
- Brieskorn, C. H.; Biechele, W. (1971). Flavones from *Salvia officinalis* L. 22. Components of *Salvia* off. L. **Arch. Pharm. Ber. Dtsch. Pharm. Ges.** 304: 557-561.
- Bruneton, J. (2001). **Farmacognosia: fitoquímica, plantas medicinales.** 2ª edição. Zargoga: Acribia, 2001. 1099p.
- Butel, J. S.; Morse, S. A. 2009. **Jawets, Melnick & Adelberg: microbiologia médica.** 21 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2009. 820p.
- Cassini, C.; Calloni, C.; Bortolini, G.; et al. (2011). Occupational risk assessment of oxidative stress and genotoxicity in workers exposed to paints during a working week. **Int. J. Occup. Med. Environ. Health** 24: 308-319.
- Ceolin, T.; Ceolin, S.; Heck, R. M.; et al. (2014). Relato de experiência do curso de plantas medicinais para profissionais de saúde. **Rev. Baiana Saude Pub.** 37: 501-511.
- Chaillou, L. L.; Nazareno, M. A. (2006). New method to determine antioxidant activity of polyphenols. **J. Agric. Food Chem.** 54: 8397-8402.
- Cheng, Z.; Su, L.; Moore, J.; et al. (2006). Effects of postharvest treatment and heat stress on availability of wheat antioxidants. **J. Agric. Food Chem.** 54: 5623-5629.
- Cherneva, E.; Pavlovic, V.; Smelcerovic, A.; et al. (2012). The effect of camphor and borneol on rat thymocyte viability and oxidative stress. **Molecules** 17: 10258-10266.
- Choo, W. S.; Yap, J. Y.; Chan, S. Y. (2014). Antioxidant Properties of Two Varieties of Bitter Gourd (*Momordica charantia*) and the Effect of Blanching and Boiling on Them. **Pertanika J. Trop. Agric. Sci.** 37: 121-131.
- Christensen, K. B.; Jorgensen, M.; Kotowska, D.; et al. (2010). Activation of the nuclear receptor PPAR by metabolites isolated from sage *Salvia officinalis* L. **J. Ethnopharmacol.** 132: 127-133.

- Christensen, K. B.; Jorgensen, M.; Kotowska, D.; et al. (2010). Activation of the nuclear receptor PPAR by metabolites isolated from sage *Salvia officinalis* L. **J. Ethnopharmacol.** 132: 127-133.
- Cragg, G. M.; Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. **J Ethnopharmacol**, 100: 72-79.
- Cunha, A. P. (2004). **Plantas e produtos vegetais em cosméticos e dermatologia**. Lisboa, Portugal: Fundação Colouste Gulbenkin; 2004.
- Cuvelier, M.-E.; Richard, H.; Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 73: 645-652.
- Daniel, P. T.; Wieder, T.; Sturm, I.; et al. (2001). The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia** 15: 1022-1032.
- Denicola, A.; Radi, R. (2005). Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. **Toxicology** 208: 273-288.
- Denizot, F.; Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol Methods** 89: 271-277.
- Dent, M.; Dragovic-Uzelac, V.; Penic, M.; et al. (2013). The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. **Food Technol. Biotechnol.** 51.
- Dolan, M. (2011). The role of the Giemsa stain in cytogenetics. **Biotech. Histochem.** 86: 94-97.
- Duarte, R. A. (2010). Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR 7531) tratados com alcaloides isolados de *Pterogyne nitens*. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita, Araraquara.
- El Hadri; A., del Rio, G. M. A.; Sanz, J. S.; et al. (2010). Cytotoxic activity of alpha-humulene and trans-caryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. **An. R. Acad. Nac. Farm.** 76: 343-356.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol.** 35: 495-516.
- Farhat, M. B.; Chaouch-Hamada, R.; Sotomayor, J. A.; et al. (2014). Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. **Ind. Crops Prod.** 54: 78-85.
