

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS
ROBERTA SOARES TERRA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E ANTIGENOTÓXICOS DE *Salvia officinalis* E
SEUS ASPECTOS TERAPÊUTICOS EM CIÊNCIA ANIMAL

Alfenas-MG
2017

ROBERTA SOARES TERRA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS E ANTIGENOTÓXICOS DE *Salvia officinalis* E
SEUS ASPECTOS TERAPÊUTICOS EM CIÊNCIA ANIMAL

Dissertação apresentada à Universidade José do
Rosário Vellano - UNIFENAS, como parte das
exigências do Curso de Pós-Graduação *Stricto
Sensu* em Ciência Animal, para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes
Boriollo, BSB, MSc, PhD.

Alfenas-MG

2017

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
Biblioteca Central da UNIFENAS

Terra, Roberta Soares

Avaliação dos efeitos genotóxicos e antigenotóxicos de *Salvia officinalis* e seus aspectos terapêuticos em ciência animal —
Roberta Soares Terra.—Alfenas, 2017.
42 f.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo
Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação
em Ciência Animal -Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas,
2017.

1. Medula óssea 2. *Salvia officinalis* L. 3. Ensaio do micronúcleo 4.
Roedores 5. Quimioterápico DXR I. Universidade José do Rosário
Vellano I. Título

CDU : 615.28:635.74(043)



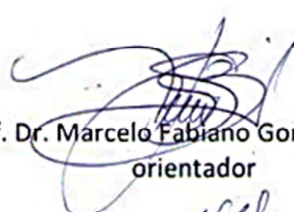
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: "Avaliação dos efeitos genotóxicos e antigenotóxicos de *Salvia officinalis* e seus aspectos terapêuticos em ciência animal".

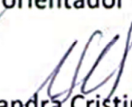
Autor: Roberta Soares Terra

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

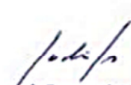
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL** pela Comissão Examinadora.



Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo
orientador



Profa. Dra. Alessandra Cristina Pupin Silvério



Prof. Dr. Manoel Francisco Rodrigues Netto

Alfenas, 31 de março de 2017.



Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts
Diretor de Pesquisa e Pós-graduação
UNIFENAS

Dedico este trabalho aos meus pais, Ilma e Roberto, por seu amor. Ao meu esposo, Kellyson, há quem eu amo muito e me incentivou. E em especial à Deus por me ceder esta grande oportunidade, crescimento e principalmente pela vida e saúde.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Ph.D. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, pelo grande incentivo, confiança e por disponibilizar sempre seus conhecimentos comigo.

Aos professores do mestrado em Ciência Animal da Universidade José do Rosário Vellano, pelo interesse e esforços em prol da pesquisa e do crescimento acadêmico da instituição.

À Universidade José do Rosário Vellano pelo apoio sempre concedido.

Aos meus amigos de turma pela convivência e amizade das quais jamais esquecerei.

Às minhas amigas, Maysa Eduarda de Castro e Thaisla Andrelle da Silva, por dividir seus conhecimentos e tempo comigo.

Aos meus pais que me trouxeram ao mundo e sempre me apoiaram.

Ao meu marido pelo carinho, compreensão e paciência comigo.

À Rede Mineira de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos (REDE MINEIRA TOXIFAR), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Acima de tudo à Deus, sem sua presença seria inviável, pois é dele proveniente todo o meu conhecimento.

RESUMO

SOUZA, Roberta Soares Terra. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e antígenotóxicos de *Salvia officinalis* e seus aspectos terapêuticos em ciência animal**. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - UNIFENAS, Alfenas, 2017.

Salvia officinalis tem sido amplamente utilizada na culinária e na medicina tradicional, e estudos têm identificado inúmeros compostos químicos e potenciais ações terapêuticas. Esta pesquisa avaliou a genotoxicidade do extrato hidroalcoólico liofilizado de folhas de *S. officinalis* L. (SO) usando o ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos. A interação entre SO e os efeitos genotóxicos induzidos pela doxorrubicina (DXR) também foi analisada – ensaio de antígenotoxicidade. Grupos experimentais constituídos de camundongos machos e fêmeas *Swiss albinus* (Unib: SW) foram avaliados após 24-48h de tratamento com ciclofosfamida (CP; 50 mg/Kg), DXR (5 mg/Kg), NaCl (150 mM), SO (0,5–2 g/Kg) e SO (0,5 g/Kg) + DXR (5 mg/Kg). As análises de EPCMNs mostraram diferenças ($p<0,05$) entre os tratamentos de SO (1–2 g/Kg) e NaCl, independentemente do gênero e do tempo. DXR induziu EPCMNs significativamente em ambos os gêneros e tempos de tratamento. Grupos de camundongos tratados com DXR mostraram frequências menores ($p<0,05$) de EPCMNs quando comparados com os grupos controles CP (50 mg/Kg). O tratamento associativo (500 mg/Kg de SO + 5 mg/Kg de DXR) não reduziu a frequência de EPCMNs ($p<0,05$) induzida por DXR. As proporções de EPC/ENC entre tratamentos controles (NaCl, CP e DXR) e experimentais genotóxicos e antígenotóxicos (SO; SO + DXR) foram insignificantes ($p<0,05$). Os resultados sugerem efeitos moderadamente genotóxicos (clastogenia e/ou aneugenia) de folhas de *S. officinalis* L., dose-dependente (i.e., a partir de 1 g/Kg) e gênero- e tempo-independentes. Contudo, *S. officinalis* não apresenta toxicidade sistêmica e efeitos antígenotóxicos (SO + DXR) nas condições estabelecidas no presente teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos.

Palavras-chave: Medula óssea, *Salvia officinalis* L., ensaio do micronúcleo, roedores, quimioterápico DXR.

ABSTRACT

SOUZA, Roberta Soares Terra. **Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of *Salvia officinalis* and its therapeutic aspects in animal science**. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - UNIFENAS, Alfenas, 2017.

Salvia officinalis has been widely used in culinary and traditional medicine, and studies have identified numerous chemical compounds and potential therapeutic actions. This study evaluated the genotoxicity of lyophilized hydroalcoholic extract of *S. officinalis* L. (SO) leaves using the micronucleus assay in mouse bone marrow. The interaction between SO and the genotoxic effects induced by doxorubicin (DXR) was also analyzed – antigenotoxicity assay. Experimental groups consisting of male and female *Swiss albinus* mice (Unib: SW) were evaluated after 24-48h treatment with cyclophosphamide (CP; 50 mg/kg), DXR (5 mg/kg), NaCl 0.5-2 g/kg) and SO (0.5 g/kg) + DXR (5 mg/kg). The PCEMN analyzes showed differences ($p<0.05$) between SO (1-2 g/kg) and NaCl treatments, regardless of gender and time. DXR induced EPCMNs significantly in both genders and treatment times. Groups of mice treated with DXR showed lower frequencies ($p<0.05$) of PCEMNs when compared to CP control groups (50 mg/kg). Associative treatment (500 mg/kg SO + 5 mg/kg DXR) did not reduce the frequency of DXR-induced PCEMNs ($p<0.05$). The PCE/NCE ratio between control (NaCl, CP and DXR) and experimental genotoxic and antigenotoxic (SO; SO + DXR) treatments were insignificant ($p<0.05$). The results suggest moderately genotoxic effects (clastogeny and/or aneugeny) of *S. officinalis* L. leaves, dose-dependent (i.e., from 1 g/kg) and gender- and time-independent. However, *S. officinalis* has no systemic toxicity and antigenotoxic effects (SO + DXR) under the conditions established in the present micronucleus test in mouse bone marrow.

Key words: Bone marrow, *Salvia officinalis* L., micronucleus test, rodents, chemotherapeutic DXR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência de EPCMNs e a razão de EPC/ENC na medula óssea de camundongos machos e fêmeas <i>Swiss albinus</i> após tratamento de 24h e 48h. Dados obtidos a partir dos tratamentos controles (NaCl, CP e DXR) e das avaliações de genotoxicidade e antigenotoxicidade das folhas de <i>Salvia officinalis</i> L. (SO)	28
--	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	10
3.	REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1.	Gênero <i>Salvia</i>	11
3.2.	Importância dos ensaios genéticos toxicológicos.....	14
3.3.	Plantas medicinais como opção para doenças veterinárias gastrointestinal e respiratória	16
4.	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1.	Fitoterápico	21
4.2.	Sistema – teste <i>in vivo</i>	21
4.3.	Grupos experimentais	22
4.4.	Processamento da medula óssea e análise celular.....	23
4.5.	Análise estatística	24
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
6.	CONCLUSÃO.....	32
7.	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUCAO

Pesquisas envolvendo plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. Considerável parcela da população mundial utiliza a medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior parte dessa terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios biologicamente ativos. No Brasil, cerca de 8% das 100.000 espécies vegetais catalogadas foram estudadas quanto as suas propriedades químicas, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas. O panorama brasileiro na área farmacêutica revela um gasto de aproximadamente dois a três bilhões de dólares por ano na importação de matérias-primas empregadas na produção de medicamentos. Ainda, tal panorama mostra que 84% dos fármacos consumidos no país provêm da importação e 78-80% dos fármacos produzidos provêm das empresas multinacionais, índices que justificam a busca de alternativas para superar a dependência externa por parte da indústria químico-farmacêutica brasileira.

O gênero *Salvia*, comumente conhecido como sálvia, é o maior membro da família Lamiacea ou hortelã, contendo mais de 900 espécies em todo o mundo. Muitas espécies de *Salvia*, incluindo *Salvia officinalis* (sálvia comum), são nativas da região Mediterrânea e algumas espécies de *Salvia* têm sido usadas em todo mundo tanto como temperos aromatizantes quanto na medicina tradicional à base de plantas.

