



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE REALEZA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DA *Marrubium vulgare* EM
BEZERROS NEONATOS**

EMERSON LONGARETTI SOARES

**REALEZA
2016**

EMERSON LONGARETTI SOARES

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DA *Marrubium vulgare* EM
BEZERROS NEONATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação,
apresentado como requisito para obtenção do grau de
Bacharel em Medicina Veterinária apresentado à
Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. Valfredo Schlemper

REALEZA

2016

Orientador: Prof. Dr. Valfredo Schlemper

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em 11/10/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Valfredo Schlemper – UFFS

Prof. Dr. Gentil Ferreira Gonçalves – UFFS

Prof.^a Dr.^a. Susana Regina Schlemper – UFFS

RESUMO

A *Marrubium vulgare* (Lamiaceae) é uma planta medicinal que tem importantes efeitos farmacológicos como antiespasmódico, analgésico e antiedematogênico em modelos de roedores, efeitos atribuídos principalmente ao composto fitoquímico diterpênico marrubiína. Apesar de seus efeitos terapêuticos serem estudados previamente, a investigação científica sobre possível toxicidade pré-clínica desta planta em bovinos, não haviam sido realizadas até então. Bezerros Jersey neonatos (5 - 10 dias, n = 8), pesando de 20 a 25 kg, receberam colostro nas primeiras horas de vida, permaneceram sob período de adaptação por 6 dias em baias, alimentando-se de quatro litros de leite ao dia, incorporadas à 500 ml de infusão aquosa de *M. vulgare* em dose aumentadas progressivamente (1, 2, 4 e 8 g/kg, 10 dias cada) para o grupo estudado, e quantidade igual de água ao grupo controle. A ração aos bezerros foi introduzida a partir do quinto dia *ad libitum* e os animais foram privados de forragens para a manutenção do rúmen afuncional, com o intuito de promover a absorção dos princípios ativos vegetais apenas em nível gastrintestinal, através do sulco esofágico. Para realização dos testes hematológicos e bioquímicos as amostras de sangue foram obtidas através de punção da veia jugular externa. A contagem de hemácias e a determinação da concentração de hemoglobina foram realizadas em contador automático de células, por meio de centrífuga, onde o capilar contendo a amostra foi centrifugado a 12.500 rpm, por 5 minutos e o volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados através de fórmulas padronizadas a partir da contagem de hemácias. A contagem de leucócitos totais também foi obtida em contador automático de células e a contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo corado através da técnica do panótico simples, por análise microscópica da lâmina. As amostras de soro obtidas sem a adição de anticoagulante ao sangue, foram submetidas à centrifugação para a realização do exame bioquímico de enzimas através do método cinético, em analisador semiautomático bioquímico, onde foi realizada a mensuração das enzimas aspartato-aminotransferase (AST), gama-glutamyltransferase (GGT), além de proteína total e albumina, para verificar possíveis alterações hepáticas, e os metabólitos ureia e creatinina para verificar a função renal. A administração crônica da infusão da *M. Vulgare* inibiu significativamente ($P < 0,01$ e Inibição máxima [IM] de $59,33 \pm 4,91\%$) de neutrófilos e monócitos ($P 0,05 <$ e [IM] de $56,01 \pm 11,05\%$) em dose de até 8 g/kg. Os testes das enzimas (AST e GGT), proteínas, albumina, bem como ureia e creatinina, não apresentaram nenhuma alteração. O modelo proposto é adequado para testes pré-clínicos em animais monogástricos e pode fornecer parâmetros de toxicidade e detecção de compostos fitoquímicos no sangue. A *M. vulgare* administrada por via oral e cronicamente não mostrou efeitos adversos para a saúde dos bezerros. Além disso, a planta em infusão inibiu os neutrófilos e monócitos circulantes, sugerindo um efeito imunomodulador em altas doses.

Palavras-chaves: *Marrubium vulgare*, bezerros, toxicidade, teste pré-clínico

ABSTRACT

The *Marrubium vulgare* (Labiata) is a medicinal plant that has important pharmacological effects such as antispasmodic, analgesic and antiedematogenic in rodent models, mainly attributed to its phytochemical compound diterpene marrubiin. Although its therapeutic effects were previously studied, the scientific investigation of a possible preclinical toxicity of this plant had not been carried out yet. Jersey weaned calves (5-10 days, n= 6 - 8), weighting 15 to 20 kg, remained under adaptation for 7 days in individual stalls. They received colostrum during 5 days after birth, and from the day 6, they received 2.0 liters of milk with 50% of milk replacer in the morning and in the evening, which were incorporated 500 ml of *M. vulgare* infusion in increasing doses (1, 2, 4 and 8 g.kg⁻¹, 10 days each) to the studied group and equal amount of water to the control group. Calf feed was introduced from the fifth day *ad libitum* and animals were deprived of fodder for the maintenance of the nonfunctional rumen via esophageal groove, to the gastrointestinal absorption of the plant active principles. To carry out hematological/biochemical tests, blood samples were obtained through jugular vein puncture. Through erithrogram, the red blood cells counting and the determination of hemoglobin concentration with an automated blood cell counter was performed. Hematocrit measurement was made in a centrifuge (12.500 rpm/5 minutes). Mean corpuscular volume (MCV) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were calculated through standard formulas. For white blood cells count, leukocytes were taken in automated blood cell counter and the differential through stained by quick Panoptic method and microscopic analysis. Serum biochemical test was made through kinetic method in semiautomatic analyzer to evaluate aspartate-aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), total protein and albumin for hepatic alterations, and the metabolites urea and creatinine to verify the renal function. Chronic administration of *M. vulgare* infusion inhibited significantly neutrophil (P < 0.01 and maximal inhibition [MI] of 59.33 ± 4.91%) and monocytes (P < 0.05 and MI of 56.01 ± 11.05%) counts up to the dose of 8 g.kg⁻¹. Enzymes tests (AST and GGT), proteins, albumin, as well as urea and creatinine, had no alteration. The model proposed is suitable for preclinical tests in monogastric animals and may use parameters of toxicity and phytochemical compounds detection in blood. *M. vulgare* administered orally and chronically did not show adverse health effects in calves. Moreover, plant infusion inhibited neutrophils and monocytes circulating, suggesting an immunomodulatory effect in high doses.

Keywords: *Marrubium vulgare*, calves, toxicity, preclinical testing

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1-** Influência da administração crônica da *Marrubium vulgare* nos parâmetros do número de eritrócitos (A), hematócrito (B), concentração de hemoglobina corpuscular média (C) volume corpuscular médio (D) e hemoglobina (E) **19**
- Figura 2-** Influência da administração crônica da *Marrubium vulgare* nos parâmetros dos leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e linfócitos (C), neutrófilos (D) e sobre monócitos (E) **20**
- Figura 3-** Influência da administração crônica da *Marrubium vulgare* nos parâmetros de GGT (A) e AST (B) **21**
- Figura 4 –** Influência da administração crônica da *Marrubium vulgare* sobre as proteínas totais (A) e albumina (B), e sobre os metabólitos marcadores da função renal ureia (C) e creatinina (D) **22**

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Doses da infusão de <i>M. vulgare</i> administradas a bezerros neonatos em relação aos dias decorridos do experimento	16
--	-----------

Sumário

1- Introdução	8
2- Objetivo Geral	10
2.1-Objetivos específicos	10
3- Contextualização.....	10
4- Materiais e métodos	15
4.1- Preparação da infusão da <i>Marrubium vulgare</i>	15
4.2- Administração da infusão da <i>Marrubium vulgare</i> aos bezerros	15
4.3- Coleta de sangue e análise hematimétrica, bioquímica e metabólica	16
4.4- Análises estatísticas	17
5- Resultados.....	17
5.1- Influência da infusão da <i>Marrubium vulgare</i> sobre parâmetros fisiológicos	17
5.2- Influência da infusão da <i>Marrubium vulgare</i> sobre células vermelhas	18
5.3- Influência da infusão da <i>Marrubium vulgare</i> sobre células de defesa	19
5.4- Influência da infusão da <i>Marrubium vulgare</i> sobre enzimas marcadoras de lesão hepática	21
5.5- Influencia da infusão da <i>Marrubium vulgare</i> sobre proteínas e metabólitos	21
6- Discussão.....	22
7- Conclusão.....	27
Referências	28

1- Introdução

A *Marrubium vulgare* é uma planta medicinal aromática da família da menta (Lamiaceae) utilizada na medicina popular na forma de chás principalmente para o tratamento de afecções do aparelho respiratório e das vias gastrointestinais (NEWAL, 1996). Essa planta, conhecida popularmente como maromba ou “marroio”, “marroio branco”, “horehound” (Europa) ou “marute” (região mediterrânea), é uma planta arbustiva perene, comumente encontrada na região serrana de Santa Catarina. Apesar de ser nativa do continente europeu e países asiáticos, adaptou-se muito bem ao clima e solo da região Sul do Brasil. Contribuindo para sua presença em áreas não cultivadas, às margens de rodovias, campos de criação de gado e até em terrenos com pouca fertilidade (BALMÉ, 2004; NEWAL, 1996). Na medicina popular difundida tanto na zona rural como no meio urbano, a *M. vulgare in natura* possui uma forte etnoindicação para suas propriedades expectorante e descongestionante, além de curar bronquite, tosse e catarro crônico. Também é recomendado por herboristas para melhorar a circulação e aliviar problemas de fígado e cólicas menstruais. As folhas e flores têm sido usadas de longa data em remédios caseiros como um tônico amargo para o resfriado comum (DAWSON, 2000).