- Finimundy, T. C.; Gambato, G.; Fontana, R.; et al. (2013). Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising in vitro antitumor activity. **Nutr. Res.** 33: 76-84.

- Fischedick, J. T.; Standiford, M.; Johnson, D. A.; et al. (2013). Structure activity relationship of phenolic diterpenes from *Salvia officinalis* as activators of the nuclear factor E2-related factor 2 pathway. **Bioorg. Med Chem.** 21: 2618-2622.
- Foucher, A. L.; Rachidi, N. Gharbi, S.; et al. (2013). Apoptotic marker expression in the absence of cell death in staurosporine-treated *Leishmania donovani*. **Antimicrob. Agents Chemother.** 57: 1252-1261.
- Freitas, S. R. V. B. (2009). Efeito dos flavonóides de *Croton Betulaster Mull* no controle do crescimento da regulação de citocinas pró-angiogênicas VEGF e TGF- β em células de glioblastoma multiforme humano. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.
- Frozza, C. O.; Garcia, C. S.; Gambato, G.; et al. (2013). Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food Chem. Toxicol.** 52: 137-142.
- Frozza, C. O.; Ribeiro T. S.; Gambato, G.; et al. (2014). Proteomic analysis identifies differentially expressed proteins after red propolis treatment in Hep-2 cells. **Food Chem. Toxicol.** 63: 195-204.
- Fulda, S.; Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene** 25: 4798-4811.
- Galluzzi, L.; Vitale, I.; Abrams, J. M.; et al. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death Differ.** 19: 107-120.
- Garcia, C. S. C.; Lambert, A. P. F; Henriques, J. A. P.; et al. (2012b). Avaliação in vitro do potencial biológico da *Salvia officinalis* L. em células tumorais. **Scientia Medica**, 22.
- Garcia, C. S. C.; Roesch-Ely, M.; Wasum, R. A.; et al. (2012a). Assessment of *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic extract for possible use in cosmetic formulation as inhibitor of pathogens in the skin. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 33: 509-514.
- Generalic, I.; Skroza, D.; Surjak, J.; et al. (2012). Seasonal variations of phenolic compounds and biological properties in sage (*Salvia officinalis* L.). **Chem. Biodivers.** 9: 441-457.
- Gilli, R.; Kacurakova, M.; Mathlouthi, M.; et al. (1994). FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution. **Carbohydr. Res.** 263: 315-326.
- Gomes, R. F.; dos Santos, H. S.; Albuquerque, M. R. J. R.; et al. (2010). *Blainvillea rhomboidea*: constituintes químicos e atividade citotóxica. **Quim. Nova** 33: 1122-1125.
- Goodman, L. S.; Gilman, A. & Brunton, L. L. 2010. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre: AMGH. 2148p.
- Granato, D.; de Oliveira, C. C.; Calado, V. M.; et al. (2014). Statistical approaches to assess the association between phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of

- Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* teas. **Crit. Ver. Food Sci. Nutr.** <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2012.750233>.
- Grivicich, I.; Regner, A.; Rocha, A. B. d. (2007). Morte celular por apoptose. **Ver. Bras. Cancerol**, 53: 335-343.
- Hajra, K. M.; Liu, J. R. (2004). Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis** 9: 691-704.
- Halliwell, B. (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? **Biochem. J.** 401: 1-11.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.** 35: 1147-1150.
- Hamrouni-Sellami, I.; Rahali, F. Z.; Rebey, I. B.; et al. (2013). Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods. **Food Biop. Technol.** 6: 806-817.
- Heinrich, M.; Bremner, P. (2006). Ethnobotany and ethnopharmacy--their role for anti-cancer drug development. **Curr. Drug. Targets** 7: 239-245.
- Hekimi, S.; Lapointe, J.; Wen, Y. (2011). Taking a "good" look at free radicals in the aging process. **Trends. Cell Biol.** 21: 569-576.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. **Nature** 407: 770-776.