Apesar de algumas pesquisas suportarem a efetividade do potencial terapêutico da espécie de planta *Salvia officinalis* L. [distúrbios digestivos e circulatorios, bronquites, tosse, asma, angina, inflamações de boca e garganta, depressão, sudorese excessiva, doenças de pele, alterações do sistema nervoso, circulação sanguínea e coração, sistema respiratório, sistema digestivo, doenças endócrinas e metabólicas, propriedades carminativas, antiespasmódico, anti-séptico e adstringente, fortes atividades antioxidantes, ações antibacterianas (significante atividade antibacteriana contra *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus spp.*, e algumas bactérias bucais ou cariogênicas tais como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Actinomyces viscosus*) e de eliminação de radicais livres], investigações visando o conhecimento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos não foram observadas até o presente momento.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Apesar de algumas pesquisas suportarem a efetividade do potencial terapêutico da espécie de planta *Salvia officinalis* L., investigações visando o conhecimento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos não foram observadas até o presente momento. Objetivando contribuir também com as informações sobre o potencial genotóxico e anti-genotóxico de extratos vegetais, fitoterápicos e produtos naturais, a presente pesquisa irá avaliar os efeitos mutagênicos do extrato hidroalcoólico (extrato fluido) de folhas de *S. officinalis* L. usando o ensaio do micronúcleo *in vivo* na medula óssea de camundongos. A ação da concentração máxima permitida de *S. officinalis* L. sobre os efeitos genotóxicos induzidos pelo DXR (cloridrato de doxorrubicina) também será estudada (i.e., avaliação anti-mutagênica).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Gênero *Salvia*

O gênero *Salvia*, comumente conhecido como sálvia, é o maior membro da família Lamiacea ou hortelã, contendo mais de 900 espécies em todo o mundo (NIKAVAR et al., 2008; ITANI et al., 2008). Na sua maioria, essas plantas são aromáticas e perenes, com flores em diferentes cores (AYATOLLAHI et al., 2009). Muitas espécies de *Salvia*, incluindo *Salvia officinalis* (salvia comum), são nativas da região Mediterrânea e algumas espécies de *Salvia* têm sido usadas em todo mundo tanto como temperos aromatizantes quanto na medicina tradicional à base de plantas (AYATOLLAHI et al., 2009; SMIDLING et al., 2008). *S. officinalis* tem numerosos nomes comuns. Alguns dos nomes mais conhecidos incluem sálvia, sálvia comum, sálvia de jardim, sálvia dourada, sálvia de cozinha, sálvia verdadeira, sálvia culinária, sálvia dalmata e sálvia folhosa. Formas cultivadas incluem sálvia roxa e sálvia vermelha. Na Turquia, *S. officinalis* é amplamente conhecida como *adaçayı*, que significa “*island tea*”. Em Levant, ela é chamada de *maramia* (HAMIDPOUR et al., 2014).

O chá de sálvia tem sido usado tradicionalmente para o tratamento de distúrbios digestivos e circulatórios, bronquites, tosse, asma, angina, inflamações de boca e garganta, depressão, sudorese excessiva, doenças de pele, e muitas outras doenças (RAMI & LI, 2011; WALCH et al., 2011; KHAN et al., 2011). Óleos essenciais de *Salvia* têm sido usados no tratamento de uma ampla escala de doenças como aquelas do sistema nervoso, circulação sanguínea e coração, sistema respiratório, sistema digestivo, e doenças endócrinas e metabólicas. Em adição, óleos essenciais de sálvia demonstraram propriedades carminativas, antiespasmódico, antisséptico e adstringente (LOIZZO et al., 2007; RADULESCU et al., 2004).

O óleo essencial de espécies de *Salvia* apresenta várias composições dependendo dos fatores genéticos, climáticos, sazonais e ambientais (HADRI et al., 2010). Alguns compostos químicos como flavonóides, terpenóides e óleos essenciais estão presentes em diferentes espécies de *Salvia* (AYATOLLAHI et al., 2009). Óleos essenciais são fontes muito importantes para a triagem de agentes anticâncer, antimicrobiano, antioxidante e eliminadores de radicais livres (HUSSAIN et al., 2011). *S. officinalis* (salvia comum) é considerada para ter a maior quantia de óleos essenciais comparada a outras espécies

Salvia (RAMI & LI, 2011; CROTEAU et al., 1981). Embora presentes em diferentes concentrações, em todas as amostras de *S. officinalis* os principais componentes são: 1,8-cineol, cânfora, borneol, acetato de bornilo, canfeno, α - e β -tuiona, linalol, α - e β -cariofileno, α -humuleno, α - e β -pineno, viridiflorol, pimaradiene, ácido salvianólico, rosmarínico, ácido carnosólico, ácido ursólico, etc (KHAN et al., 2011; CROTEAU et al., 1981). Estudos têm mostrado que algumas propriedades biológicas do óleo essencial de *Salvia* dependem da cânfora, do 1,8-cineol e da α - e β -tuiona (RADULESCU et al., 2004). O óleo essencial de sálvia contém aproximadamente 20% de cânfora e quando as folhas expandem há um aumento no conteúdo de cânfora (AVATO et al., 2005).

Em um estudo, o composto mais poderoso para a eliminação de radicais livres foi reportado para ser a α - e β -tuiona, o acetato de bornilo, a cânfora, a mentona e o 1,8-cineol no óleo essencial (HUSSAIN et al., 2011). No mesmo estudo, o óleo essencial de *Melissa officinalis* e *S. officinalis* mostraram melhores atividades antioxidantes do que outras plantas Lamiaceae (HUSSAIN et al., 2011). Sálvia também é uma fonte natural de flavonóides e compostos polifenólicos (e.g., ácido carnósico, ácido rosmarínico e ácido cafeico) possuindo fortes atividades antioxidantes, antibacterianas e de eliminação de radicais livres (BARANAUSKIENE et al., 2011). A maioria dos ácidos fenólicos em espécies de *Salvia* é derivada do ácido cafeico o qual é o bloco de construção de uma variedade de metabolitos de plantas (KAMATOU et al., 2010). O ácido cafeico desempenha um papel central na bioquímica de plantas Lamiaceae, e ocorre principalmente na forma de dímero em ácido rosmarínico (KAMATOU et al., 2010). Ácido carnósico e ácido rosmarínico, os quais estão presentes em altas concentrações no extrato de plantas de salvia, têm demonstrado fortes propriedades antioxidantes (YURTSEVEN et al., 2008). O ácido ursólico, também um componente de sálvia, tem forte propriedade antiinflamatória, e tem sido considerado como uma medida de controlo de qualidade para os efeitos antiinflamatórios de soluções diferentes (BARICEVIC et al., 2001).

Um total de 28 componentes foi identificado em *S. officinalis*. Os principais componentes no óleo de sálvia foram 1,8-cineol, cânfora, α -tuiona, β -tuiona, borneol, e viridiflorol. Os quimiotipos de sálvia não foram determinados nas amostras investigadas. As concentrações dos principais componentes nas drogas obtidas a partir de diferentes tipos de sálvia e em diferentes localizações variaram aproximadamente na mesma escala como as concentrações destes compostos nos óleos de drogas obtidas a

partir de outros países. A concentração relativamente alta de tujonas tóxicas parece ser característica de folhas de sálvia cultivadas em diferentes localizações (HAMIDPOUR et al., 2014).

Um estudo conduzido sobre os efeitos antibacterianos de sálvia contra bactérias de alimentos em decomposição selecionados *in vitro* indica que o extrato aquoso de sálvia exerceu significativa atividade antibacteriana e este foi mais efetivo contra *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus* spp. (STANOJEVIC et al., 2010). O óleo essencial de sálvia também foi considerado uma boa alternativa aos antibióticos tradicionais bem como conservantes de alimentos (RAMI et al., 2011). Os achados de outro estudo suportam a visão de que o extrato hidroalcoólico de *S. officinalis* tem efeito inibitório de crescimento sobre algumas bactérias bucais ou cariogênicas tais como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Actinomyces viscosus*. Com base neste estudo e o interesse global na utilização de tratamentos tradicionais, em vez de soluções químicas, *S. officinalis* com seus efeitos bactericidas poderiam ser um medicamento natural para o tratamento de doenças que afetam a boca e o dente (KERMANS SHAH et al., 2009). Um estudo mostrou que sálvia, juntamente com diferentes extratos de plantas, foi compatível aos conservantes sintéticos, e o resultado confirmou que o extrato aquoso de *S. officinalis* pode ser usada em biotecnologia como um ingrediente conservante natural na indústria alimentar (STANOJEVIC et al., 2010). Outro estudo de atividade antibacteriana do óleo essencial de sálvia em altas concentrações exibiu uma melhor eficiência quando comparado aos antibióticos (RAMI et al., 2011).

Pesquisas envolvendo plantas medicinais e seus extratos vêm crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo. Considerável parcela da população mundial utiliza a medicina popular para seus cuidados primários em relação à saúde, e se presume que a maior parte dessa terapia tradicional envolve o uso de extratos de plantas ou seus princípios biologicamente ativos (FARN SWORTH et al., 1985; KAUR et al., 2005). No Brasil, cerca de 8% das 100.000 espécies vegetais catalogadas foram estudadas quanto as suas propriedades químicas, e estima-se que apenas 1.100 espécies tenham sido avaliadas quanto às suas propriedades terapêuticas (GARCIA et al., 1996). O panorama brasileiro na área farmacêutica revela um gasto de aproximadamente dois a três bilhões de dólares por ano na importação de matérias-primas empregadas na produção de medicamentos. Ainda, tal panorama mostra que 84% dos fármacos consumidos no país provêm da

importação e 78-80% dos fármacos produzidos provêm das empresas multinacionais (BERMUDEZ, 1995; MIGUEL & MIGUEL, 1999), índices que justificam a busca de alternativas para superar a dependência externa por parte da indústria químico-farmacêutica brasileira.

3.2. Importância dos ensaios genéticos toxicológicos

Compostos biologicamente ativos têm sido reconhecidos quanto as suas propriedades farmacológicas, contudo vários desses compostos não puderam ser introduzidos em terapêutica devido às suas propriedades toxicológicas, carcinogênicas e mutagênicas (AMES, 1983; KONSTANTOPOULOU et al., 1992; TAVARES, 1996). No desenvolvimento de novos fármacos, as análises dos ensaios de genotoxicidade representam considerável peso, visto que a maioria das indústrias farmacêuticas delibera o processamento de um novo agente terapêutico com base também nos dados de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (PURVES et al., 1995). Nesse contexto, os ensaios para avaliação da atividade mutagênica das plantas usadas pela população bem como suas substâncias isoladas, são necessários e importantes para estabelecer medidas de controle no uso indiscriminado. Além disso, é preciso esclarecer os mecanismos e as condições que mediarão o efeito biológico, antes que as plantas sejam consideradas como agentes terapêuticos (VARANDA, 2006).