As partes aéreas floridas e seus extratos aquosos e hidroalcoólicos, na zona rural no sul do Brasil, são utilizadas para o tratamento da tosse e como um colerético em distúrbios digestivos e biliares (WICHTL & ANTON, 1999). Na etnoveterinária campeira a infusão concentrada da planta é aplicada em infecções e processos inflamatórios gastrointestinais incluindo síndromes diarreicas inespecíficas em bezerros (BALMÉ, 2004; CIRILO, 1993; SCHLEMPER et al., 1996). Ela também é usada na medicina tradicional por suas atividades neurosedativa e anti-inflamatória (MASCOLO et al., 1987; GIRRE, 2000).

Assim, a *M. vulgare* é uma planta multifuncional como fitoterápico e estudos farmacológicos desenvolvidos com o extrato hidroalcoólico, obtido a partir das raízes e partes aéreas da mesma, apresentaram várias ações biológicas, destacando-se como antiespasmódica (SCHLEMPER et al., 1996), hipoglicêmica (ROMAN et al., 1992), anti-hipertensiva (EL-BARDAI et al., 2004), analgésica (DE SOUZA et al., 1998), anti-inflamatória (SAHPAZ et al., 2002; STULZER et al., 2006), antibacteriana e antifúngica (MASOODI et al., 2008; ZARAI et al., 2011; DEHBASHI et al., 2015), antioxidante (WEEL et al., 1999; VANDERJAGT et al., 2002), hipolipidêmica (HERRERA-ARELLANO et al., 2004; BERROUGUI et al., 2006), inseticida (PAVELA, 2004), antiproliferativa para células tumorais (YAMAGUCHI et al., 2006), hepatoprotetora em modelos de toxicidade aguda

(AKTHER et al., 2013; ETTAYA et al., 2015) dentre muitas outras atividades biológicas relatadas .

Diversos compostos fitoquímicos foram anteriormente identificados na planta em questão, tais como flavonoides, glicosídeos e ácidos orgânicos, e quantitativamente há uma predominância de compostos diterpênicos e compostos fenólicos (MEYRE-SILVA & CECHINEL-FILHO, 2010). A furanolactona diterpênica marrubiína é a mais estudada e seria responsável pelas principais atividades biológicas atribuíveis à planta (PAPOOLA et al. 2013). A marrubiína também apresentou, em estudos anteriores, significantes efeitos anti-dematogênico e anti-inflamatório *in vivo* e *in vitro* (DE JESUS et al., 1999; STULZER et al., 2006); mimetizando em alguns casos as ações do extrato hidroalcoólico da *M. vulgare*.

Entretanto, os modelos experimentais até agora empregados na pesquisa com a *M. vulgare* foram realizados em roedores, não havendo nada aprofundado e nem abordagens específicas sobre possíveis efeitos toxigênicos da planta ou de seus componentes fitoquímicos em outras espécies, como bovinos e humanos (BALMÉ, 2004). Em resumo, não existe na literatura científica a descrição dos efeitos da *M. vulgare* especificamente em bovinos, o que é de fundamental importância, pois há relatos da utilização desta planta medicinal no meio rural para tratamento de enfermidades nesses animais, principalmente as de origem gastrointestinal e respiratória (DE OLIVEIRA et al., 2011; ETTAYA et al., 2015).

Nesta conjuntura, mesmo fitoterápicos importantes como formulações à base da *M. vulgare*, podem ser capazes de exercer toxicidade orgânica (TAIBI et al., 2009), dependendo de fatores como dose, frequência de exposição e duração total do tratamento (AWE et al., 2013). É preciso afirmar que estados fisiológicos ou patológicos podem induzir a alterações quanto à absorção, metabolismo e eliminação de metabolitos ou agentes toxicantes (NOUWS et al., 1988), parte deste princípio a importância de conhecer a possibilidade da toxicidade de uma molécula aspirante a fármaco (TUROLLA, 2004).

A região Sudoeste do Paraná é a maior produtora de leite do Estado, correspondendo a 26% da produção estadual total, estimada em 3,6 bilhões de litros por ano. Dada a importância da bovinocultura leiteira nessa região, com um rebanho significativo, o número de bezerros produzidos é numericamente expressivo (FERNANDES et al., 2004). Como é sabido são conservadas na propriedade rural apenas as fêmeas, com o intuito de preservar e repor o rebanho leiteiro. Muitas vezes o destino dos bezerros machos é o descarte, sendo comum o sacrifício desses indivíduos logo após o nascimento por inconveniência operacional e produtiva (PARRÉ et al., 2015).

Assim, diante dessa carência de informações sobre a toxicologia da *M. vulgare* em bovinos jovens, propõem-se o desenvolvimento de um teste de toxicidade pré-clínica para o estudo de fitoterápicos, sugerindo então para este, a utilização de bezerros Jersey machos neonatos, oriundos das propriedades rurais do Município de Realeza como modelo experimental científico.

2- Objetivo Geral

Investigar evidências de toxicidade pré-clínica da planta *Marrubium vulgare in natura* administrada sob a forma de infusão, pela via oral em bezerros neonatos da raça Jersey.

2.1-Objetivos Específicos

- Identificar alterações clínicas, hematológicas, bioquímicas e enzimáticas em bezerros Jersey submetidos a tratamento com doses crescentes e de forma crônica do infuso das partes aéreas da *Marrubium vulgare*.

- Comparar quantitativamente os parâmetros hematológicos, bioquímicos e enzimáticos dos bezerros do grupo submetido ao tratamento com extrato da *M. vulgare* com os do grupo controle.

- Avaliar sinais clínicos tais como temperatura corporal, presença de diarreia, frequência cardíaca e respiratória, dentre outras alterações gerais indicativas de possível toxicidade devido a administração crônica da infusão da *M. vulgare*.

- Propor um novo modelo experimental de toxicidade pré-clínica em bezerros neonatos.

3- Contextualização

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse na determinação de atividades biológicas de plantas medicinais no meio científico. A *M. vulgare*, devido às suas estruturas químicas naturalmente presentes em sua maquinaria bioquímica secundária, apresentou nos experimentos a que foi submetida, sugestivos resultados positivos quanto ao seu potencial farmacêutico. Nesse sentido as pesquisas científicas anteriores foram direcionadas ao reconhecimento e à identificação de suas propriedades terapêuticas e muito pouco foi relatado sobre possíveis consequências deletérias.

Devido a curiosidade científica em desvendar causalidade dos efeitos terapêuticos, Aliev e Aliev (1956) descreveram pioneiramente a inibição das contrações do músculo cardíaco isolado de batráquios. Schlemper e colaboradores (1996) descreveram e comprovaram um significativo efeito antiespasmódico do extrato hidroalcoólico da planta *Marrubium vulgare* sobre íleo e útero de cobaias, pois a exposição prévia desses fragmentos de tecidos ao extrato promoveu uma redução dose-dependente das contrações induzidas pela acetilcolina, além de diminuir a resposta máxima a esse neurotransmissor contraturante de músculos lisos. Foi postulado que esse efeito antiespasmódico poderia ser devido à interferência no influxo de cálcio para o meio intracelular ou pela liberação de reservas intracelulares, indicando que os constituintes presentes no extrato da *M. vulgare* poderiam afetar a concentração desse mineral no meio intracelular nestas preparações de tecidos isolados (EL BARDAI et al., 2004).

Foi demonstrado que o extrato hidroalcoólico da *M. vulgare* possui efeito analgésico significativo, utilizando-se diferentes modelos de dor induzida quimicamente. As ações do extrato hidroalcoólico da *M. vulgare* foram observadas através do teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético e modelo de dor induzida por formalina injetada na pata de camundongos. Esses testes levaram os autores a sugerir que o extrato atua por alguns mecanismos periféricos do controle algésico. É claro que o teste de dor induzido pelo ácido acético e formalina são um tanto inespecíficos, mas foi comprovado que o extrato bruto é capaz de abolir parcialmente a dor periférica induzida, por um mecanismo não-opiíide (DE SOUZA et al., 1998). Essas propriedades foram reforçadas através da investigação farmacológica da fração hexânica, rica em terpenos, em modelos de dor, inflamação e proliferação celular simultâneos, o que reforçou a hipótese da atividade analgésica anteriormente descrita (KANYONGA et al., 2011). Outro destaque da planta é quanto à sua atividade analgésica aplicada em um modelo experimental de dor estimulada eletricamente em polpa dentária de ratos Wistar. O modelo foi conduzido através da implantação de microelétrodos na polpa dentária dos incisivos superiores, ligados a um estimulador elétrico de baixa tensão, com a finalidade de simular a algesia aguda. Após a recuperação cirúrgica, foram administradas dosagens do extrato hidroalcoólico da *M. vulgare* por um período de dez dias em 15 animais. Como resultado verificou-se uma potente ação analgésica nesse modelo (GIROTTO, 2004).

Também é descrita tendência do extrato das folhas da *M. vulgare* à reversão do transporte de colesterol ao ateroma em artérias afetadas pela aterosclerose. Estas características, juntamente com as propriedades antioxidantes, podem reduzir o acúmulo de

lipoproteínas de baixa densidade (LDL) no sítio ateromatoso de artérias, prevenindo o aparecimento de doenças cardiovasculares e conferindo efeito cardioprotetor (BERROUGUI et al., 2006; MNONOPI et al., 2011; YOUSEF et al., 2013).