- Ho, C. T.; Wang, M.; Wei, G. J.; et al. (2000). Chemistry and antioxidative factors in rosemary and sage. **Biofactors** 13: 161-166.
- Huang, S. C.; Ho, C. T.; Lin-Shiau, S. Y.; et al. (2005). Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappa B and c-Jun. **Biochem. Pharmacol.** 69: 221-232.
- INCA. (2011). Instituto nacional do Câncer. ABC do Câncer - Abordagens básicas para o controle do câncer. **Disponível (online)** http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf. Acesso em 15 mai. 2014, 2011 ed., Vol. 1: 128. Rio de Janeiro. (março 2014).
- INCA. (2013). Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. **Disponível (online)** <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. (Maio 2014).
- Jedinak, A.; Muckova, M.; Kost'alova, D.; et al. (2006). Antiprotease and antimetastatic activity of ursolic acid isolated from *Salvia officinalis*. **Z. Naturforsch. C.** 61: 777-782.
- Jemal, A.; Bray, F.; Center, M. M.; et al. (2011). Global cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.** 61: 69-90.

- Kaliora, A. C.; Kogiannou, D. A.; Kefalas, P.; et al. (2014). Phenolic profiles and antioxidant and anticarcinogenic activities of Greek herbal infusions; balancing delight and chemoprevention? **Food Chem.** 142: 233-241.
- Kamatou, G. P.; Makunga, N. P.; Ramogola, W. P.; et al. (2008). South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. **J. Ethnopharmacol.** 119: 664-672.
- Karmokar, A.; Marczylo, T. H.; Cai, H.; et al. (2012). Dietary intake of rosmarinic acid by Apc(Min) mice, a model of colorectal carcinogenesis: levels of parent agent in the target tissue and effect on adenoma development. **Mol. Nutr. Food Res.** 56: 775-783.
- Katzung, B. G. (2005). **Farmacologia: básica e clínica.** 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- Keshavarz, M.; Mostafaie, A.; Mansouri, K.; et al. (2010). In vitro and ex vivo antiangiogenic activity of *Salvia officinalis*. **Phytother. Res.** 24: 1526-1531.
- Kim, K. H.; Seo, H. S.; Choi, H. S.; et al. (2011). Induction of apoptotic cell death by ursolic acid through mitochondrial death pathway and extrinsic death receptor pathway in MDA-MB-231 cells. **Arch. Pharm. Res.** 34: 1363-1372.
- Kontogianni, V. G.; Tomic, G.; Nikolic, I.; et al. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. **Food Chem.** 136: 120-129.
- Kroemer, G.; Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.** 6: 513-519.
- Kruger, K.; Stefansson, I. M.; Collett, K.; et al. (2013). Microvessel proliferation by co-expression of endothelial nestin and Ki-67 is associated with a basal-like phenotype and aggressive features in breast cancer. **Breast** 22: 282-288.
- Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. 2004. **Robins and Codron - Pathology bases of disease** (7 ed.). China: WB Saunders.
- Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; et al. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Food Sc. Technol. (Campinas)**, 25: 726-732.
- Kwee, J. K. (2014). A Paradoxical Chemoresistance and Tumor Suppressive Role of Antioxidant in Solid Cancer Cells: A Strange Case of Dr. Jekyll and Mr. Hyde. **Biomed. Res. Int.** 2014: 209845.
- Lamaison, J. L.; Petitjean-Freytet, C.; Carnat, A. (1990). Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivatives and antioxidant activity of Apiaceae, Boraginaceae and Lamiceae medicinals. **Ann. Pharm. Fr.** 48: 103-108.
- Lee, J.; Jung, E.; Kim, Y.; et al. (2006). Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK-beta in TNF-alpha-induced upregulation of CCL11 and CCR3. **Br. J. Pharmacol.** 148: 366-375.

- Lin, Y.; Shi, R.; Wang, X.; et al. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. **Curr. Cancer Drug Targets**, 8: 634-646.