Os efeitos genotóxicos de um agente mutagênico potencial dependem do seu alvo celular. Alguns compostos químicos necessitam ser metabolizados antes de adquirir sua capacidade mutagênica (MATEUCA et al., 2006). Agentes mutagênicos podem induzir alterações genômicas atingindo direta e/ou indiretamente a molécula de DNA, ou ligando-se às proteínas envolvidas na manutenção da integridade genômica (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). As consequências das interações entre os agentes mutagênicos e os seus alvos podem conduzir a diferentes tipos de danos no DNA (aductos de DNA, sítios alcalinos lábeis, rupturas dos filamentos) e mutações que vão desde alterações nucleotídicas simples (mutações gênicas) até alterações cromossômicas estruturais (mutações cromossômicas) ou numéricas (mutações genômicas). Finalmente, o destino celular é então determinado pelas várias lesões provocadas sobre o genoma e a capacidade celular intrínseca de reparo ou processos de eliminação por apoptose (DECORDIER et al., 2002).

Tanto quanto os estudos de genotoxicidade estão preocupados, o ensaio do micronúcleo *in vivo* (*micronucleus* – MN) em medula óssea de roedores desempenha um papel crucial à bateria de testes que objetivam a identificação de riscos por agentes mutagênicos (MATEUCA et al., 2006), especialmente à avaliação de riscos mutagênicos em que permite a consideração de fatores metabólicos *in vivo*, da farmacocinética e dos processos de reparo do DNA, embora estes possam variar entre as espécies, entre tecidos e entre os mecanismos genéticos (OECD, 1997a,b; RIBEIRO et al., 2003). Uma vez que o eritroblasto da medula óssea se desenvolve em um eritrócito policromático (*polychromatic erythrocyte* – PCE) (i.e., célula originada após a extrusão do núcleo principal), qualquer micronúcleo que tenha sido formado pode permanecer atrás, de outro modo, no citoplasma anucleado. Deste modo, a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (*micronucleated polychromatic erythrocytes* – MNPCEs) tem sido o principal *endpoint*. Por outro lado, a mensuração de MNPCEs em sangue periférico tem sido igualmente aceitável em qualquer espécie na qual a inabilidade do baço remover eritrócitos micronucleados tem sido demonstrada, ou a qual tem mostrado uma adequada sensibilidade para detectar agentes que causam aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais. Os resultados positivos (i.e., um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados em animais tratados) indicam que uma substância induz a formação de micronúcleos, os quais surgem como um resultado de danos cromossômicos ou danos ao aparato mitótico nos eritroblastos das espécies teste, enquanto que os resultados negativos indicam que, sob as condições experimentais, a substância teste não induz a produção de micronúcleos nos eritrócitos imaturos das espécies teste. Todavia, o número de eritrócitos normocromáticos (*normochromatic erythrocyte* – NCE) no sangue periférico, que contém micronúcleos entre um dado número de eritrócitos maduros, pode também ser usado como *endpoint* deste ensaio (OECD, 1997c; RIBEIRO et al., 2003). Além disso, o conhecimento dos efeitos genotóxicos induzidos por fitoterápicos e alimentos empregando o ensaio do MN *in vivo* em mamíferos tem sido o anseio de vários grupos de pesquisadores (CHANDRASEKARAN et al., 2011; SILVA et al., 2011; INDART et al., 2007; VENKATESH et al., 2007; ALVES et al., 2013).

Micronúcleos (MNs) são corpos extranucleares pequenos que surgem durante a divisão celular a partir de fragmentos cromossômicos / cromossômicos acêntricos ou cromossomos / cromátides totais que se atrasam na anáfase e não são incluídos nos

núcleos filhos durante a telófase (FENECH & MORLEY, 1985). Micronúcleos abrigando fragmentos cromossômicos podem resultar de quebras do DNA de fita dupla, conversão de quebras de fita simples (*single-strand breaks* – SSBs) em quebras de fitas duplas (*double-strand breaks* – DSBs) após a replicação celular, ou inibição de síntese de DNA. O reparo equivocado de duas quebras cromossômicas pode conduzir a um rearranjo cromossômico assimétrico produzindo um cromossomo dicêntrico e um fragmento acêntrico. Frequentemente, os centrômeros de cromossomos dicêntricos são puxados para polos opostos das células durante a anáfase resultando na formação de uma ponte nucleoplásmica (*nucleoplasmic bridge* – NPB) entre os núcleos filhos e um fragmento acêntrico que fica atrasado para formar um MN (FENECH et al., 2005; THOMAS et al., 2003). Micronúcleos abrigando cromossomos totais são essencialmente formados a partir de defeitos na maquinaria de segregação cromossômica tais como deficiências nos genes que controlam o ciclo celular, falha do fuso mitótico, cinetócoro, ou outras partes do aparato mitótico ou por danos até subestruturas cromossômicas, rompimento mecânico (ALBERTINI et al., 2000) e hipometilação do DNA centromérico (FENECH et al., 2005). Micronúcleos podem também surgir por amplificação gênica via ciclos de quebra-fusão-ponte (*breakage-fusion-bridge* – BFB), quando o DNA amplificado está seletivamente localizado em locais específicos da periferia do núcleo e eliminado via brotamento nuclear (*nuclear budding* – NBUD) durante a fase S do ciclo celular (FENECH, 2002). O destino do MN após a sua formação na célula micronucleada é pobremente entendido. Seu destino pós-mitótico inclui: (i) eliminação da célula micronucleada como uma consequência do apoptose (DECORDIER et al., 2002), (ii) expulsão da célula (quando o DNA dentro do MN não é esperado para ser funcional ou capaz de replicação devido a ausência dos componentes citoplasmáticos necessários); (iii) reincorporação dentro do núcleo principal (quando o cromossomo reincorporado pode ser indistinguível daqueles do núcleo principal e pode retomar a atividade biológica normal); (iv) retenção dentro do citoplasma da célula como uma entidade extra-nuclear (quando o MN pode completar um ou mais rodadas de replicação cromossômica/DNA) (LEACH & JACKSON-COOK, 2004).

3.3. Plantas medicinais como opção para doenças veterinárias gastrointestinal e respiratória

Um padrão elevado de saúde animal e bem-estar tem sido o alvo na pecuária moderna. A saúde no início da vida representa uma pré-condição para uma constituição superior e resulta em uma alta produtividade mais tarde na vida. O sistema imunitário dos mamíferos ainda está imaturo nas primeiras semanas de vida e, em combinação colostrai inadequada, o contato com agentes patogênicos resulta frequentemente em elevada morbidade e mortalidade em animais jovens de criação. O manejo inadequado, incluindo transporte de longa distância, jejum, mistura de indivíduos de diferentes fontes, mudanças abruptas na dieta ou dieta incorreta, superlotação de currais, clima impróprio e higiene subótima estão crucialmente envolvidos em doenças infecciosas (CUSACK et al., 2003; DONOVAN et al., 1998; FAIRBROTHER et al., 2005; MEGANCK et al., 2014; TAYLOR et al., 2010ab). Em bezerros e leitões, os primeiros locais de contato para patógenos são os epitélios do trato gastrointestinal e respiratório. Quatro dos mais importantes complexos de doenças infecciosas em bezerros e leitões (diarreia de bezerros neonatal, doença respiratória bovina, diarreia de leitão neonatal, diarreia pós-desmame, e complexo de doença respiratória porcina) levam a uma diminuição do desempenho e do bem-estar dos animais e, portanto, elevadas perdas econômicas.

Em bezerros e leitões, uma variedade de agentes patogênicos pode causar doenças gastrointestinais. A diarreia neonatal do bezerro representa a causa mais frequente de perdas de bezerros (LORENZ et al., 2011ab; MEGANCK et al., 2014; WINDEYER et al., 2014) com uma mortalidade de cerca de 55% nos EUA e na Coreia (CHO & YOON, 2014), e uma morbidade variando de 12% nos EUA, 23% no Canadá e até 53% nos Países Baixos (BARTELS et al., 2010; DONOVAN et al., 1998; WINDEYER et al., 2014). O suplemento colostrai insuficiente e falha de alimentação ou dieta inadequada são desencadeadores para diarreia em bezerros (KASKE et al., 2009; LUGINBÜHL et al., 2005; UHDE et al., 2008). Nos leitões de aleitamento e pós-desmame, uma infecção com cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênica tem sido relatada para levar a perdas econômicas elevadas como resultado de uma alta morbidade e mortalidade constante (THOMSON et al., 2012). As infecções por *Escherichia coli* produtoras de verocitotoxinas podem levar, embora raramente, a uma doença de edema severa em porcos desmamados (FAIRBROTHER & GYLES, 2012; FRYDENDAHL, 2002; ROSSI et al., 2014). A prevalência de diarreia pós-desmame foi relatada como sendo de 35% na França (MADEC et al., 1998), a morbidade foi declarada superior a 50% na Finlândia (LAINE et al., 2008), e a mortalidade pode ser tão alta quanto 25% sem terapia (FAIRBROTHER &

GYLES, 2012). A incidência de diarreia neonatal em leitões depende da concentração de anticorpos no colostro porcino. Enquanto os leitões são protegidos pelos anticorpos no leite porcino, a predisposição para diarreia pós-desmame aumenta com o desmame. Fatores adicionais para a lacuna imunológica, incluindo mudanças abruptas na dieta, um aumento no pH do estômago e alterações na configuração enzimática e celular do intestino levam a disbiose (FAIRBROTHER et al., 2005, 2012; ROSSI et al., 2012).

As doenças respiratórias em bezerros e leitões foram avaliadas como uma das doenças mais graves no que diz respeito a perdas financeiras devido à diminuição do ganho de peso, custos para intervenções veterinárias e maior condenação no abate (VAN ALSTINE, 2012). Em bovinos de engorda, a doença respiratória bovina é um desafio considerável, com uma morbidade que varia de 49% na Suíça a 80% nos EUA (BÄHLER et al., 2012; HILTON, 2014). Existe uma disposição do trato respiratório bovino a doenças respiratórias. O microclima impróprio, os gases nocivos e a perturbação através do transporte são fatores predisponentes adicionalmente (KASKE et al., 2012; STÖBER et al., 2002). Doenças respiratórias também são de grande importância em suínos. As taxas de morbidade diferem entre os países; uma morbidade de 10 e 40% foi relatada para a Dinamarca e para os EUA, respectivamente (HARMS et al., 2002; HANSEN et al., 2010). Taxas de mortalidade até 15% (CHOI et al., 2003) foram relatadas e atribuídas com o complexo de doença respiratório porcino. A interação de vários patógenos, bem como as condições de habitação, gestão e fatores genéticos, foram relatados para causar broncopneumonia (CHOI et al., 2003; HANSEN et al., 2010)

A terapia antibiótica é frequentemente a terapia de primeira linha de doenças do trato gastrointestinal e respiratório em bezerros e leitões. Um estudo publicado anteriormente mostrou que os bezerros de engorda recebem antibióticos por 30 dias em média. Além disso, os bezerros são frequentemente tratados com antibióticos de reserva como fluoroquinolonas e cefalosporinas da 3ª e 4ª geração (BEER et al., 2015).