As atividades biológicas do extrato da *M. vulgare* previamente estabelecidas tanto pela etnofarmacologia, como por pesquisas científicas, induziram à investigação quanto à possível atividade antiproliferativa celular, focando em células cancerígenas isoladas de tumores colorretais de humanos. Foi descrito que o extrato hidroalcoólico seria capaz de aumentar a expressão de um gene ativado por fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (*NAG-1*). Esse é um provável mecanismo de ação supressor tumoral, cuja expressão pode ser aumentada por drogas anti-inflamatórias. Sabendo-se que as folhas do marroio contém vários princípios ativos com características anti-inflamatórias tais como a marrubiína e o marrubenol, estes compostos poderiam ser responsáveis pelos efeitos quimio-preventivos do extrato (YAMAGUCHI et al., 2006). É reportada ainda na literatura, atividade citotóxica dos óleos essenciais da *M. vulgare* em cultura de células neoplásicas, com atividade inibitória do crescimento celular neoplásico, porém não especificando o mecanismo de inibição (ZARAI et al., 2011). Da mesma maneira o fitoconstituente ladaneína, uma flavona metilada isolada da *M. vulgare* apresentou atividade contra o crescimento celular de linhagens mielóides e linfóides (tipo B), leucêmicas de humanos (ALKHATIB et al., 2010).

Foram delineados também modelos experimentais para avaliar o potencial antidiabetogênico da *M. vulgare*, pois ela possui uma longa tradição na indicação etnofarmacológica para o controle da glicemia em humanos. Novaes et al. (2000) descreveram pela primeira vez que a *M. vulgare* poderia ser usada como adjuvante no tratamento da diabetes mellitus. Foram utilizados ratos diabéticos, induzindo essa condição patológica através da administração de aloxana, droga capaz de induzir necrose específica das ilhotas de Langerhans. Os resultados mostraram que com a aplicação do extrato aquoso no grupo diabético, os níveis de glicose no sangue foram 3 a 4 vezes menores que no grupo de controle, evidenciando declínio acentuado nos níveis glicêmicos, observados a partir do terceiro dia de tratamento com três doses diárias do extrato da *M. vulgare*. Estes resultados confirmaram que a planta medicinal pode ser considerada um agente para o tratamento da diabetes mellitus (BOUDJELAL et al., 2012; MNONOPI et al., 2012).

É relatada ainda ações antibacterianas do óleo essencial da *M. vulgare* sobre algumas cepas bacterianas resistentes a antibióticos. O extrato metanólico da *M. vulgare* exibiu moderada, porém significativa atividade antibacteriana contra algumas cepas imortalizadas de bactérias. Dentre as espécies bacterianas sensíveis ao extrato estavam *Bacillus subtilis*,

Staphylococcus epidermidis e o *Staphylococcus aureus*. A atividade antifúngica dessa planta contra fungos patogênicos, mostrou que o óleo essencial tem atividade em *Botrytis cinerea*, enquanto *Fusarium solani*, *Penicillium digitatum* e *Aspergillus niger* foram menos sensíveis ao óleo essencial (DEHBASHI et al., 2015). Foram avaliadas as atividades molusquicida da *M. vulgare* sobre adultos e ovos de *Biomphalaria alexandrina*, bem como atividade mosquitocida do óleo essencial da planta para estágios larvais e pupais de *Culex pipiens*, com efeitos inibitórios significantes (SALAMA et al., 2012).

Henderson & Mc Crindle (1969) isolaram pela primeira vez o marrubenol, que é um derivado obtido a partir da marrubiína. Hoje amplamente conhecida, a marrubiína é uma lactona diterpenóide a qual se atribui o sabor amargo do marroio e de muitas outras plantas medicinais da família Lamiaceae, como a *Leonotis leonurus* e *Leonotis nepetifolia*. Pesquisas revelaram que a marrubiína é o princípio ativo diterpênico mais ativo, e responsabilizado, pelo menos em parte, pelas propriedades terapêuticas observadas nas plantas citadas. Estudos farmacológicos demonstraram que a marrubiína, do mesmo modo que extratos das partes aéreas da planta, exibe um conjunto de atividades biológicas como antinociceptiva, antioxidante, cardioprotetora, vaso-relaxante, gastroprotetora, antiespasmódica, antiedematogênica, analgésica e propriedades antidiabéticas (EL BARDAI et al., 2003; POPOOLA et al., 2013).

Quanto ao seu potencial analgésico frente a vários agentes inflamatórios, os estudos farmacológicos indicaram que o ácido marrubiínico, obtido das partes aéreas da *M. vulgare* provocou redução significativa da nocicepção induzida quimicamente através do teste de contorção abdominal, causada por agentes algésicos clássicos de indução de dor química como o ácido acético e a capsaicina, administrados por via intraperitoneal. Outra menção importante é que a administração por via oral do ácido marrubiínico foi capaz de causar efeitos antinociceptivos, e que apesar de serem mais discretos que os da marrubiína, foram onze vezes mais potentes que a analgesia promovida por analgésicos comerciais como o ácido acetilsalicílico (MEYRE-SILVA et al., 2005).

A marrubiína demonstrou atividade antiespasmódica inespecífica e não competitiva para os agonistas contraturantes como a acetilcolina, histamina, bradicinina e serotonina em preparações de íleo isolado de cobaia. A inibição provocada foi do tipo concentração-dependente, no entanto para a acetilcolina o perfil de inibição não respondeu de forma dependente à dose, esse mecanismo está provavelmente ligado à proteína G e a um sistema de segundo mensageiro celular (STULZER et al., 2006).

Stulzer (2006) avaliou uma possível propriedade antialérgica no edema causado pela ovoalbumina em ratos. A marrubiína produziu uma inibição significativa do edema alérgico da orelha dos animais sensibilizados ativamente com ovoalbumina e esse efeito antialérgico teve a mesma potência que a dexametasona (usado como controle positivo no experimento). Do mesmo modo a administração sistêmica de marrubiína inibiu significativamente o edema de orelha induzida por diferentes agentes flogísticos, tais como carragenina e dextrana, agentes irritantes padrão para examinar modelos de inflamação aguda, e por serem liberadores de neurotransmissores pró-inflamatórios. A marrubiína, substância abundantemente encontrada na *M. vulgare*, poderia inibir o edema através do impedimento da liberação ou através da ocupação dos receptores dos diferentes agonistas pró-inflamatórios presentes na sopa flogística.

Com base no mecanismo de ação da inibição enzimática de proteases e quinases da Silibinina, substância extraída da planta *Silybum marianum* com atividades hepatoprotetoras, foi comparado com a *M. vulgare* para avaliação do efeito hepatoprotetor em modelos *in silico*. Nove compostos da planta teste cumpriram, na avaliação, requisitos que qualificam suas atividades biológicas. São elas: marrubiína, pré-marrubiína, vulgarina, vulgarol, vitexina, apigenina, chryseriol, stachydrina, e o 1-cafeoyl-L ácido málico. Após nova avaliação verificou-se que a vulgarina apresentou maior atividade em relação ao medicamento padrão, de modo que este composto é avaliado positivamente quanto a sua atividade protetora hepática (VERMA et al., 2012).

Em alguns experimentos, ratos foram submetidos a estresse hepático, porém quando previamente tratados com extratos da *M. vulgare*, houve significativa redução nos níveis de peroxidação lipídica e aumento da atividade de agentes antioxidantes, quando comparados com ratos normais. Este efeito benéfico pode ser explicado pelo papel antioxidante e pela eliminação de radicais livres que a planta promove, contribuindo com o efeito protetor hepático da *M. vulgare*, o que pode ser atribuído à presença de ácidos fenólicos e flavonoides em seu extrato. Contudo é presumível que a planta é capaz de corrigir o sistema de defesa antioxidante enzimático de maneira significativa através de seus fitoconstituintes (ZAABAT et al., 2011; ETTAYA et al., 2015).

Baseados em etnoindicações da medicina popular, e apesar da farmacopeia fornecer comprovações científicas em nível laboratorial para uso terapêutico da planta em questão, a complexidade fisiológica animal e a possibilidade de variantes nos efeitos desconhecidos decorrentes de seu uso como fitoterápico, abrem precedentes que induzem a uma busca de conhecimento racional e organizado. Este pode servir de base para avanços tecnológico-

científicos no futuro, pois há sempre a possibilidade de extrapolação de uma hipótese desenhada de um modelo para outro, dependendo é claro dos indícios de atividade biológica.

4- Materiais e métodos

4.1- Preparação da infusão da *Marrubium vulgare*

Para obtenção do extrato bruto total, foram utilizadas as partes aéreas da *Marrubium vulgare*, onde estão concentradas grandes quantidades dos alcaloides, lactonas, terpenos e taninos responsáveis pelas principais atividades biológicas da planta (Mc CRINDLE, 1969). O material botânico foi obtido em plantação particular, na cidade de Bom Retiro, no Estado de Santa Catarina entre setembro de 2014 a maio de 2015 e as partes aéreas da planta compostas por caule, folhas e flores, foram submetidas à secagem natural ao abrigo do sol em bancada de mármore por uma semana. Diariamente o material foi revolvido para aumentar a ventilação e acelerar a desidratação sem promover fermentação ou mofo.

A fragmentação do material foi feita por fragmentador automático de massa. O resultante desse processo, foi um particulado homogêneo das partes aéreas da *M. vulgare* com fragmentos de até dois centímetros de comprimento.