- Loizzo, M. R.; Tundis, R.; Menichini, F.; et al. (2007). Cytotoxic activity of essential oils from labiatae and lauraceae families against in vitro human tumor models. **Anticancer Res.** 27: 3293-3299.
- Lu, Y.; Foo, L. Y. (1999). Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry** 51: 91-94.
- Lu, Y. & Foo, L. Y. (2000). Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, 55: 263-267.
- Lu, Y.; Yeap Foo, L. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chem.** 75: 197-202.
- Lu, Y.; Foo, L. Y. (2002). Polyphenolics of *Salvia*--a review. **Phytochemistry**, 59: 117-140.
- Martins, E. R.; Castro, D. M. D.; Castellani, D. C.; et al. 2000. **Plantas Medicinais**. Viçosa UFV: Universidade Federal de Viçosa. 2000. 220p.
- Masterova, I.; Misikova, E.; Sirotkova, L.; et al. (1996). Royleanones in the roots of *Salvia officinalis* L. of domestic provenance and their antimicrobial activity. **Ceska Slov. Farm.** 45: 242-245.
- McGahon, A. J.; Martin, S. J.; Bissonnette, R. P.; et al. (1995). The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Methods Cell Biol.** 46: 153-185.
- Mims, C. A. 1999. **Microbiologia médica**. 2 ed. São Paulo: Manole, 1999. 584p.
- Mirabelli, C. K.; Johnson, R. K.; Sung, C. M.; et al. (1985). Evaluation of the in vivo antitumor activity and in vitro cytotoxic properties of auranofin, a coordinated gold compound, in murine tumor models. **Cancer Res.** 45: 32-39.
- Mochizuki, T.; Kuge, Y.; Zhao, S.; et al. (2003). Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with ^{99m}Tc-annexin V. **J. Nucl. Med.** 44: 92-97.
- Molina, F. P.; Majewski, M.; Perrela, F. A.; et al. (2010). Própolis, sálvia, calêndula e mamona - atividade antifúngica de extratos naturais sobre cepas de *Candida Albicans*. **Braz. Dental Scien.** 11.
- Moss, S. E.; Morgan, R. O. (2004). The annexins. **Genome Biol.** 5: 219.
- Mossi, A. J.; Cansian, R. L.; Paroul, N.; et al. (2011). Morphological characterisation and agronomical parameters of different species of *Salvia* sp. (Lamiaceae). **Braz. J. Biol.** 71: 121-129.
- Murata, S.; Shiragami, R.; Kosugi, C.; et al. (2013). Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer. **Oncol. Rep.** 30: 2647-2652.

- Nakano, K.; Nakayachi, T.; Yasumoto, E.; et al. (2004). Induction of apoptosis by beta-diketones in human tumor cells. **Anticancer Res.** 24: 711-717.
- NHM (2012) Natural History Museum. The Linnaean Plant Name Typification Project. London, NHM. **Disponível (online)** <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/linnaean-typification/database/detail>. (Maio 2014).
- Nobili, S.; Lippi, D.; Witort, E.; et al. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacol. Res.** 59: 365-378.
- Ollanketo, M.; Peltoketo, A.; Hartonen, K.; et al. (2002). Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by pressurized hot water and conventional methods: antioxidant activity of the extracts. **Eur. Food Res. Technol.** 215: 158-163.
- OMS. (2002). **Estratégias de las OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Geneva: OMS, 2002.
- Orsolich, N.; Terzic, S.; Mihaljevic, Z.; et al. (2005). Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. **Biol. Pharm. Bull.** 28: 1928-1933.
- Park, K.-R.; Nam, D.; Yun, H. M.; et al. (2011). beta-Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. **Cancer Lett.** 312: 178-188.
- Pec, M. K.; Aguirre, A.; Moser-Thier, K.; et al. (2003). Induction of apoptosis in estrogen dependent and independent breast cancer cells by the marine terpenoid dehydrothursiferol. **Biochem. Pharmacol.** 65: 1451-1461.