Na produção de suínos, a administração pro- e meta-filática de rotina de agentes antimicrobianos é uma prática amplamente utilizada em rebanhos que sofrem de diarreia neonatal, diarreia pós-desmama ou doença de edema independentemente do aumento da ineficácia em consequência da resistência bacteriana (FAIRBROTHER et al., 2005). Mais de 60% dos antibióticos utilizados na criação de suínos são administrados por tratamento em grupo oral (PENDL et al., 2015). Os dados sobre a monitorização da resistência antimicrobiana indicaram que 59% das cepas de *Escherichia coli* porcinas de

amostras fecais apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico e 12% a mais de quatro dos antibióticos que foram investigados (EDI & BLV, 2013). Com relação ao aumento da resistência antimicrobiana em todo o mundo, a questão predominante da redução de antibióticos em animais produtores de alimentos está buscando novas opções para prevenir e curar doenças mais comuns e dispendiosas. A melhoria da biossegurança e das condições de habitação, os novos regimes de alimentação, as vacinações e a utilização de raças resistentes às doenças são disposições importantes.

A etiopatologia e sintomatologia diversa de doenças em animais jovens é um desafio e exige uma terapia multi-alvo. Em contraste com os fármacos mono-alvo sintetizados quimicamente, as características do fármaco multi-alvo são típicas para plantas medicinais com base na sua composição multicomponente, o que pode levar a efeitos pleiotrópicos, sinérgicos ou aditivos no organismo (WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009; WILLIAMSON, 2001). O amplo espectro de produtos naturais de plantas representa um potencial prevaiente e amplamente desempregado especialmente para medicação de herbívoros e animais omnívoros (REICHLING & SALLER, 2001). As plantas medicinais têm sido utilizadas em todo o mundo para a prevenção e tratamento de doenças em seres humanos e animais durante séculos. A pesquisa etnoveterinária e os documentos subjacentes que descrevem o uso tradicional e recente de plantas medicinais (DISLER et al., 2014; MAYER et al., 2014; SCHMID et al., 2012) poderiam ser exploradas como ferramentas alternativas ou de suporte para reduzir o uso de antibióticos nos animais. Adicionalmente, sabe-se que algumas plantas medicinais modulam o sistema imunitário e a inflamação e podem ser usadas como profilaxia para doenças infecciosas.

Em recente revisão sistemática (AYRLE et al., 2016), foram identificadas espécies comuns de plantas medicinais como uma potencial opção terapêutica futura para doenças gastrointestinais e respiratórias em bezerros e leitões. Os efeitos versáteis de plantas medicinais como “fármacos multi-alvo” podem ter um potencial para o tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais em bezerros e leitões, com base nas suas composições multi-componente específicas para plantas. As plantas medicinais são improváveis para substituir os medicamentos químicos, como regra geral, mas eles podem ser um único ou pelo menos um tratamento complementar. Em conjunto com a habitação, alimentação e higiene, as plantas medicinais fazem parte de uma opção natural sustentável para melhorar a saúde animal e reduzir o uso de antimicrobianos na

pecuária. Contudo, resultados fornecem suporte para a necessidade de investigação adicional *in vitro*, *in vivo* e clínico focado em fitoterapia para doenças emergentes e desafiantes recentemente em gado. Embora uma grande quantidade de estudos sobre espécies de plantas medicinais está disponível, a maioria dos estudos clínicos e experimentais foram realizados em seres humanos e animais de experimentação. São necessárias mais pesquisas para avaliar o potencial das plantas medicinais para o tratamento de animais de fazenda. Dados recentes fornecem orientação sobre plantas medicinais promissoras para futuras investigações em gado: os candidatos mais promissores para doenças gastrointestinais são *Allium sativum* L., *Mentha x piperita* L. e *Salvia officinalis* L.; para doenças do trato respiratório, *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH, *Thymus vulgaris* L. e *Althea officinalis* L. foram os mais promissores, e *Echinacea purpurea* (L.) MOENCH, *Camellia sinensis* (L.) KUNTZE, *Glycyrrhiza glabra* L. e *Origanum vulgare* L. foram identificados como os melhores candidatos para a modulação do sistema imunológico e da inflamação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Fitoterápico

Extrato fluido da folha de *Salvia officinalis* L. foi obtido comercialmente e armazenada de acordo com as recomendações do fabricante [CEVS No. 355400301-211-000001-1-6, Reg. IBAMA 5535531, BioTae Ind. e Com. de Insumos Farmacêuticos Cosméticos e Alimentícios Ltda-ME, Tatuí, SP, Brasil]. Alíquotas (0,5 L) desse extrato foram submetidas ao processo de remoção de solvente por evaporação rotativa (40 rpm) (Rotary Evaporator RV 10 Control V, IKA® Works, Inc., USA) acoplado em sistema de aquecimento (40 °C) (Heating Baths HB10, IKA® Works, Inc., USA), bomba de vácuo (175 mbar) (Chemistry diaphragm pump MD 1C, VACUUBRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany), recirculador e destilador de água (10 °C) (Banho Ultratermostatizado Microprocessado Digital, SPLABOR, cód. # SP-152/10, Presidente Prudente, SP, Brasil) e garrafa de evaporação (RV 10.85 Evaporation Flask, NS 29/32-2L, IKA® Works, Inc., USA). O produto final foi transferido para um frasco de reação de 0,5 L (SCHOTT® DURAN®) e mantido a -20 °C por 24 horas a fim de avaliar o congelamento do produto final e a eficácia do processo de evaporação do solvente (ANVISA, 2010; BORIOLLO et al., 2014ab). Em seguida, alíquotas (20 mL) do produto final foram transferidas para frascos de vidro tipo penicilina (50 mL) e liofilizadas (0.12 mbar at -50 °C) (Lyophilizer model Alpha 1-2 LDPlus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH®, Germany) e suas massas secas foram medidas (Electronic Analytical Balance AUW-220D, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). O produto final liofilizado foi preparado em solvente aquoso (água tipo 1, Sistema Milli-Q Direct 8, Millipore Indústria e Comércio Ltda., Barueri, SP, Brasil) em concentração de 1× (solução a 10%), esterilizado por filtração (Millipore Corporation, hydrophilic Durapore® PVDF, 0,22 µm, Ø 47 mm, cat. # GVWP 047 00), e estocados em tubos estéreis de polipropileno (50 mL) a -70 °C até o momento de uso.

4.2. Sistema – teste *in vivo*

Camundongos heterogenéticos *Swiss albinus* (Unib:SW) adultos jovens (entre 7 e 12 semanas – período púbere), machos e fêmeas, com massa corporal entre 30 g e 40 g

(i.e., a variação de peso entre os animais, para cada sexo, não deverá exceder a $\pm 20\%$ da massa média) e saudáveis, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica, Área da Ciência Animal de Laboratório, UNICAMP (CEMIB, <http://www.cemib.unicamp.br>), e mantidos no Biotério Central da Universidade de Alfenas (UNIFENAS), foram utilizados no teste do micronúcleo em eritrócitos da medula óssea (BORIOLLO et al, 2014ab.; CHORILLI et al., 2007; CSGMT, 1986).

Os animais foram mantidos em grupos do mesmo sexo, em caixas de polipropileno, em ambiente climatizado a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar igual a $50\% \pm 20\%$, e em ciclos de luminosidade de 12 horas (i.e., 12 horas claro/12 horas escuro). Esses animais foram tratados com ração comercial Labina Purina® (Nestlé Purina Petcare Company) e água *ad libitum*, e aclimatados às condições do laboratório por 7 dias (período de triagem) antes da realização do experimento. Ao final do período de triagem, a massa corpórea de cada animal foi mensurada e, de acordo com a massa, recebeu 2 mL do líquido indicado para cada 100g de massa corporal (controle negativo, controle positivo e extrato vegetal). Após o tratamento experimental, os animais foram eutanasiados por asfixia com CO_2 em câmaras adaptadas acrílicas (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000). Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da UNIFENAS (CEPEAU Protocolo Nº. 27A/2016).

4.3. Grupos experimentais

Grupos de animais (consistindo em 5 machos e 5 fêmeas) foram tratados utilizando um regime de dosagem único administrado por gavagem (controle negativo e extrato fluido da folha de *Salvia officinalis* L. liofilizado e solubilizado em água tipo 1 — SO) ou intraperitoneal (ciclofosfamida e cloridrato de doxorrubicina) e dois tempos de eutanásia (24 e 48 h), baseado na regulamentação sobre o ensaio de micronúcleo *in vivo* (BORIOLLO et al., 2014ab; CSGMT, 1986; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997):

- Grupos controle: 150 mM NaCl (controle negativo), 50 mg/Kg de Ciclofosfamida (controle positivo: CP, Cat. # C0768 Sigma Aldrich, CAS no. 50-18-0) (KRISHNA et al., 1995; WAKATA et al., 1989) e 5 mg/Kg de cloridrato de doxorrubicina (quimioterapêutico: DXR, Eurofarma Laboratórios Ltda., CAS no. 23214-92-8) (BORIOLLO et al., 2014ab; VENKATESH et al., 2007);

- Teste de genotoxicidade (extrato vegetal): 500, 1.000 e 2.000 mg/Kg de SO. A dose máxima tolerada (MTD) de SO foi definida como (i) a dose mais elevada que pode ser administrada sem induzir letalidade ou toxicidade excessiva durante o estudo causando eutanásia, ou (ii) uma dose que produz algumas indicações de toxicidade da medula óssea (por exemplo, uma redução na proporção de eritrócitos imaturos entre eritrócitos totais na medula óssea), ou (iii) 2.000 mg/Kg (KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997).
- Teste de antigenotoxicidade: 500 mg/Kg de SO + 5 mg/Kg de DXR (BORIOLLO et al., 2014ab; VENKATESH et al., 2007).