O material vegetal obtido do processamento de secagem e fragmentação foi armazenado em sacos plásticos higienizados; em cada saco plástico armazenou-se 100 gramas de partes aéreas particuladas e desidratadas, e com objetivo de reduzir perdas por volatilidade ou por modificações bioquímicas o armazenamento das alíquotas individuais em freezer foi o padronizado.

4.2- Administração da infusão da *Marrubium vulgare* aos bezerros

Foram utilizados bezerros machos (n = 8) da raça Jersey recém-nascidos pesando de 20 a 25 kg e oriundos de propriedades rurais de atividade leiteira no município de Realeza. Os quais receberam apenas colostro nas primeiras seis horas de vida. Posteriormente os bezerros foram encaminhados para instalações individuais, com cama composta por serragem do tipo maravalha comercial, para que se iniciasse o período de adaptação ao novo ambiente. A utilização dos animais foi autorizada e homologada na Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) sob o número 23205.004981/2013-40, assim como a propriedade na qual os animais ficaram acomodados para a execução do experimento, onde o proprietário teve a

ciência dos termos de execução do trabalho científico conforme assinatura de Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Para adaptação ao ambiente experimental, nos primeiros cinco dias de vida os animais consumiram apenas leite *in natura*, quatro litros (4 ℓ) por dia por animal, divididos em uma mamada fornecida pela manhã (2 ℓ) e uma ao final da tarde (2 ℓ). Passada a fase de adaptação, a partir do sexto dia, foi iniciada a fase de administração da infusão da *M. vulgare* juntamente com o leite, em doses relativas ao peso e crescentes, iniciando em 1 g de matéria seca da planta em infuso por quilo (kg) peso vivo (PV) animal chegando à dose máxima de 8 g/kg PV, diluídos em 500 mL de água, conforme Tabela 1. O grupo controle recebeu a mesma quantidade de leite (4 ℓ/ dia) com 500 mL de água potável. A partir do sexto dia foi ofertada ração peletizada de crescimento para bezerros *ad libitum*, porém foram privados de alimentação vegetal fibrosa.

Tabela 1: Doses da infusão da *M. vulgare* relativas ao peso corporal, administradas junto com leite aos bezerros neonatos, relacionados aos períodos decorridos do experimento.

Dias do experimento	Leite ingerido	Dose da <i>M. vulgare</i> em 500 mL de Água
01 ao 05	2 ℓ b.i.d.*	0 g/kg de PV**
06 ao 15	2 ℓ b.i.d.	1 g/kg de PV
16 ao 25	2 ℓ b.i.d.	2 g/kg de PV
26 ao 35	2 ℓ b.i.d.	4 g/kg de PV
36 ao 45	2 ℓ b.i.d.	8 g/kg de PV

Fonte: Elaborado pelo autor; b.i.d.* (*bis in die* = duas vezes ao dia); **PV (peso vivo).

4.3 - Coletas de sangue e análise hematimétrica, bioquímica e metabólica

Para realização dos exames hematológicos e bioquímicos dos bezerros foram obtidas amostras sanguíneas através da punção da veia jugular externa. Para realização do hemograma foram coletados 5 mL de sangue em tubo contendo o anticoagulante, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Para obtenção do soro, necessário à realização dos exames bioquímicos, foram coletados 10 mL de sangue sem anticoagulante, e o processamento posterior se deu através da centrifugação da amostra a 5.000 rpm durante 10 minutos (THRALL, 2007).

Os índices hematimétricos avaliam o tamanho, o formato e as características físicas dos eritrócitos, juntamente com a contagem de glóbulos vermelhos, os índices hematimétricos são usados para diagnosticar várias formas de anemia, quando presentes. Para o trabalho, a contagem de hemácias e a determinação da concentração de hemoglobina foram realizadas em contador automático de células, por meio de centrífuga, onde o capilar contendo a amostra foi centrifugado a 12.500 rpm, por 5 minutos e o VCM e CHCM calculados através das fórmulas hematócrito X 10 / número de hemácias e hematócrito / hemoglobina X 100, respectivamente.

No leucograma, a contagem de leucócitos totais também foi obtida em contador automático de células e a contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo corado através da técnica do panótico simples, por análise microscópica da lâmina sob 1000 vezes de aumento, através de objetiva de imersão (THRALL, 2007).

As amostras de soro obtidas sem a adição de anti-coagulante no sangue foram submetidas à centrifugação para a realização do exame bioquímico de enzimas através do método cinético, em analisador semiautomático bioquímico, onde foi realizada a mensuração das enzimas aspartato-aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT), além de quantificar os níveis de proteína plasmática (proteína total e albumina), mensurados através de refratômetro, para verificar possíveis alterações hepáticas, e os metabólitos ureia e creatinina para verificar a função renal dos animais (KERR, 2003; KANEKO et al., 2008).

4.4- Análises Estatísticas

Foi realizada a comparação dos efeitos médios das quatro doses da infusão da *M. vulgare* sobre os parâmetros clínicos e sobre os parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os dados foram organizados como média aritmética (\bar{X}) mais ou menos os erros padrão das médias (E.P.M), analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias e confirmados pelos testes de Neuman-Keuls ou Dunnet quando necessário, levando em conta dados que ultrapassaram a normalidade do teste. Os resultados foram considerados significativos quando ultrapassaram o valor de $P < 0,05$.

5- Resultados

5.1- Influência da infusão da *Marrubium vulgare* sobre parâmetros fisiológicos

Obviamente devido ao sabor amargo da planta a adesão ao consumo do infuso na

espécie humana é muito baixa, porém observou-se que nos bezerros jovens o comportamento no momento do consumo do infuso se alterava bastante, apresentando uma maior avidez para o consumo da infusão concentrada, sugerindo uma boa palatabilidade para os bovinos, ao contrário do que se percebe quando um humano a consome.

A administração crônica da infusão da *M. vulgare* não promoveu alterações deletérias dos parâmetros clínicos fisiológicos, os quais rigorosamente foram avaliados. Não foram observada diarreia, estado febris, hiporexia em nenhum momento no decorrer dos experimentos.

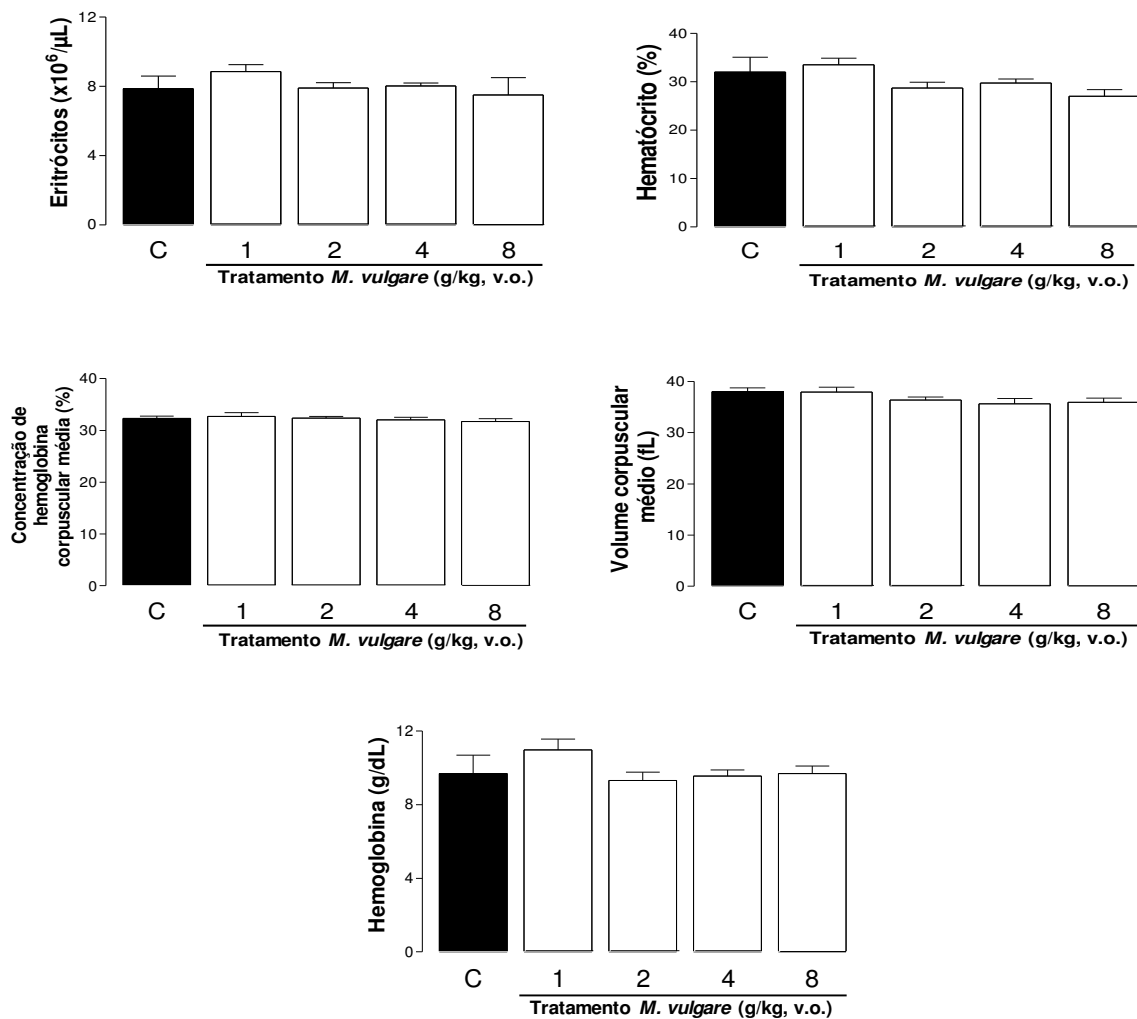
Digno de menção e factualmente não levantado de forma precisa nesta pesquisa foi o fato de que os animais tratados cronicamente com o infuso da *M. vulgare* apresentaram um estado geral saudável, com uma acentuada higidez clínica. Tal observação de uniformidade, distribuição e brilho na pelagem dos animais tratados, foi evidente em relação ao grupo controle colateral (dados não demonstrados). Também é digno de nota que o consumo de ração comercial e água potável foi progressivo e acompanhado de maior ganho de peso dos animais tratados em relação aos controles. Da mesma forma não houve interrupção no consumo da alimentação, tanto sólida como líquida, pois é concebível que alterações na microflora intestinal, indisposições gástricas, ou mesmo a manifestação de alguma doença infecciosa, em maior o menor grau, promovam alterações no apetite e até mesmo anorexia.