- Pereira, R. S.; Sumita, T. C.; Furlan, M. R.; et al. (2004). Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecções urinárias. **Rev. Saúde Públ.** 38: 326-328.
- Pessuto, M. B. (2009). Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante. **Quim. Nova**, 31: 412-416.
- Pinto, E.; Salgueiro, L. R.; Cavaleiro, C.; et al. (2007). In vitro susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. **Ind. Crops Product.** 26: 135-141.
- Porte, A.; Godoy, R. L. O.; Maia-Porte, L. H. (2013). Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). **Rev. Bras. Plant. Med.** 15: 438-441.
- Radunz, L. L.; Mossi, A. J.; Zakrzewski, C. A.; et al. (2010). Análise da cinética de secagem de folhas de sálvia. **Rev. Bras. Eng. Agrícola Ambient.** 14: 979-986.
- Rakashanda, S.; Rana, F.; Rafiq, S.; et al. (2012). Role of proteases in cancer: A review. **Biotechnol. Mol. Biol. Ver.** 7: 90-101.

- Ramos, A. A.; Azqueta, A.; Pereira-Wilson, C.; et al. (2010). Polyphenolic compounds from *Salvia* species protect cellular DNA from oxidation and stimulate DNA repair in cultured human cells. **J. Agric. Food Chem.** 58: 7465-7471.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; et al. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med.** 26: 1231-1237.
- Rodrigues, M. R.; Kanazawa, L. K.; das Neves, T. L.; et al. (2012a). Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. **J. Ethnopharmacol.** 139: 519-526.
- Rodrigues, A. D.; Scheffel, T. B.; Scola, G.; et al. (2012b). Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylenetetrazole. **Neurochem. Int.** 60: 799-805.
- Roessner, A.; Kuester, D.; Malfertheiner, P.; et al. (2008). Oxidative stress in ulcerative colitis-associated carcinogenesis. **Pathol. Res. Pract.** 204: 511-524.
- Rubic, T.; Lametschwandtner, G.; Jost, S.; et al. (2008). Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. **Nat. Immunol.** 9: 1261-1269.
- Ryu, J. H.; Beuchat, L. R. (1998). Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. **Int. J. Food Microbiol.** 45: 185-193.
- Sain, S.; Naoghare, P. K.; Devi, S. S.; et al. (2014). Beta Caryophyllene and Caryophyllene Oxide, Isolated from *Aegle Marmelos*, as the Potent Anti-inflammatory Agents against Lymphoma and Neuroblastoma Cells. **Antiinflamm. Antiall. Agents Med. Chem.** 13: 45-55.
- Saraste, A.; Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc. Res.** 45: 528-537.
- Serafini, L. A.; Santos, A. C. A.; Touguinha, L. A.; et al. 2002. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais.** Caxias do Sul: EDUCS. 54p.
- Shafiee-Nick, R.; Ghorbani, A.; Vafae Bagheri, F.; et al. (2012). Chronic administration of a combination of six herbs inhibits the progression of hyperglycemia and decreases serum lipids and aspartate amino transferase activity in diabetic rats. **Adv. Pharmacol. Sci.** 2012: 789796.
- Shahidi, F.; Wanasundara, P. K. (1992). Phenolic antioxidants. **Crit. Ver. Food Sci. Nutr.** 32: 67-103.
- Shahrzad, K.; Mahya, N.; Fatemeh, T. B.; et al. (2014). Hepatoprotective and Antioxidant Effects of *Salvia officinalis* L. hydroalcoholic Extract in Male Rats. **Chinese Medicine**, 5: 130-136.

- Sharmila, R.; Manoharan, S. (2012). Anti-tumor activity of rosmarinic acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. **Indian. J. Exp. Biol.** 50: 187-194.
- Simic, M. G.; Jovanovic, S. V. (1994). Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. Paper presented at the ACS Symposium Series.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; G., G.; et al. (2004). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4ª Edição. Zargoga: Acribia; 2004.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Meth. Enzymol.** 299: 152-178.