4.4. Processamento da medula óssea e análise celular

Logo após a eutanásia, os fêmures foram cirúrgica e assepticamente removidos e os animais foram apropriadamente descartados. Cada fêmur foi seccionado na extremidade proximal e o conteúdo do canal medular foi lavado com 1,5 mL de solução de 150 mM NaCl e transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997; ZAMBRANO et al., 1982).

Esse material foi ressuscitado com o auxílio de uma pipeta Pasteur a fim de assegurar uma distribuição ao acaso das células da medula óssea. Então, a suspensão foi centrifugada a 1.000 rpm (Centrífuga de Bancada Microprocessada Mod. NT 810, Nova Técnica Ind. Com. Equipamentos p/ Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resultante foi ressuscitado em 500 µL de solução de 150 mM NaCl adicionado de formaldeído a 4%. As lâminas foram preparadas por meio de esfregaço (2 lâminas por animal), secas a temperatura ambiente por 24 horas, e coradas em cuba de coloração contendo corante de Leishman eosina-azul de metileno [corante puro por 3 min, seguido pelo corante diluído em água destilada (1:6) por 15 min], a fim de diferenciar eritrócitos policromáticos (EPC) de eritrócitos normocromáticos (ENC).

Os EPCs foram observados em aumento de 1.000× empregando-se microscopia óptica (Nikon Eclipse E-200), contados (no mínimo 2.000 EPCs anucleados *per* animal foram avaliados quanto a incidência de EPCs micronucleados), com o auxílio de um contador de células digital (Contador Diferencial CCS02, Kacil Indústria e Comércio Ltda., PE, Brasil), e fotografados (Câmera Digital 8.1 Megapixels DC FWL 150). O número de EPCs e ENCs e o número e a frequência de EPCs micronucleados foram relatados. A

fim de avaliar a toxicidade da medula óssea, a razão entre EPCs e ENCs também foi observada (BORIOLLO et al., 2014ab; KRISHNA & HAYASHI, 2000; OECD, 1997).

4.5. Análise estatística

Os dados obtidos no ensaio do micronúcleo foram submetidos à análise da variância *one-way* (ANOVA), em delineamento inteiramente casualizado no esquema fatorial $7 \times 2 \times 2$ (tratamento $\times$ sexo $\times$ tempo), e comparação de médias por meio do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) empregando o sistema computacional SAS® versão 9.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, os números e frequências de EPCMNs e a razão de EPC/ENC na medula óssea de camundongos foram analisados estatisticamente para cada um dos grupos de animais tratados com SO — ensaio genotóxico (0,5, 1,0 e 2,0 g/kg de SO) — e para cada um dos grupos tratados com SO e o agente quimioterapêutico DXR — ensaio antigenotóxico (0,5 g/kg de SO + 5 mg/kg de DXR) —, bem como para os grupos de controle, NaCl (150 mM) controle negativo e ciclofosfamida (50 mg/kg) controle positivo (Tabela 1). Para os grupos de animais tratados com SO, a análise dos EPCMNs (n e %) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as doses de tratamento de 1.000 e 2.000 mg/kg [valores % médios de $1,24 \pm 0,57$ (24 h) e $1,48 \pm 0,36$ (48 h) para 1.000 mg/kg; $1,35 \pm 0,75$ (24 h) e $2,47 \pm 0,48$ (48 h) para 2.000 mg/kg] e controle negativo (NaCl) [valores % médios de $0,50 \pm 0,15$ (24 h) e $0,50 \pm 0,10$ (48 h)]. Estes resultados sugerem que a SO apresenta uma leve genotoxicidade, dependentemente da dose administrada, mas independente do sexo do animal (macho ou fêmea) ou do tempo de tratamento (24 ou 48 h). Os camundongos tratados com 5 mg/kg de DXR induziram significativamente EPCMNs em 24 e 48 h após o tratamento e em ambos os sexos [valores % médios de $2,61 \pm 0,28$ (24 h) e $2,83 \pm 0,24$ (48 h)]. As frequências de EPCMNs no grupo DXR foram significativamente ($p < 0,05$) menores do que as observadas no grupo de controle positivo CP (50 mg/kg) [valores % médios de $4,43 \pm 0,77$ (24 h) e $3,05 \pm 0,88$ (48 h)]. Também pode-se observar que não houve redução significativa do EPCMNs ($p < 0,05$) quando se administrou SO (500 mg/kg) em combinação com o agente quimioterapêutico DXR (5 mg/kg), sugerindo a ausência de efeitos antigenotóxicos (anticlastogenicidade e antianeugenicidade) [valores % médios de $2,15 \pm 0,40$ (24 h) e $2,55 \pm 0,45$ (48 h)]. Portanto, SO não proporcionou proteção contra os efeitos genotóxicos induzidos pelo DXR na medula óssea de camundongos, independentemente do tempo de tratamento (24 ou 48 h) ou do gênero do animal.

A análise da razão entre EPC/ENC não indicou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o agente quimioterapêutico DXR [valores médios de $0,99 \pm 0,00$ (24–48 h)] e todas as doses de SO [valores médios de $1,00 \pm 0,00$ (24–48 h) para 500 mg/kg, de $0,99 \pm 0,00$ (24–48 h) para 1.000 mg/kg, e de $0,99 \pm 0,01$ (24 h) e $0,99 \pm 0,00$ (48 h) para 2.000 mg/kg] ou controle negativo (NaCl) [valores médios de $0,99 \pm 0,00$ (24 h) e $1,00 \pm 0,00$

(48 h)] ou controle positivo (CP) [valores médios de 0.98 ± 0.00 (24–48 h)]. A razão EPC/ENC observada após tratamento com SO (500 mg/kg) e DXR (5 mg/kg) [valores médios de 0.99 ± 0.00 (24–48 h)] em ensaios antigenotóxicos não mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparação com o controle negativo. Estes resultados sugerem que SO combinado com o agente quimioterapêutico, DXR, não induz qualquer efeito citotóxico, independentemente do gênero do animal (macho ou fêmea) ou do tempo de tratamento (24 ou 48 h).

A *Salvia officinalis* (sálvia) é uma planta da região mediterrânica que é comumente usada como condimento e como agente anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano devido às suas atividades biológicas. Manool é o mais abundante micro-metabolito encontrado em óleos essenciais e extratos de *Salvia officinalis*. Portanto, efeito antigenotóxico foi observado através o ensaio do micronúcleo, do composto isolado manool (diterpeno) em fibroblastos de pulmão de hamster chinês (V79) e células de hepatoma humano (HepG2), em concentrações de 0,5-6,0 µg/mL e 0,5-8,0 µg/mL. Onde, o manool exibiu um efeito protetor contra o dano cromossômico induzido por metanossulfonato de metilo (MMS, 44 µg/mL) em células HepG2, mas não em células V79. Estes dados sugerem que o metabolito manool pode ser responsável pelo efeito antigenotóxico observado em células HepG2 (ABU-DARWISH et al., 2013).

Pesquisas foram realizadas a fim de examinar as atividades citotóxicas *in vitro*, do extratos de metanol bruto preparado a partir de *Salvia officinalis*, em linfoma de células B não Hodgkin (Raji) e linfoma de monócitos leucêmicos humanos (U937), leucemia humana mielocítica aguda (KG-1A) e linhagens celulares endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC). O extrato de *Salvia officinalis*, de uma maneira dose e tempo-dependentes, mostrou-se inibir a proliferação de células de linfoma e leucemia possivelmente através de uma via dependente de apoptose (ZARE SHAHNEH et al., 2013).

Os principais compostos fitoquímicos encontrados nos óleos de *S. officinalis* foram 1,8-cineol (39,5-50,3%) e cânfora (8,8-25,0%), onde os óleos revelaram atividade antifúngica (leveduras, dermatófitos e cepas de *Aspergillus*). Esses dados foram observados a partir da avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio. O potencial anti-inflamatório, avaliado por medição da produção de óxido nítrico utilizando macrófagos de camundongos estimulados com lipopolissacarídeos *in vitro*, mostrou que as concentrações bioativas de

óleos de *S. officinalis* não afetam a viabilidade de macrófagos e queratinócitos de mamíferos tornando-os adequados para serem incorporados em formulações de cuidados da pele para fins cosméticos e farmacêuticos (HAYOUNI et al., 2008).

Três quinonas diterpenóides (royleanona-SAR3, hor-minona-SAR 26 e acetil-hor-minona-SAR 43) isoladas das raízes de *Salvia officinalis* foram avaliadas quanto à citotoxicidade, isto é, atividade citotóxica e danos ao DNA em células de carcinoma de cólon humano (Caco-2) e hepatoma de células humana (HepG2) cultivadas *in vitro*. Todos os compostos testados induziram rupturas de cadeia de DNA em ambos os tipos de células a partir de concentrações $>1 \times 10^{-7}$ – 1×10^{-6} mol/l. A cinética da reintegração de DNA revelou que as rupturas de DNA induzidas por SARs foram reparadas muito lentamente (HAMIDPOUR et al., 2014).

Tabela 1. Incidência de EPCMN's e a razão de EPC/ENC na medula óssea de camundongos machos e fêmeas *Swiss albinus* após tratamento de 24h e 48h. Dados obtidos a partir dos tratamentos controles (NaCl, CP e DXR) e das avaliações de genotoxicidade e antígeno toxicidade das folhas de *Salvia officinalis* L. (SO).