A temperatura e as frequências cardíaca e respiratória dos animais foram verificadas nos momentos dos incrementos das doses, a fim de complementar as informações referentes à sanidade dos grupos. Não foram observadas alterações no estado geral tais como estados febris ou o seu oposto, estados hipotérmicos, bem como não foram identificados sinais físicos como taquicardia, bradicardia, taquipnéia ou bradipnéia, aumento ou redução do trânsito intestinal, alteração na coloração de mucosas, dentre outros parâmetros de higidez e saúde.

5.2- Influência da infusão da *Marrubium vulgare* sobre células vermelhas

As hemácias, assim como hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média nos animais testados apresentaram valores muito semelhantes, quando comparados ao grupo controle (Figura 1). E os animais não apresentaram indicativos de estados anêmicos, icterícia ou mesmo hemoglobinúria em qualquer período do experimento.

Figura 1 – Influência da administração crônica da *Marrubium vulgare* nos parâmetros do número de eritrócitos (Figura 1A), hematócrito (Figura 1 B), concentração de hemoglobina corpuscular média (Figura 1 C) volume corpuscular médio (Figura 1 D) e hemoglobina (Figura 1 E). As barras representam a média de 8 experimentos, e as linhas verticais indicam os E.P.M.; Grupo controle (C)



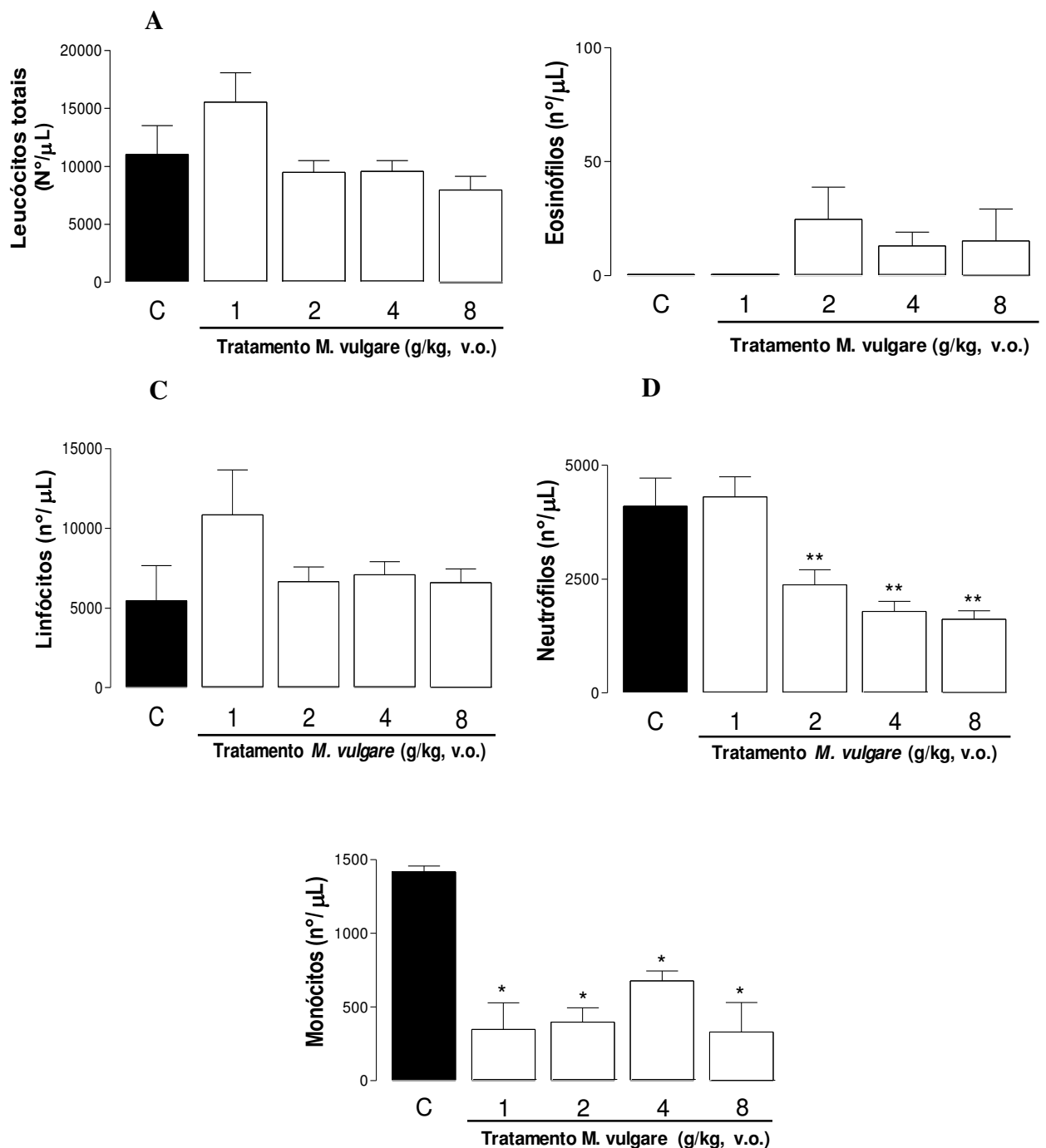
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3- Influência da infusão da *Marrubium vulgare* sobre células de defesa

Não houveram alterações significativas no número de leucócitos totais (Figura 2 A), eosinófilos (Figura 2 B) e linfócitos (Figura 2 C), porém a administração crônica da *M. vulgare* inibiu significativamente o número de neutrófilos circulantes ($P < 0.01$ e inibição máxima [IM] de $59.33 \pm 4.91\%$) (Figura 2 D), e de monócitos ($P < 0.05$ e IM de $56.01 \pm$

11.05%) (Figura 2 E). Para os neutrófilos a inibição teve um perfil dose-resposta a partir da dose de 1 g/kg.

Figura 2 – Influência da administração crônica da *Marrubium vulgare* nos parâmetros dos leucócitos totais (A), eosinófilos (B) e linfócitos (C), neutrófilos (D) e sobre monócitos (E). As barras representam a média de 8 experimentos, as linhas verticais indicam os E.P.M.; Controle (C). Dados considerados significantes em relação ao controle *P < 0,05; **P < 0,01.

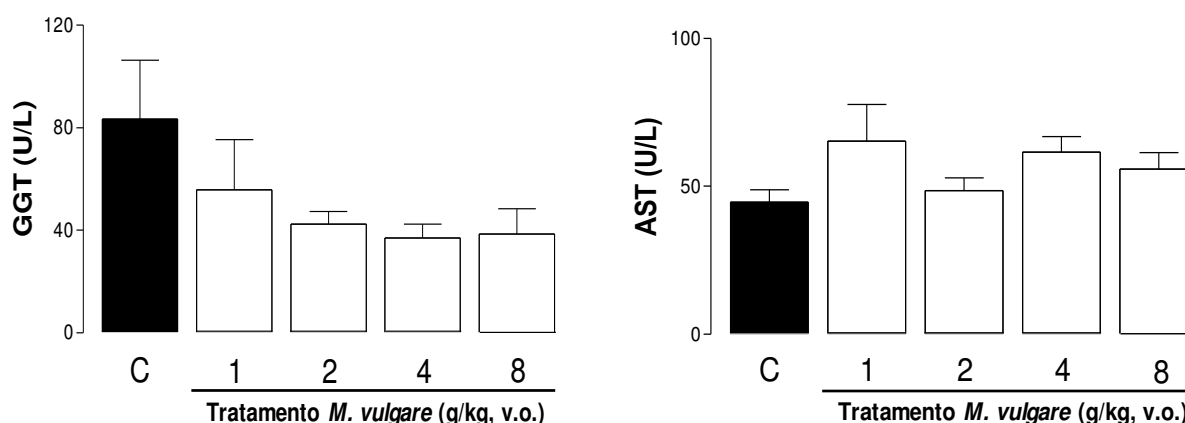


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4- Influência da infusão da *Marrubium vulgare* sobre enzimas marcadoras de lesão hepática

Nos testes enzimáticos para dosagem das enzimas marcadora de lesão hepática em bovinos, as enzimas gama-glutamilttransferase (GGT) (Figura 3 A), aspartato-aminotransferase (AST) (Figura 3 B), não apresentaram alterações significativas estatisticamente nos níveis sanguíneos em comparação ao grupo controle (C), demonstrando possivelmente ausência de lesão hepática aguda. Porém ao analisarmos o gráfico de atividade GGT, houve uma tendência não significativa de redução gradual dessa enzima hepática, proporcionalmente à dose administrada de infusão da *M. vulgare*, fato não observável para a enzima AST.