- Slamenova, D.; Masterova, I.; Labaj, J.; et al. (2004). Cytotoxic and DNA-damaging effects of diterpenoid quinones from the roots of *Salvia officinalis* L. on colonic and hepatic human cells cultured in vitro. **Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.** 94: 282-290.
- Sola, S.; Morgado, A. L.; Rodrigues, C. M. (2013). Death receptors and mitochondria: two prime triggers of neural apoptosis and differentiation. **Biochim. Biophys. Acta** 1830: 2160-2166.
- Song, W.; Shen, D. Y.; Kang, J. H.; et al. (2012b). Apoptosis of human cholangiocarcinoma cells induced by ESC-3 from *Crocodylus siamensis* bile. **World J. Gastroenterol.** 18: 704-711.
- Song, Y. H.; Jeong, S. J.; Kwon, H. Y.; et al. (2012a). Ursolic acid from *Oldenlandia diffusa* induces apoptosis via activation of caspases and phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 beta in SK-OV-3 ovarian cancer cells. **Biol. Pharm. Bull.** 35: 1022-1028.
- Spiridonov, N. A.; Arkhipov, V. V.; Foigel, A. G.; et al. (2003). Protonophoric and uncoupling activity of royleanones from *Salvia officinalis* and euvimials from *Eucalyptus viminalis*. **Phytother. Res.** 17: 1228-1230.
- Sturm, A.; Amino, R.; van de Sand, C., et al. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. **Science** 313: 1287-1290.
- Subhasree, B.; Baskar, R.; Laxmi Keerthana, R.; et al. (2009). Evaluation of antioxidant potential in selected green leafy vegetables. **Food Chem.** 115: 1213-1220.
- Suzuki-Karasaki, Y.; Suzuki-Karasaki, M.; Uchida, M.; et al. (2014). Depolarization Controls TRAIL-Sensitization and Tumor-Selective Killing of Cancer Cells: Crosstalk with ROS. **Front. Oncol.** 4: 128.
- Sylvester, P. W. (2011). Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. **Methods Mol. Biol.** 716: 157-168.
- Taarit, M. B.; Msaada, K.; Hosni, K.; et al. (2010). Physiological changes, phenolic content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. grown under saline conditions. **J. Sci. Food Agric.** 92: 1614-1619.

- Takano, N.; Inokuchi, Y.; Kurachi, M. (2011). Effects of ethanol extracts of herbal medicines on dermatitis in an atopic dermatitis mouse model. **Yakugaku Zasshi** 131: 581-586.
- Tang, X.; Liu, J.; Dong, W.; et al. (2013). The cardioprotective effects of citric Acid and L-malic Acid on myocardial ischemia/reperfusion injury. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.** 2013: 820695.
- Tanigawa, S.; Fujii, M.; Hou, D. X. (2008). Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 72: 797-804.
- Thangasamy, T.; Sittadjody, S.; Limesand, K. H.; et al. (2008). Tyrosinase overexpression promotes ATM-dependent p53 phosphorylation by quercetin and sensitizes melanoma cells to dacarbazine. **Cell Oncol**, 30: 371-387.
- Tounekti, T.; Hernandez, I.; Muller, M.; et al. (2011). Kinetin applications alleviate salt stress and improve the antioxidant composition of leaf extracts in *Salvia officinalis*. **Plant. Physiol. Biochem.** 49: 1165-1176.
- Ulasli, S. S.; Celik, S.; Gunay, E.; et al. (2013). Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester and resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo(a)pyrene. **Asian. Pac. J. Cancer Prev.** 14: 6159-6164.
- Valko, M.; Izakovic, M.; Mazur, M.; et al. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Mol. Cell Biochem.** 266: 37-56.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; et al. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 39: 44-84.
- van Meerloo, J.; Kaspers, G. J. L.; Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. **Methods Mol. Biol.** 731: 237-245.