Tratamento	Número de EPC's analisados	EPCMN's (%)	EPCMN's (n)	EPC / (EPC + ENC)	ENC (n)
	24h	48h	24h	48h	24h
♀ A (EPCMN's; A; EPC/ENC)	2074 ± 26	2085 ± 13	10 ± 3	9 ± 2	10 ± 6
♀ ₁	2095	2097	7	10	5
♀ ₂	2094	2095	9	10	6
♀ ₃	2087	2089	11	8	13
♀ ₄	2056	2078	14	12	20
♀ ₅	2038	2067	8	7	8
♂ A (EPCMN's; A; EPC/ENC)	2053 ± 29	2072 ± 20	11 ± 3	11 ± 2	11 ± 4
♂ ₁	2095	2088	9	13	5
♂ ₂	2055	2088	12	11	7
♂ ₃	2058	2084	7	13	14
♂ ₄	2018	2048	16	9	12
♂ ₅	2037	2051	10	10	8
Média HDP (150 mM NaCl)	2063 ± 28	2079 ± 17	10 ± 3	10 ± 2	11 ± 5
♀ A (EPCMN's; A; EPC/ENC)	2334 ± 34	2211 ± 105	95 ± 22	70 ± 22	35 ± 3
♀ ₁	2383	2228	60	50	32
♀ ₂	2337	2164	114	82	34
♀ ₃	2338	2258	105	70	35
♀ ₄	2324	2341	107	100	37
♀ ₅	2287	2062	88	47	50
♂ A (EPCMN's; A; EPC/ENC)	2406 ± 64	2253 ± 109	115 ± 8	68 ± 25	41 ± 7
♂ ₁	2470	2222	109	75	37
♂ ₂	2452	2148	110	54	50
♂ ₃	2423	2222	128	45	48
♂ ₄	2313	2235	111	56	38
♂ ₅	2373	2439	117	108	34
Média HDP (CP 50 mg/kg)	2370 ± 62	2232 ± 103	105 ± 19	69 ± 22	38 ± 6

Médias com as mesmas letras (A, B, C ou D) não são diferentes significativamente ($p < 0.05$). Resultados obtidos a partir dos tratamentos controles (NaCl, CP e DXR), avaliação da genotoxicidade de SO (0.5-2 g/kg) e antígeno toxicidade de SO (0.5 g/kg) (SO + DXR). ♀ e ♂ correspondem ao gênero feminino e masculino dos camundongos *Swiss albinus*, respectivamente. EPCMN's: eritrócitos policromáticos micronucleados. EPC / (EPC + ENC): razão entre eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC). NaCl: Cloreto de sódio. CP: Ciclofosfamida. DXR: cloridrato de doxorrubicina. SO: *Salvia officinalis* L.

Tabela 1. Incidência de EPCMNs e a razão de EPC/ENC na medula óssea de camundongos machos e fêmeas *Swiss albino* após tratamento de 24h e 48h. Dados obtidos a partir dos tratamentos controles (NaCl, CP e DXR) e das avaliações de genotoxicidade e antígeno toxicidade das folhas de *Salvia officinalis* L. (SO).

Tratamento	Número de EPCs analisados		EPCMNs (n)		EPCMNs (%)		EPC / (EPC + ENC)		ENC (n)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
♀ A (EPCMN) A (EPC/ENC)	2155 ± 106	2185 ± 51	59 ± 9	62 ± 5	2.73 ± 0.36	2.86 ± 0.21	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.00	22 ± 7	26 ± 10
♀ ₁	2269	2187	55	59	2.42	2.70	0.99	0.99	21	18
♀ ₂	2081	2209	56	69	2.69	3.12	0.99	0.99	18	27
♀ ₃	2155	2189	58	65	2.69	2.97	0.99	0.99	17	19
♀ ₄	2249	2238	75	58	3.33	2.59	0.99	0.99	33	24
♀ ₅	2021	2102	51	61	2.52	2.90	0.99	0.98	19	42
♂ A (EPCMN) A (EPC/ENC)	2128 ± 84	2132 ± 54	53 ± 3	60 ± 5	2.49 ± 0.13	2.81 ± 0.29	0.99 ± 0.01	0.99 ± 0.00	17 ± 8	20 ± 6
♂ ₁	2017	2132	50	59	2.48	2.77	0.99	0.99	30	23
♂ ₂	2194	2065	58	67	2.64	3.24	0.99	0.99	17	26
♂ ₃	2177	2183	50	53	2.30	2.43	0.99	0.99	17	24
♂ ₄	2057	2091	53	58	2.58	2.77	1.00	0.99	8	12
♂ ₅	2194	2187	54	62	2.46	2.83	0.99	0.99	15	16
Média ± DP (DXR 5 mg/kg)	2141 ± 92	2158 ± 57	56 ± 7	61 ± 5	2.61 ± 0.28	2.83 ± 0.24	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.00	20 ± 7	23 ± 8
♀ A (EPCMN) A (EPC/ENC)	2053 ± 69	2061 ± 60	9 ± 3	12 ± 7	0.44 ± 0.13	0.56 ± 0.34	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	9 ± 3	5 ± 3
♀ ₁	2026	2046	12	5	0.59	0.24	0.99	1.00	11	2
♀ ₂	2032	2006	9	9	0.44	0.45	1.00	1.00	8	5
♀ ₃	2018	2025	5	15	0.25	0.74	0.99	1.00	12	8
♀ ₄	2175	2068	11	22	0.51	1.06	1.00	1.00	5	3
♀ ₅	2013	2160	8	7	0.40	0.32	1.00	1.00	9	9
♂ A (EPCMN) A (EPC/ENC)	2028 ± 11	2105 ± 122	9 ± 2	18 ± 12	0.42 ± 0.11	0.83 ± 0.48	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	10 ± 2	9 ± 6
♂ ₁	2026	2318	5	37	0.25	1.60	0.99	0.99	11	18
♂ ₂	2032	2059	9	18	0.44	0.87	0.99	1.00	12	3
♂ ₃	2010	2015	11	6	0.55	0.30	1.00	1.00	6	9
♂ ₄	2037	2088	10	12	0.49	0.57	1.00	1.00	10	5
♂ ₅	2036	2045	8	16	0.39	0.78	1.00	1.00	9	9
Média ± DP (SO 500 mg/kg)	2041 ± 48	2083 ± 94	9 ± 2	15 ± 10	0.43 ± 0.12	0.69 ± 0.42	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	9 ± 2	7 ± 5

Médias com as mesmas letras (A, B, C ou D) não são diferentes significativamente ($p < 0.05$). Resultados obtidos a partir dos tratamentos controles (NaCl, CP e DXR), avaliação da genotoxicidade de SO (0.5-2 g/kg) e antígeno toxicidade de SO (0.5 g/kg) (SO + DXR). ♀ e ♂ correspondem ao gênero feminino e masculino dos camundongos *Swiss albino*, respectivamente. EPCMN: eritrócitos policromáticos micronucleados EPC / (EPC + ENC); razão entre eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC). NaCl: Cloreto de sódio. CP: Ciclofosfamida. DXR: cloridrato de doxorubicina. SO: *Salvia officinalis* L.

Tabela 1. Incidência de EPCMN's e a razão de EPC/ENC na medula óssea de camundongos machos e fêmeas *Swiss albinus* após tratamento de 24h e 48h. Dados obtidos a partir dos tratamentos controles (NaCl, CP e DXR) e das avaliações de genotoxicidade e antígeno toxicidade das folhas de *Salvia officinalis* L. (SO).

Tratamento	Número de EPCs analisados		EPCMN's (n)		EPCMN's (%)		EPC / (EPC + ENC)		ENC (n)	
	24h	48h	24h ^A	48h ^A	24h ^A	48h ^A	24h ^A	48h ^A	24h	48h
♀ ^A (EPCMN's; ^A (EPC/ENC))	2070 ±39	2078 ±58	22 ±11	29 ±8	1.08 ±0.54	1.42 ±0.40	1.00 ±0.00	0.99 ±0.00	7 ±6	14 ±3
	2091	2026	41	42	1.96	2.07	1.00	0.99	2	18
	2063	2156	12	25	0.58	1.16	1.00	0.99	10	15
	2124	2029	25	29	1.18	1.43	1.00	0.99	7	11
	2021	2121	19	22	0.94	1.04	1.00	0.99	2	16
	2051	2056	15	29	0.73	1.41	0.99	1.00	15	10
	2020 ±47	2147 ±109	28 ±12	33 ±6	1.41 ±0.62	1.54 ±0.35	0.99 ±0.00	0.99 ±0.00	19 ±7	17 ±6
	2042	2242	19	30	0.93	1.34	0.99	0.99	15	14
	2023	2284	23	30	1.14	1.31	1.00	0.99	10	13
	1949	2098	43	39	2.21	1.86	0.99	0.99	28	15
♂ ^A (EPCMN's; ^A (EPC/ENC))	2075	2043	40	40	1.93	1.96	0.99	0.99	19	16
	2009	2066	17	25	0.85	1.21	0.99	0.99	21	27
	2045 ±49	2112 ±90	25 ±12 ^B	31 ±7 ^B	1.24 ±0.57 ^B	1.48 ±0.36 ^B	0.99 ±0.00 ^A	0.99 ±0.00 ^A	13 ±8	16 ±5
	2048 ±25	2028 ±16	43 ±6	54 ±4	2.12 ±0.28	2.65 ±0.21	0.99 ±0.00	0.99 ±0.00	13 ±5	30 ±5
	2075	2054	49	56	2.36	2.73	0.99	0.99	21	31
	2051	2013	47	51	2.29	2.53	0.99	0.98	13	36
	2067	2032	34	48	1.64	2.36	0.99	0.99	13	28
	2014	2016	42	59	2.09	2.93	1.00	0.99	10	22
	2034	2023	45	55	2.21	2.72	1.00	0.98	9	34
	2020 ±47	2091 ±33	31 ±16	48 ±12	1.53 ±0.79	2.29 ±0.63	0.98 ±0.01	0.99 ±0.00	49 ±27	27 ±11
♂ ^A (EPCMN's; ^A (EPC/ENC))	2012	2043	32	68	1.59	3.33	1.00	0.98	10	43
	2040	2083	51	42	2.50	2.02	1.00	0.99	7	27
	2060	2118	38	51	1.84	2.41	1.00	0.99	5	25
	2037	2127	44	42	2.16	1.97	0.99	0.99	16	30
	2092	2085	51	36	2.44	1.73	1.00	0.99	2	12
	2045 ±49	2059 ±42	28 ±15 ^B	51 ±9 ^B	1.35 ±0.75 ^B	2.47 ±0.48 ^B	0.99 ±0.01 ^A	0.99 ±0.00 ^A	28 ±29	29 ±8

Médias com as mesmas letras (A, B, C ou D) não são diferentes significativamente ($p < 0.05$). Resultados obtidos a partir dos tratamentos controles (NaCl, CP e DXR), avaliação da genotoxicidade de SO (0.5-2 g/kg) e antígeno toxicidade de SO (0.5 g/kg) (SO + DXR). ♀ e ♂ correspondem ao gênero feminino e masculino dos camundongos *Swiss albinus*, respectivamente. EPCMN's: eritrócitos policromáticos micronucleados. EPC / (EPC + ENC): razão entre eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC). NaCl: Cloreto de sódio. CP: Ciclofosfamida. DXR: cloridrato de doxorrubicina. SO: *Salvia officinalis* L.

Tabela 1. Incidência de EPCMNs e a razão de EPC/ENC na medula óssea de camundongos machos e fêmeas *Swiss albinus* após tratamento de 24h e 48h. Dados obtidos a partir dos tratamentos controles (NaCl, CP e DXR) e das avaliações de genotoxicidade e antigenotoxicidade das folhas de *Salvia officinalis* L. (SO).