Figura 3– Influência da administração crônica da *Marrubium vulgare* nos parâmetros de GGT (Figura 3 A) e AST (Figura 3 B). As barras representam a média de 8 experimentos, as linhas verticais indicam os E.P.M.; Grupo controle (C).

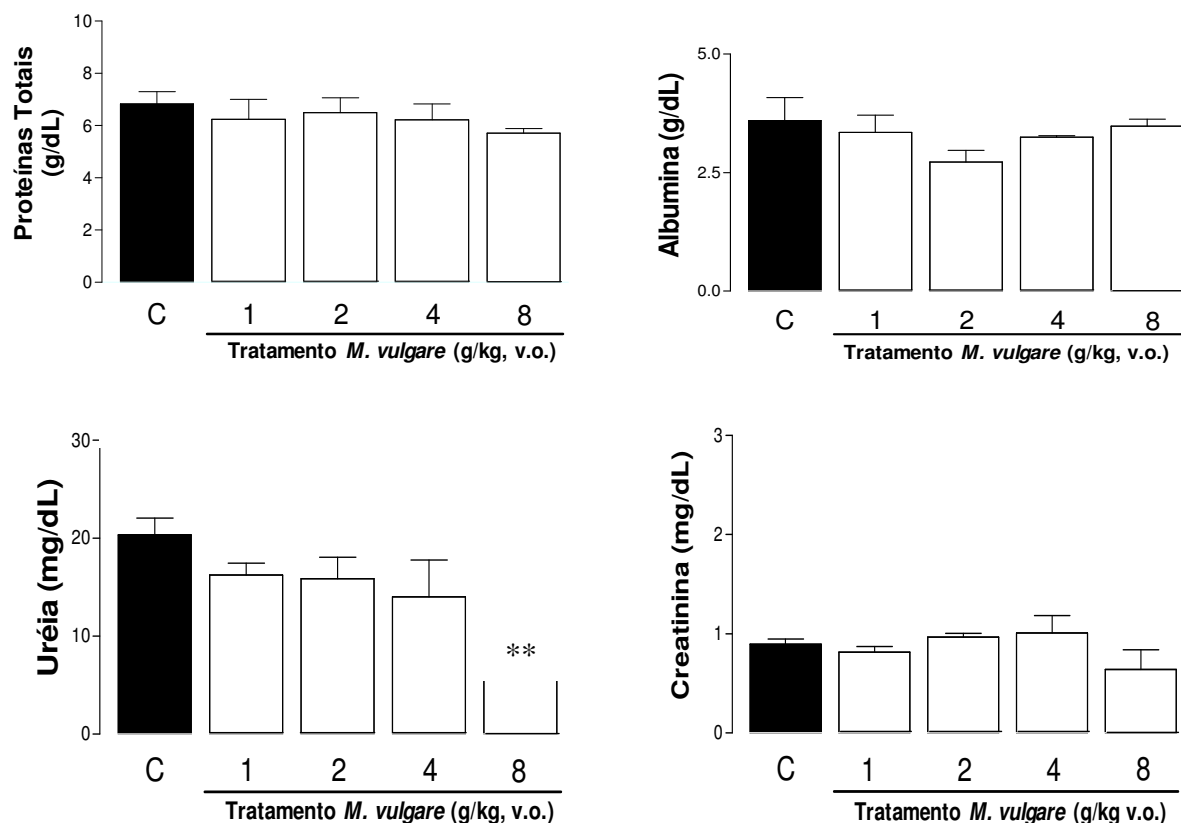


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5- Influência da infusão da *Marrubium vulgare* sobre proteínas e metabólitos

Em relação às dosagens séricas e seriadas de proteínas e metabólitos, não houveram alteração significativas nos níveis sanguíneos de proteínas totais (Figura 4 A) e albumina (Figura 4 B), bem como nos níveis de creatinina (Figura 4 D). Porém, na avaliação dos níveis de ureia sanguínea, houve uma inibição abrupta significativa na dose de 8 g/kg (Figura 4 C), sugerindo efeitos anti-urêmicos ou depuradores a partir dessa dose.

Figura 4 – Influência da administração crônica da *Marrubium vulgare* sobre as proteínas totais (Figura 4 A) e albumina (Figura 4 B), e sobre os metabólitos marcadores da função renal ureia (Figura 4 C) e creatinina (Figura 3 D). As barras representam a média de 8 experimentos e as linhas verticais indicam os E.P.M.; Grupo controle (C). Dados considerados significantes em relação ao controle $**P<0,01$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6- Discussão

A *M. vulgare* é uma planta medicinal que tem fortes etnoindicações para uma variada gama de doenças que acometem os humanos e animais, que vão desde ações antiespasmódicas sobre o sistema gastrointestinal e útero (DE OLIVEIRA et al., 2011; SCHLEMPER et al., 1996), doenças do aparelho respiratório e antidiabetogênica (BALMÉ, 2004).

Os resultados do estudo contribuem para a elucidação dos possíveis efeitos toxigênicos da planta medicinal *M. vulgare* em um modelo de toxicidade em bovinos jovens, ainda não ruminantes. Somente alguns estudos com roedores avaliaram de modo superficial a possibilidade de existirem efeitos deletérios produzidos pela *M. vulgare* ou seus compostos fitoconstituintes (ETTAYA et al., 2015). Através dos dados obtidos pode-se investigar se o consumo e/ou administração da *M. vulgare in natura*, sob a forma de infusão pode ser destituído de efeitos colaterais, nas doses de até 8 g/kg PV por períodos de até quarenta dias. Complementando, e contrariando o que era esperado, pode ser observada avidez pelo consumo do infuso, mesmo nas doses máximas. Esse fato pode ser atribuído a uma associação ao momento do fornecimento do leite, e não somente a uma palatabilidade diferenciada da planta para a espécie, fato passível de investigação.

Procurou-se demonstrar a possibilidade de que doses contínuas e crescentes até máximas doses do infuso da planta poderiam induzir a sinais clínicos, bioquímicos, hematológicos e enzimáticos, mediante um desafio a esses sistemas orgânicos, ou até mesmo efeitos deletérios em uma espécie superior na escala filogenética dos mamíferos, como os bezerros recém-nascidos até um mês e meio de vida (VEIGA-JUNIOR, 2005). No modelo, bovinos neonatos foram mantidos ao máximo com o rúmen não funcional, através da privação de consumo de forrageira fibrosa ou de volumosos, garantindo assim que a absorção de nutrientes, medicamentos ou xenobióticos fornecidos a eles seria somente em nível de aparelho gastrointestinal, simulando assim a absorção que ocorre em monogástricos (MARRINER & BOGAN 1979; SHOAF et al., 1987; SUTTER et al 1993).

Em uma comparação não refinada entre as doses da infusão utilizadas na medicina popular, podemos sugerir que a metodologia posológica da *M. vulgare* no trabalho supera em muitas vezes a dosagem utilizada nas formulações empíricas usuais utilizadas na terapêutica das propriedades rurais onde a planta é consumida (BALMÉ, 2004; VEIGA-JUNIOR, 2005). A formulação baseada no infuso foi escolhida devido à analogia ao uso popular, onde a planta é rotineiramente empregada no tratamento de doenças. Seguindo o uso empírico, no qual é descrito que uma porção de 30-60 gramas de partes aéreas é submetida em infusão em um litro de água de água fervente por vinte minutos ou até que esfrie, tentamos reproduzir o modo como é administrado este fitoterápico, porém com uma proposta científica, na qual uma dosagem bem maior foi estabelecida através da estimativa em gramas do peso seco da planta por quilogramas de peso vivo do animal, onde o conteúdo ativo foi extraído do material botânico através da adição de água fervente por 20 minutos, e o resfriamento natural

subsequente até que atingisse a temperatura adequada para posterior fornecimento, juntamente ao leite da dieta (RATES, 2001).

A presença de inúmeros fitoconstituintes na planta como flavonoides, terpenos, e outros metabólitos secundários não permite responsabilizar precisamente qual dos princípios ativos existentes na infusão aquosa promoveu os efeitos obtidos pela administração crônica; de mesma forma por ocasião da coleta, a variabilidade estacional da coleta do material, solo e suas características diversas como fertilidade (SCHLEMPER et al., 1996), temperatura média anual, pluviosidade regional, e muitos outros fatores não elencados podem também interferir na constituição da planta, mas principalmente interferir nas proporções dos fitoconstituintes (SANTOS et al., 1995). Conhecendo essas possibilidades mencionadas, principalmente quando é trabalhado com matérias primas de origem natural, onde alguns fatores não podem ser modificados e controlados (YUNES et al., 2001)

Em nível de hematimetria não foram encontradas alterações na contagem total de hemácias, na quantidade de hemoglobina presente nelas e na porcentagem do volume plasmático ocupado pelas células vermelhas, confirmando a ausência de fatores deletérios aos índices hematimétricos tidos como normais nos bezerros neonatos, pela administração crônica da infusão da *M. vulgare* (BIRGEL JUNIOR et al., 2001).