- Vanden Berghe, T.; Grootjans, S.; Goossens, V.; et al. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. **Methods** 61: 117-129.
- Vasko, L.; Vaskova, J.; Fejercakova, A.; et al. (2014). Comparison of some antioxidant properties of plant extracts from *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis*, *Eleutherococcus senticosus* and *Stevia rebaudiana*. **In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.** 50: 614-622
- Viecelli, C. A.; da Cruz-Silva, C. T. A. (2009). Efeito da variação sazonal no potencial alelopático de Sálvia. **Sem. Ciênc. Agrár.** 30: 39-46.
- Walch, S. G.; Tinzoh, L. N.; Zimmermann, B. F.; et al. (2011). Antioxidant Capacity and Polyphenolic Composition as Quality Indicators for Aqueous Infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). **Front. Pharmacol.** 2: 79.
- Wang, M.; Li, J.; Rangarajan, M.; et al. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). **J. Agric. Food Chem.** 46: 4869-4873.

- Wang, M.; Shao, Y.; Li, J.; et al. (1999). Antioxidative phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). **J. Nat. Prod.** 62: 454-456.
- Wang, M.; Kikuzaki, H.; Zhu, N.; et al. (2000). Isolation and structural elucidation of two new glycosides from sage (*Salvia officinalis* L.). **J. Agric. Food Chem.** 48: 235-238.
- Watanabe, M.; Hitomi, M.; van der Wee, K.; et al. (2002). The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues, and organs. **Microsc. Microanal.** 8: 375-391.
- Weckesser, S.; Engel, K.; Simon-Haarhaus, B.; et al. (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. **Phytomedicine** 14: 508-516.
- WHO (2013) WHO - World Health Organization. **Disponível (online):** <http://www.who.int/cancer/en/>. (Janeiro de 2014).
- Williams, M.; Tietzel, I.; Quick, Q. A. (2013). 1'-Acetoxychavicol acetate promotes caspase 3-activated glioblastoma cell death by overcoming enhanced cytokine expression. **Oncol. Lett.** 5: 1968-1972.
- Willingham, M. C. (1999). Cytochemical methods for the detection of apoptosis. **J. Histochem. Cytochem.** 47: 1101-1110.
- Wu, Y.; Tibrewal, N.; Birge, R. B. (2006). Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. **Trends Cell Biol.** 16: 189-197.
- Wyllie, A. H. (2010). "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. **Mol. Neurobiol.** 42: 4-9.
- Xavier, C. P.; Lima, C. F.; Fernandes-Ferreira, M.; et al. (2009). *Salvia fruticosa*, *Salvia officinalis*, and rosmarinic acid induce apoptosis and inhibit proliferation of human colorectal cell lines: the role in MAPK/ERK pathway. **Nutr. Cancer** 61: 564-571.
- Yamaguchi, T.; Takamura, H.; Matoba, T.; et al. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62: 1201-1204.
- Zare Shahneh, F.; Baradaran, B.; Orangi, M.; et al. (2013a). In vitro Cytotoxic Activity of Four Plants Used in Persian Traditional Medicine. **Adv. Pharm. Bull.** 3: 453-455.
- Zare Shahneh, F.; Valiyari, S.; Baradaran, B.; et al. (2013b). Inhibitory and cytotoxic activities of *Salvia officinalis* L. Extract on human lymphoma and leukemia cells by induction of apoptosis. **Adv. Pharm. Bull.** 3: 51-55.
- Zhang, Y.; Smuts, J. P.; Dodbiba, E.; et al. (2012). Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. **J. Agric. Food. Chem.** 60: 9305-9314.
- Zhao, G. R.; Xiang, Z. J.; Ye T. X.; et al. (2006). Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. **Food Chem.** 99: 767-774.

Zheng, P. W.; Chiang, L. C.; Lin, C. C. (2005). Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. **Life Sci.** 76: 1367-1379.