Tratamento	Número de EPCs analisados		EPCMNs (n)		EPCMNs (%)		EPC / (EPC + ENC)		ENC (n)	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
♀ A (MNPCE); A (PCE/NCE)	2045 ± 32	2089 ± 23	49 ± 8	60 ± 7	2.38 ± 0.37	2.88 ± 0.35	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.00	18 ± 7	17 ± 3
♀ 1	2006	2081	38	56	1.89	2.69	1.00	0.99	7	17
♀ 2	2079	2106	45	64	2.16	3.04	0.99	0.99	18	19
♀ 3	2074	2063	49	69	2.36	3.34	0.99	0.99	16	21
♀ 4	2043	2077	54	50	2.64	2.41	0.99	0.99	22	14
♀ 5	2021	2119	57	62	2.82	2.93	0.99	0.99	25	13
♂ A (MNPCE); A (PCE/NCE)	2095 ± 69	2110 ± 48	40 ± 6	47 ± 6	1.93 ± 0.30	2.23 ± 0.26	0.99 ± 0.00	1.00 ± 0.00	14 ± 6	8 ± 3
♂ 1	2095	2149	34	53	1.62	2.47	0.99	1.00	13	9
♂ 2	2021	2053	41	48	2.03	2.34	1.00	0.99	5	12
♂ 3	2127	2084	47	45	2.21	2.16	0.99	1.00	18	7
♂ 4	2041	2169	45	51	2.20	2.35	0.99	1.00	19	8
♂ 5	2192	2097	35	38	1.60	1.81	0.99	1.00	15	4
Média HDP (SO 500 + DXR)	2070 ± 57	2100 ± 37	45 ± 8	54 ± 9	2.15 ± 0.40	2.55 ± 0.45	0.99 ± 0.00	0.99 ± 0.00	16 ± 6	12 ± 6

Médias com as mesmas letras (A, B, C ou D) não são diferentes significativamente ($p < 0.05$). Resultados obtidos a partir dos tratamentos controles (NaCl, CP e DXR), avaliação da genotoxicidade de SO (0.5-2 g/kg) e antigenotoxicidade de SO (0.5 g/kg) (SO + DXR). ♀ e ♂ correspondem ao gênero feminino e masculino dos camundongos *Swiss albinus*, respectivamente. EPCMN: eritrócitos policromáticos micronucleados. EPC / (EPC + ENC): razão entre eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC). NaCl: Cloreto de sódio. CP: Ciclofosfamida. DXR: cloridrato de doxorubicina. SO: *Salvia officinalis* L.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo relata informações com ênfase na mutagênese, especialmente nos possíveis efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do extrato fluido da folha de *Salvia officinalis* L. utilizando o ensaio do micronúcleo in vivo em medula óssea de camundongos, que até recentemente tem sido objeto de pouca pesquisa. Os resultados sugerem a presença de uma leve genotoxicidade (clastogenicidade e aneugenicidade) de SO [dose dependente (1,0–2,0 g/kg), mas tempo (24–48 h) e sexo independente (masculino e feminino)]. Observou-se ausência de toxicidade sistêmica (aguda e crônica na medula óssea) nas condições de teste do micronúcleo pelos dados da proporção de EPC/ENC. O tratamento combinado de SO (0,5 g/kg) e DXR (5 mg/kg) mostrou efeitos genotóxicos (clastogenicidade e aneugenicidade), no entanto, não houve qualquer aumento na citotoxicidade, sugerindo que o extrato fluido da folha de SO, pode ser genotóxico, mas não apresenta citotoxicidade, independentemente do tempo (24–48 h) e gênero do animal (masculino e feminino).

Devem ser realizados mais estudos que envolvam a avaliação da genotoxicidade de extratos e compostos fitoquímicos extraídos da *Salvia officinalis* L., incluindo ensaios de mutagenicidade com teste *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) como indicador do potencial de carcinogenicidade para mamíferos, teste de mutação genética em células de mamíferos (ensaio de linfoma de camundongos), testes citogenéticos de aneuploidia in vitro, testes do micronúcleo em células cultivadas in vitro, testes de hibridização fluorescente in situ (FISH) para mutagênese, ensaio do cometa para detectar danos e reparo do DNA em células individuais, e testes genômicos e proteômicos funcionais para mutagênese (microarrays de cDNA e outras análises de matriz) para caracterizar potenciais efeitos genotóxicos e antigenotóxicos, e os mecanismos moleculares envolvidos. Além disso, devem ser realizados estudos para estabelecer limites para o consumo humano, delinear potenciais riscos para a saúde humana e fornecer estratégias racionais para a implementação de medidas de quimioprevenção.

7 REFERÊNCIAS

- ABU-DARWISH, M S *et al.* Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. **BioMed research international**, New York, v. 2013, n. 538940, oct. 2013.
- ALBERTINI, R J *et al.* IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 463, n. 2, p. 111–172, aug. 2000.
- ALVES, J M *et al.* *In vivo* protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology: JAT**, Philadelphia, v. 33, n. 8, p. 854–60, aug. 2013.
- AMES, B N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, New York, v. 221, n. 4617, p. 1256–1264, sept. 1983.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. **Farmacopéia Brasileira**. Brasília, 2010.
- AVATO, P *et al.* Glandular hairs and essential oils in micro propagated plants of *Salvia officinalis* L. **Plant Science**, Merced, v. 169, p. 29–36, mar. 2005.
- AYATOLLAHI, A *et al.* Two flavones from *Salvia leriiaefolia*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Tehran, v. 8, n. 3, p. 179–184, mar. 2009.
- AYRLE, H *et al.* Medicinal plants–prophylactic and therapeutic options for gastrointestinal and respiratory diseases in calves and piglets? A systematic review. **BMC veterinary research**, London, v. 6, n. 12, p. 89–120, mar. 2016.
- BÄHLER, C *et al.* Risk factors for death and unwanted early slaughter in Swiss veal calves kept at a specific animal welfare standard. **Research in veterinary science**, London, v. 92, n. 1, p. 162–168, feb. 2012.
- BARANAUSKIENE, R *et al.* Influence of harvesting time on the yield and chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.). **Foodbalt**, Kaunas, p. 105–109, 2011.

BARICEVIC, D *et al.* Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: The relevance of ursolic acid. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 75, n. 2–3, p. 125–132, may 2001.

BARTELS, C J *et al.* Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive veterinary medicine**, Amsterdam, v. 93, n. 2–3, p. 162–169, feb. 2010.

BEER, G *et al.* Antibiotikaeinsatz in der Schweizer Kälbermast. **Schweiz Arch Tierheilkd**, Berlin, v. 157, n. 1, p. 55–57, jan. 2015.

BERMUDEZ, J A Z. Indústria farmacêutica, estado e sociedade. In: SIMÕES, C M O *et al.* (ed). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRS, 1995.

BORIOLLO, M F G *et al.* Evaluation of the mutagenicity and antimutagenicity of *Ziziphus joazeiro* Mart.bark in the micronucleus assay. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 2, p. 428–438, apr. 2014a.

BORIOLLO, M F G *et al.* Nongenotoxic effects and a reduction of the DXR-induced genotoxic effects of *Helianthus annuus* Linné (sunflower) seeds revealed by micronucleus assays in mouse bone marrow. **BMC Complementary and Alternative Medicin**, London, v. 14, n. 121, p. 1–15, apr. 2014b.

CHANDRASEKARAN, C V *et al.* Evaluation of the genotoxic potential of standardized extract of *Glycyrrhiza glabra* (GutGard™). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 61, n. 3, p. 373–380, dec. 2011.

CHO, Y I & YOON, K J. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. **Journal of veterinary science**, Seoul, v. 15, n. 1, p. 1–17, dec. 2014.

CHOI, Y K *et al.* Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. **The Canadian veterinary journal**, Ottawa, v. 44, n. 9, p. 735–737, sept. 2003.

COLLABORATIVE STUDY GROUP FOR THE MICRONUCLEUS TEST–CSGMT. Sex differences in the micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 172, n. 2, p. 151–163, nov. 1986.

CROTEAU, R *et al.* Relationship of camphor biosynthesis to leaf development in sage (*Salvia officinalis*). **Plant physiology**, Lancaster, v. 67, p. 820–824, apr. 1981.

CUSACK, P M *et al.* The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. **Australian veterinary journal**, Oxford, v. 81, n. 8, p. 480–487, aug. 2003.

DECORDIER, I *et al.* Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. **Mutagenesis**, Swansea, v. 17, n. 4, p. 337–344, jul. 2002.

DISLER, M *et al.* Ethnoveterinary herbal remedies used by farmers in four north-eastern Swiss cantons (St. Gallen, Thurgau, Appenzell Innerrhoden and Appenzell Ausserrhoden). **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, London, v. 10, n. 32, mar. 2014.

DONOVAN, G A *et al.* Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA. **Preventive veterinary medicine**, Amsterdã, v. 34, n. 1, p. 31–46, feb. 1998.

EIDGENÖSSISCHES DEPARTEMENT DES INNERN, EDI, BUNDESAMT FÜR LEBENSMITTELSICHERHEIT UND VETERINÄRWESEN, BLV. **ARCH Bericht über den Vertrieb von Antibiotika in der Veterinärmedizin und das Antibiotika resistenz monitoring bei Nutztieren in der Schweiz**. [S.l.: s.n.], 2013.

FAIRBROTHER, J M ; GYLES, C L: Colibacillosis. In: ZIMMERMAN, J J *et al.* (ed). **Diseases Of Swine**. Oxford: John Wiley & Sons, 2012.

FAIRBROTHER, J M *et al.* *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal health research reviews**, New York, v. 6, n. 1, p. 17–39, jun. 2005.

FARNSWORTH, N R *et al.* Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 63, n. 6, p. 965–981, nov. 1985.

FENECH, M *et al.* Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. **Carcinogenesis: Integrative Cancer Research**, New York, v. 26, n. 5, p. 991–999, may 2005.

FENECH, M; CROTT, J W. Micronuclei, nucleopasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes – evidence for breakage–fusion–bridge cycles in the cytokinesis–block micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, n. 1–2, p. 131–136, jul. 2002.

FENECH, M; MORLEY, A A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 147, n. 1–2, p. 29–36, feb. 1985.