A albumina e as globulinas são principais componentes do plasma sanguíneo dos bovinos jovens. A albumina é sintetizada no fígado e apresenta a maior fração plasmática, tendo como funções a manutenção da pressão oncótica, reserva de aminoácidos e proteínas teciduais, transporte de metabólitos, minerais, ácidos graxos e inativação e eliminação de compostos tóxicos (THRALL et al., 2007; AKTER et al., 2013). A detecção seriada dos níveis plasmáticos das proteínas totais e de albumina são de fundamental importância para controle preciso da função hepática dos bezerros, e a preservação na produção de proteínas pelo hepatócito, mesmo sob influência da necessidade de metabolização de grandes quantidades do infuso, em dosagens muitas vezes superiores às fitoterápicas usualmente empregadas (RATES, 2001), estabelecem segurança e respaldo na continuidade do uso do infuso como protetor hepático ou com a finalidade de reestabelecer a função digestiva, sem riscos à essa espécie, até as doses e tempo utilizados no experimento. No ensaio não obtivemos flutuações nos níveis plasmáticos de proteínas totais ou albumina ao longo da realização do protocolo experimental (THRALL et al., 2007; AWE et al., 2013).

Quanto aos resultados hematimétricos encontrados para células de defesa nos animais tratados, observamos que leucócitos totais e linfócitos tiveram uma tendência ao aumento (dentro dos parâmetros fisiológicos) nessas células circulantes em dosagens de 1 g/kg de PV

b.i.d. Porém passados dez dias no consumo da infusão da planta em dosagens acima de 2 g/kg PV b.i.d. houve uma normalização na contagem celular. Esse aumento pode ser explicado devido à reatividade celular frente à mudança dos animais para o novo ambiente experimental ao qual foram submetidos e/ou ao amadurecimento da resposta imune. É imprescindível a menção de que os números de leucócitos totais e linfócitos em bovinos tem uma tendência de manter-se em média a 10.000 U/ μ L e 7.000 U/ μ L respectivamente, o que foi condizente com o modelo proposto nas doses administradas subsequentemente (BIRGEL JUNIOR et al., 2001).

Especificamente, ainda em relação à série de células brancas de defesa, houve uma redução significativa de monócitos, na qual a curva obtida não obedeceu ao perfil de inibição proporcional à dose, já alcançando a inibição máxima com a dose de 1g/kg. Para neutrófilos circulantes a inibição foi dose-dependente. Apesar de não extrapolar a faixa fisiológica dessas células, esse efeito inibitório sobre dois segmentos da série branca, pode ter algum resultado sugestivo de um possível efeito imunomodulador da planta inteira. É necessária uma investigação mais apurada desse efeito e o que ele poderia significar para a saúde geral dos animais. Já foram identificados alguns compostos fitoquímicos presentes na planta que inibem a migração de células de defesa durante o processo inflamatório induzido por diferentes agentes flogísticos no lavado broncoalveolar de camundongos (SCHLEMPER et al., 2005). Com as doses máximas utilizadas de até 8 g/ kg seria interessante a investigação do efeito imunossupressor com o extrato bruto em modelos de inflamação e imunossupressão em diferentes tipos celulares, ou ainda se essa capacidade imunossupressora seria capaz de inibir totalmente influxos celulares em sítios inflamatórios de animais experimentais agudos e crônicos de inflamação.

Eosinófilos são importantes tipos celulares responsáveis pela resposta imune à agentes parasitários e na maior parte das vezes estão envolvidos em processos alérgicos (THRALL et al., 2007), e em nosso experimento foram indicadores de sanidade das instalações para os animais, como é esperado com o aumento do tempo de exposição a agentes exógenos alergênicos, a expressão desse tipo celular poderia aumentar, ocasionando variação flutuante em seu número total. No caso do presente trabalho, a variância não foi significativa, demonstrando que o extrato bruto da *M. vulgare* é incapaz de induzir alergia nas dosagens administradas neste estudo (BIRGEL JUNIOR et al., 2001).

Em relação à possíveis ações toxigênicas sobre o fígado, é sabido que esse órgão é o principal biotransformador de moléculas endógenas e exógenas e os parâmetros de toxicidade

podem ser avaliados através da atividade enzimática de diferentes “pools” enzimáticos (NOUWS et al., 1988; BALDWIN et al., 2004). Em nosso estudo fizemos o doseamento da atividade enzimática da GGT e da AST, como parâmetro de lesão hepática. A GGT é em bovinos produzida por quase todos os tecidos corporais, em maior quantidade pelo pâncreas e rins, porém é produzida e encontrada em menor quantidade no tecido hepático, além de ductos biliares na mucosa intestinal, e na glândula mamária de vacas paridas. A atividade da GGT é relativamente alta no fígado de bovinos, sendo importante para diagnóstico de colestase e lesão ao hepatócito, por que estas alterações provocam aumento na atividade sérica desta enzima, com melhor utilidade diagnóstica que a fosfatase alcalina (FA) em razão do amplo intervalo de referência da FA nessas espécies (THRALL, 2007). É comum o aumento sérico de GGT em bezerros recém-nascidos após a ingestão do colostro, explicando assim os altos níveis dessa enzima nos bezerros neonatos, tanto do grupo controle como o dos testados (THRALL, 2007; MORAES, 2011). Aumentos na expressão sérica das enzimas AST e GGT em comparação ao controle, por serem marcadoras de lesão hepática letais e sub letais, denotaria danos ao parênquima do órgão, porém como é mostrado nos resultados laboratoriais, a AST mensurada no presente estudo, não sofreu alterações fora dos extremos considerados fisiológicos. Em contrapartida, a GGT sofreu uma tendência, porém não estatisticamente significativa, de diminuição com o aumento da dosagem utilizada, e essa diminuição de expressão sofreu maior inibição com 8 g/kg b.i.d., o que nos permite postular que em possíveis aumentos de dosagens ou aumento de exposição podemos obter inibição significativa dos níveis enzimáticos (THRALL, 2007).

Na avaliação dos níveis de ureia sanguínea, houve uma inibição abrupta significativa na dose de 8 g/kg, sugerindo efeitos anti-urêmicos a partir dessa dose. Essas alterações em conjunto poderiam estar associadas às observações anteriores de alguns autores, que sugerem uma ação hepatoprotetora ou depuradora para a utilização da planta sob a forma de extrato bruto (AKTER et al., 2013; ETTAYA et al., 2015). Mesmo assim foi demonstrado com esses dados que, mesmo em dosagens muito altas (até 8 g/kg b.i.d.) e por longos períodos (45 dias) a infusão aquosa da planta é desprovida de toxicidade sobre os sistemas depuradores hepático e renal, além de estimular a eliminação de metabólitos (TUROLLA, 2004).

Enfim podemos desenvolver e validar um novo modelo de toxicidade pré-clínica onde o bovino jovem, ainda não ruminante, possa ser utilizado como modelo para estudos de toxicidade de novos fármacos ou formulações terapêuticas (NOUWS et al., 1988). Pois trata-se de um modelo experimental de animal mamífero mais complexo, onde a absorção dos mesmos dá-se em nível gastrointestinal. Nossa intenção futura também é aprimorar a técnica

de avaliação com experimentos de metabolômica da *M. vulgare*. No próximo passo tentaremos complementar com o perfil farmacocinético através da identificação e dosagem dos princípios ativos diterpênicos e/ou compostos fenólicos, presentes em grande quantidade na planta, através de técnicas cromatográficas. Poderíamos assim traçar um perfil farmacocinético de absorção e distribuição de moléculas padrão, o que contribuiria para a elucidação de posologias para o fitoterápico em questão.

7- Conclusão

Mesmo em administrações crônicas da *M. vulgare* não foram observados efeitos deletérios nos animais tratados, da mesma forma pode-se observar uma melhora no estado geral dos animais (higidez), ressaltando a tese de que a infusão da *M. vulgare* inteira é destituída de toxicidade quando usado na totalidade de seus compostos fitoquímicos e comprovando a aplicabilidade terapêutica da infusão em animais de fazenda. Da mesma forma, o modelo empregado serve como base metodológica para a pesquisa de compostos fitoquímicos e de moléculas sintéticas em animais de interesse agropecuário e na pesquisa biomédica humana.

Referências

- ALIEV, R. K.; ALIEV, A. M. Chemical composition of *Marrubium vulgare* and effect of its preparation on cardiovascular system. **Uchenye Zapiski Azerbaidshan**, v. 9, n. 27, p. 69-75, 1956.
- AKTHER, N. et al. Hepatoprotective activity of *Marrubium vulgare* against paracetamol induced toxicity. **Journal Pharmacology Reserch**, v. 7, p. 565-570, 2013.
- AL KHATIB, R. et al. Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*. **Planta medica**, v. 76, n. 01, p. 86-87, 2010.
- AWE, E. et al., Biochemical and haematological assessment of toxic effects of the leaf ethanol extract of *Petroselinum crispum* (Mill) Nyman ex AW Hill (Parsley) in rats. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.
- BALDWIN, R. L. et al. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre-and postweaning ruminant. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. E55-E65, 2004.
- BALMÉ, F. **Plantas Mediciniais**, 2004. 1 ed. Barueri, Editora Hemus, 336 p.
- BERROUGUI, H. et al. *Marrubium vulgare* extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage. **Life Science**, v. 80, p. 105-12, 2006.
- BIRGEL JUNIOR, E. H. et al. Reference values of the erythrogram of Jersey breed, raised in São Paulo state. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 1-9, 2001.
- BOUDJELAL, A. et al. Compositional analysis and in vivo anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 286-292, 2012.
- CIRILO, V. K.; **Manual de Plantas Mediciniais**; Ed. Assessorar, Francisco Beltrão, Paraná, p. 12, 1993.
- DAWSON, Adele G. **Herbs: Partners in Life: Healing, Gardening, and Cooking with Wild Plants**. Healing art press. Rochester, 216 p. 2000.
- DEHBASHI, Z. et al. Antibacterial activity of *Marrubium vulgare* L. against antibiotic resistance *Klebsiella pneumoniae* strains. **Advanced Herbal Medicine**, v. 1, n. 3, p. 9-14, 2015.
- DE JESUS, R. A. P. et al. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. **Phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 111-115, 2000.
- DE OLIVEIRA, A. P. et al. Gastroprotective activity of methanol extract and marrubiin obtained from leaves of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, n. 9, p. 1230-1237, 2011.
- DE SOUZA, M. M. et al. Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare*. **Phytomedicine**, v. 5, n. 2, p. 103-107, 1998.

EL BARDAI, S. et al. The vasorelaxant activity of marrubenol and marrubiin from *Marrubium vulgare*. **Planta medica**, v. 69, n. 01, p. 75-77, 2003.

EL BARDAI, S. et al. Comparative study of the antihypertensive activity of *Marrubium vulgare* and of the dihydropyridine calcium antagonist amlodipine in spontaneously hypertensive rat. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 26, n. 6, p. 465-474, 2004.

ETTAYA, A. et al. Hepatoprotective activity of white horehound (*Marrubium vulgare*) extract against cyclophosphamide toxicity in male rats. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 94, n. 4, p. 441-447, 2015.

FERNANDES, E. N.; BRESSAN, M.; DA SILVA V. R. Zoneamento da pecuária leiteira da região sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 485-491, 2004.

GIROTTI, Giana. **Efeito analgésico do extrato hidroalcolico obtido da *Marrubium vulgare* sob modelo de estimulação elétrica da polpa dental em ratos**. 2004. 159 f. Trabalho de conclusão de curso para obtenção de grau Bacharel em odontologia. Universidade do vale de Itajaí. Itajaí. 2004.

GIRRE, Loïc. **Infusions et plantes de santé en France**. Tours, 1 Ed. Ouest-France., 60 p. 2000.

HENDERSON, M. S. and Mc CRINDLE, R.: Premarrubiin. A diterpenoid from *Marrubium vulgare*. **Journal Chemical Societ**. 15: 2014-15, 1969

HERRERA-ARELLANO, A. et al. Clinical trial of *Cecropia obtusifolia* and *Marrubium vulgare* leaf extracts on blood glucose and serum lipids in type 2 diabetics. **Phytomedicine**, v. 11, n. 7, p. 561-566, 2004.

KANEKO, Jiro Jerry; HARVEY, John W.; BRUSS, Michael L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. Academic press. cap. 5,6,7,11,13, p. 117-352, 2008.

KANYONGA, P. M. et al. Assessment of methanolic extract of *Marrubium vulgare* for anti-inflammatory, analgesic and anti-microbiologic activities. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 1, p. 199-204, 2011.

KERR, Morag G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia**. 2 ed. São Paulo: Roca. 436 p. 2003.

MARRINER, S. & BOGAN, J. A. The influence of the rumen on the absorption of drugs: studies using meclofenamic acid administered by various routes to sheep and cattle. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 2, n. 2, p. 109-115, 1979.

MASCOLO, N. et al. Biological screening of Italian medicinal plants for anti-inflammatory activity. **Phytotherapy research**, v. 1, n. 1, p. 28-31, 1987.

MASOODI, M. H. et al. Antibacterial activity of whole plant extract of *Marrubium vulgare*. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, n. 2, p. 086-087, 2008.

MEYRE-SILVA, C. et al. Analgesic potential of marrubiin derivatives, a bioactive diterpene present in *Marrubium vulgare* (Lamiaceae). **IL Farmaco**, v. 60, p. 321-326, 2005.

MEYRE-SILVA, C. & CECHINEL-FILHO, V. A review of the chemical and pharmacological aspects of the genus *marrubium*. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 31, p. 3503-3518, 2010.

MNONOPI, N; et al. The cardioprotective effects of marrubiin, a diterpenoid found in *Leonotis leonurus* extracts L. **Journal of Ethnopharmacology**., v. 138, p. 67– 75, 2011.

MNONOPI, N; et al. Marrubiin, a constituent of *Leonotis leonurus*, alleviates diabetic symptoms. **Phytomedicine**. v. 19, p. 488- 493, 2012.

MORAES, Danielle Vitorino. **Perfil bioquímico sérico de bezerros mestiços durante o primeiro ano de vida**. 2011. 20 f. Dissertação para obtenção de Título de Mestre em ciências Veterinárias, Universidade federal de Uberlândia- Programa de Pós-Graduação em ciências Veterinárias, Uberlândia, 2011.

NEWAL, C.A.; Anderson, L.A.; Phillipson, J.D. Herbal Medicines. A guide for health-care professionals. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, London, 296 p. 1996.

[NISHIDA](#), Y. et al. The effect of reflex closure of the esophageal groove on bioavailability of oral sulfamethoxazole-trimethoprim in ruminating calves. **Journal of veterinary medical science**, v. 58, n. 5, p. 397-400, 1996.

NOUWS, J. F. M. et al. Pharmacokinetics, renal clearance and metabolism of ciprofloxacin following intravenous and oral administration to calves and pigs. **Veterinary Quarterly**, v. 10, n. 3, p. 156-163, 1988.

NOVAES, A. P. et al. Preliminary evaluation of the hypoglycemic effect of some Brazilian medicinal plants. **Therapie**, v. 56, n. 4, p. 427-430, 2000.

PARRÉ, J. L. et al. Perfil socioeconômico de Produtores de leite da região Sudoeste do Paraná: Um estudo a partir de diferentes níveis de produtividade. **Revista de Economia e Agronegócio**, v. 9, n. 2, 2015

PAVELA, R. Insecticidal activity of certain medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7, p. 745-749, 2004.

POPOOLA, O. K. et al. Marrubiin. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9049-9060, 2013.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

ROMAN, R. et al. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. **Archives of medical research**, v. 23, n. 1, p. 59-64, 1991.

SAHPAZ, S. et al. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 389-392, 2002.

SALAMA, M.; TAHER, E.; EL-BAHY, M. Molluscicidal and Mosquitocidal Activities of the Essential oils of *Thymus capitatus* Hoff. et Link. and *Marrubium vulgare* L. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 5, p. 281-286, 2011.

SANTOS, P. R. V. et al., Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. **Revista farmacologia e bioquímica**. Universidade de São Paulo, v. 31, n. 1, p. 35-8, 1995.

SCHLEMPER, V. et al. Antiespasmotic effects of hidroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. **Phytomedicine**, v. 7, p. 103-107, 1996.

SCHLEMPER, V. et al. A marrubiína inibe a migração celular induzida por diferentes agentes pró-inflamatórios no lavado broncoalveolar de camundongos. In: XX Reunião Anual de Sociedades de Biologia Experimental- FESBE. v. XX. p. 208. 2005

SHOAF, S. E.; SCHWARK, W. S.; GUARD, C. L. The effect of age and diet on sulfadiazine/trimethoprim disposition following oral and subcutaneous administration to calves. **Journal of veterinary pharmacology and therapeutics**, v. 10, n. 4, p. 331-345, 1987.

STULZER, H. K. et al. Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 379–384, 2006.

SUTTER, H.-M.; RIOND, J.-L.; WANNER, M. Comparative pharmacokinetics of aditoprim in milk-fed and conventionally fed calves of different ages. **Research in veterinary science**, v. 54, n. 1, p. 86-93, 1993.

TAIB, I. S. et al. Toxic effects of *Litsea elliptica* Blume essential oil on red blood cells of Sprague-Dawley rats. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10, n. 11, p. 813-819, 2009.

THRALL, Mary Anne. **Hematologia e Bioquímica veterinária**. Cap 11,23,26. 1 ed. São Paulo: Roca. 582 p., 2007.

TUROLLA, Monica Silva dos Reis. **Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo**. 2004. 145 p. Dissertação para obtenção de Título de Mestre em ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo- Faculdade de ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2004.

VANDERJAGT, T. J. et al. Comparison of the total antioxidant content of 30 widely used medicinal plants of New Mexico. **Life Sciences**, v. 70, n. 9, p. 1035-1040, 2002.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-13, 2008

VERMA, A. et al. Lead finding from whole plant of *Marrubium vulgare* L. with Hepatoprotective Potentials through in silico methods. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1308-S1311, 2012.

YAMAGUCHI, K. et al. Anti-proliferative effect of horehound leaf and wild cherry bark extracts on human colorectal cancer cells. **Oncology reports**, v. 15, n. 1, p. 275-282, 2006.

YOUSEF, K. et al. Cardioprotective effect of methanolic extract of *Marrubium vulgare* L. on isoproterenol-induced acute myocardial infarction in rats. **Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 653-660, 2013.

YUNES, R. A. et al. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

WEEL, K.G.C. et al. Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare* L) grown in Lithuania. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 101, n. 10, p. 395-399, 1999.

WICHTL, M. & ANTON, R. **Plantes thérapeutiques**. Tech & Doc; Editions Médicales Internationales, v. 16, n. 19, p. 395, 1999.

ZAABAT, N. et al. Antioxidant and antigenotoxic properties of compounds isolated from *Marrubium deserti* de Noé. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3328-3335, 2011.

ZARAI, Z. et al. The in-vitro evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic properties of *Marrubium vulgare* L. essential oil grown in Tunisia. **Lipids in health and disease**, v. 10, n. 1, p. 1, 2011.