FRYDENDAHL, K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 85, n. 2, p. 169–182, mar. 2002.

GARCIA, E S. *et al.* Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. *et al.* (ed). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRS, 1996.

HADRI, A *et al.* Cytotoxic activity of α -humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, Madrid, v. 76, n. 3, p. 343–356, feb. 2010.

HAIOUNY, E A *et al.* Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, v. 125, n. 3, p. 242–251, apr. 2008.

HAMIDPOUR, M *et al.* Chemistry, pharmacology, and medicinal property of sage (salvia) to prevent and cure illnesses such as obesity, diabetes, depression, dementia, lupus, autism, heart disease, and cancer. **Journal of traditional and complementary medicine**, Amsterdam, v. 4 n. 2, p. 82–88, apr. 2014.

HANSEN, M S *et al.* An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. **Journal of comparative pathology**, London, v. 143, n. 2-3, p. 120-131, aug. 2010.

HARMS, P A *et al.* Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. **Journal of Swine Health and Production**, Perry, v. 10, n. 1, p. 27-30, jan. 2002.

HILTON, W M. BRD in 2014: where have we been, where are we now, and where do we want to go? **Animal health research reviews**, New York, v. 15, n. 2, p. 120-122, dec. 2014.

HUSSAIN, A *et al.* Antioxidant attributes of four *Lamiaceae* essential oils. **Pakistan Journal of Botany**, Islamabad, v. 43, n. 2, p. 1315-1321, feb. 2011.

INDART, A *et al.* Clastogenic and cytotoxic effects of lipid peroxidation products generated in culinary oils submitted to thermal stress. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 10, p. 1963-1967, may 2007.

ITANI, W S *et al.* Anti colon cancer components from Lebanese sage (*Salvia Libanotica*) essential oil. **Cancer biology and therapy**, Georgetown, v. 7, n. 11, p. 1765-1773, nov. 2008.

KAMATOU, P *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory activities and HPLC analysis of South African Salvia species. **Food Chemistry**, Lausanne, v. 119, n. 3, p. 684-688, jun. 2010.

KASKE, M *et al.* Die enzootische Bronchopneumonie des Kalbes - ein Update. **Praktischer Tierarzt**, Berlin, v. 93, p. 232-245, aug. 2012.

KAUR, S *et al.* The *in vitro* cytotoxic and apoptotic activity of Triphala—an Indian herbal drug. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, n. 1, p. 15-20, feb. 2005.

KERMANS SHAH, H *et al.* *In vitro* evaluation of antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Salvia officinalis* and *Pimpinella anisum* against cariogenic bacteria. **Journal of Dental Medicine**, Tehran, v. 22, n. 2, p. 149–154, abr. 2009.

KHAN, A *et al.* Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Salvia officinalis* are mediated through activation of K⁺ channels. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, Bangladesh, v. 6, n. 2, p. 111–116, jul. 2011.

KIRSCH-VOLDERS, M *et al.* Indirect mechanisms of genotoxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 140–141, n. 141, p. 63–74, apr. 2003.

KONSTANTOUPOULOU, I *et al.* Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. **Experientia**, Basel, v. 48, n. 6, p. 616–619, jun. 1992.

KRISHNA, G; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n. 1–2, p. 155–166, nov. 2000.

LAINE, T M *et al.* Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. **Acta veterinaria Scandinavica**, London, v. 50, n.21, jun. 2008.

LEACH, N T & JACHSON-COOK, C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 554, n. 1–2, p. 89–94, oct. 2004.

LOIZZO, M R *et al.* Cytotoxic activity of essential oils from *Labiatae* and *Lauraceae* families against *in vitro* human tumor models. **Anticancer research**, Athens, v. 27, n. 5A, p. 3293–3299, sept. 2007.

LORENZ, I *et al.* Calf health from birth to weaning. housing and management of calf pneumonia. **Irish veterinary journal**, Dublin, v. 64, n. 1, p. 14, oct. 2011a.

LORENZ, I *et al.* Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. **Irish veterinary journal**, Dublin, v. 64, n. 1, p. 9, oct. 2011b.

LUGINBÜHL, A *et al.* Field study of the prevalence and diagnosis of diarrhea-causing agents in the newborn calf in a Swiss veterinary practice area. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, Zürich, v. 147, n. 6, p. 245–252, may 2005.

MADEC, F *et al.* Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. **Preventive veterinary medicine**, Amsterdam, v. 35, n. 1, p. 53–72, apr. 1998.

MATEUCA, R *et al.* Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1515–1531, nov. 2006.

MAYER, M *et al.* Treatment of organic livestock with medicinal plants: a systematic review of European ethnoveterinary research. **Forsch Komplementmed**, Basel, v. 21, n. 6, p. 375–386, dec. 2014.

MEGANCK, V *et al.* Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. **Acta veterinaria Scandinavica**, London, v. 56, p.75, nov. 2014.

MIGUEL, M D; MIGUEL, O G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Probe Editorial, 1999.

NIKAVAR, B *et al.* Alpha- α amylase inhibitory activities of six salvia species. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, Tehran, v. 7, n. 4, p. 297–303, may 2008.

OECD A GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Bacterial reverse mutation test**. [S.l. : s.n.], 1997.

OECD B GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **In vitro mammalian chromosome aberration test**, 1997.

OECD C GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. [S.l.: s.n.], 1997.

PENDL, W *et al.* Antibiotikaeinsatz beim Schwein: Erste Resultate aus dem Projekt Fit Pig. In: KREUZER M *et al.* (ed). **Gesunde und leistungsfähige Nutztiere: Futter an Genotyp oder Genotyp an Futter anpassen?** Zürich: ETH-Schriftenreihe zur Tierernährung, 2015.

PURVES, D *et al.* Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**, Swansea, v. 10, n. 4, p. 297–312, jul. 1995.

RADULESCU, V *et al.* Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. **Journal of chromatography**, New York, v. 1027, n. 1–2, p. 121–126, feb. 2004.

RAMI, K & LI, Z. Antimicrobial activity of essential oil of *Salvia officinalis* L. collected in Syria. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v. 10, n. 42, p. 8397–8402, aug. 2011.

REICHLING, J & SALLER, R. Herbal remedies in veterinary phytotherapy. **Schweiz Arch Tierheilkd**, Zurich, v. 143, n. 8, p. 395–403, aug. 2001.

RIBEIRO, RL. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, R L. *et al.* (ed). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.

ROSSI, L *et al.* Experimental Induction of *Escherichia coli* Diarrhoea in Weaned Piglets. **Open Journal of Veterinary Medicine**, Milan, v. 2, n. 1, p. 1–8, mar. 2012.

ROSSI, L *et al.* Protective effect of oral administration of transgenic tobacco seeds against verocytotoxic *Escherichia coli* strain in piglets. **Veterinary research communications**, Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 39–49, mar. 2014.

SCHMID, K *et al.* Traditional use of herbal remedies in livestock by farmers in 3 Swiss cantons (Aargau, Zurich, Schaffhausen). **Forsch Komplementmed**, Basel, v. 19, n. 3, p. 125–136, jun. 2012.

SILVA, C R *et al.* Assessment of *Duguetia furfuracea* genotoxic and cytotoxic activity in bacteria and mice. **Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 149–156, feb. 2011.

SMIDLING, D *et al.* Evaluation of antiviral activity of fractionated extracts of Sage *Salvia officinalis* L (*Lamiaceae*). **Archives of Biological Sciences**, Belgrade, v. 60, n. 3, p. 421–429, jul. 2008.

STANOJEVIC, D *et al.* *In vitro* synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* and some preservatives. **Archives of Biological Sciences Belgrade**, Belgrade, v. 62, n. 1, p. 175–183, jan. 2010.

STÖBER, M. Enzootische Bronchopneumonie. In: DIRKSEN, G *et al.* (ed). **Innere Medizin und Chirurgie des Rindes**. Berlin: Parey Buchverlag, 2002.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos – Introdução ao estudo dos antimicrobianos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1996.

TAYLOR, J D *et al.* The epidemiology of bovine respiratory disease: what is the evidence for preventive measures? **The Canadian veterinary journal**, Ottawa, v. 51, n. 12, p. 1351–1359, dec. 2010a.

TAYLOR, J D *et al.* The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? **The Canadian veterinary journal**, Ottawa, v. 51, n. 10, p. 1095–1102, oct. 2010b.

THOMAS, P; UMEGAKI, K; FENECH, M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis–block micronucleus assay. **Mutagenesis**, Swansea, v. 18, n. 2, p. 187–194, mar. 2003.

THOMSON, J R & FRIENDSHIP, R M. Digestive System. In: ZIMMERMAN, J J *et al.* (ed). **Disease of Swine**. Oxford: John Wiley & Sons, 2012.

UHDE, F L *et al.* Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. **The Veterinary record**, London, v. 163, n. 12, p. 362–366, sept. 2008.

VANALSTINE W G: Respiratory System. In: by ZIMMERMAN, J J *et al.* (ed). **Diseases of Swine**. Oxford: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

VARANDA, E A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 27, n. 1, p. 1–7, ago. 2006.

VENKATESH, P *et al.* Modulation of doxorubicin-Induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: A micronucleus study. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v. 6, n. 1, p. 42–53, mar. 2007.

WAGNER, H & ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, Milano, v. 16, n. 2–3, p. 97–110, jan. 2009.

WALCH, S *et al.* Antioxidant capacity and polyphenolic composition as quality indicators for aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. **Frontiers in pharmacology**, Lausanne, v. 2, n. 29, p. 1–6, dec. 2011.

WILLIAMSON, E M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, Milano, v. 8, n. 5, p. 401–409, jul. 2001.

WINDEYER, M C *et al.* Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive veterinary medicine**, Amsterdam, v. 113, n. 2, p. 231–240, feb. 2014.

YURTSEVEN, S *et al.* Effect of sage extract (*Salvia officinalis*) on growth performance, blood parameters, oxidative stress and DNA damage in partridges. **South African Journal of Animal Science**, Cidade do Cabo, v. 38, n. 2, p. 145–152, jan. 2008.

ZAMBRANO, M A; TARGA, H J; RABELLO-GAY, M N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. **Stain Technology**, Baltimore, v. 57, n. 1, p. 48–49, jan. 1982.

ZARE SHAHNEH, F *et al.* *In vitro* Cytotoxic Activity of Four Plants Used in Persian Traditional Medicine. **Advanced pharmaceutical bulletin**, Tabriz, v. 3, n. 2, p. 453–455, aug. 2013.