UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS

CAMPUS DE REALEZA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM-ESTAR E PRODUÇÃO ANIMAL SUSTENTÁVEL NA FRONTEIRA SUL – PPG-SBPAS

GUINTER SILVA DA CUNHA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFUSÃO DE *Marrubium vulgare* SOBRE GANHO DE PESO, CONVERSÃO ALIMENTAR E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM SUÍNOS RECÉM DESMAMADOS

REALEZA

2019

GUINTER SILVA DA CUNHA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFUSÃO DE *Marrubium vulgare* SOBRE GANHO DE PESO, CONVERSÃO ALIMENTAR E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM SUÍNOS RECÉM DESMAMADOS

Dissertação de mestrado apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul

Orientador: Prof. Dr. Valfredo Schlemper

REALEZA

2019

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Cunha, Guinter Silva da
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFUSÃO DE Marrubium vulgare SOBRE GANHO DE PESO, CONVERSÃO ALIMENTAR E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM SUÍNOS RECÉM DESMAMADOS / Guinter Silva da Cunha. -- 2019.
56 f.:il.

Orientador: Doutor Valfredo Schlemper.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul-PPG-SBPAS, Realeza, PR , 2019.

1. Planta medicinal. 2. Fitobiótico. 3. Marrubium vulgare. 4. Desempenho zootécnico em suínos. 5. Fitoterapia veterinária. I. Schlemper, Valfredo, orient. II. Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

GUINTER SILVA DA CUNHA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFUSÃO DE *Marruibium vulgare* SOBRE GANHO DE PESO, CONVERSÃO ALIMENTAR E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM SUÍNOS RECÉM DESMAMADOS

Dissertação de mestrado apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul

Esta dissertação foi defendida e aprovada pela banca em:

11 / 12 / 2019

BANCA EXAMINADORA

gov.br Documento assinado digitalmente
VALFREDO SCHLEMPER
Data: 03/11/2026 22:01:03-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. Valfredo Schlemper – UFFS
Orientador

Prof. Dra. Aline De Marco Viott - UFPR

gov.br Documento assinado digitalmente
DENISE MARIA SOUSA DE MELLO
Data: 04/11/2026 07:28:11-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Denise Maria Sousa de Mello - UFFS

RESUMO

Até recentemente as rações de suínos continham antibióticos para prevenir doenças e promover o crescimento dos animais na suinocultura intensiva. A restrição do uso de antibióticos em alimentos em muitos países, fez com que a cadeia produtiva da carne brasileira se adaptasse e buscasse alternativas para os suinocultores. Os fitobióticos são produtos derivados de plantas adicionados aos alimentos que melhoram o desempenho dos animais de produção. Nesse contexto tem aumentado o interesse no uso de produtos biológicos que podem ser alternativas aos aditivos de rações incluindo produtos fitogênicos. A planta medicinal *Marrubium vulgare* L. (Labiateae), devido às suas propriedades farmacológicas tais como antioxidante, antimicrobiana e melhoradora da digestão, anteriormente demonstradas em experimentos pré-clínicos, estimulou-nos a investigar o potencial como aditivo alternativo aos antibioticos promotores de crescimento. O estudo foi realizado na região Sudoeste do Paraná na cidade de Santa Izabel do Oeste em uma unidade produtora de leitões de terminação. A infusão das partes aéreas da *M. vulgare* foi administrada diariamente via oral a suínos recém-desmamados de ambos os sexos, por 28 dias consecutivos. Foram utilizados 30 leitões, machos, divididos em 5 grupos de 6 leitões cada. Os grupos foram distribuídos em grupo 1 (G1) como controle, onde foi administrado apenas solução fisiológica; grupo 2 (G2) como controle positivo, que foi administrado clembuterol na dose de 0,08 mg/kg; grupo 3 (G3) administrada a infusão da *M. vulgare* (IMV) na concentração de 1%; grupo 4 (G4) administrada a IMV na concentração de 10%; grupo 5 (G5) administrada a IMV na concentração de 20%. Nos dias zero (0), sete (07), quatorze (14), vinte e um (21) e vinte e oito (28) os animais foram pesados e foi realizada a coleta de sangue para realização da análise hematológica e bioquímica. Os resultados obtidos demonstraram que a IMV promoveu incrementos no crescimento ponderal, ganho de peso e conversão alimentar nas doses de IMV 1% e IMV 10% quando comparados com o grupo controle e grupo controle positivo. O tratamento dos animais por 28 dias resultou em incrementos na conversão alimentar no G3 com -12,14% e G4 com -12,21% com relação ao G2. Ainda foi observado nos mesmos grupos um peso final de +7,35% e +4,03%, respectivamente em relação ao G2. Já o ganho de peso foi

+9% e +9,49% respectivamente em relação ao G2. Foram obtidos espectros de diterpenóides padrão em cromatogramas na IMV 10% através de ulcromatografia de alta eficiência acoplada à massas (UPLC-MS) e que foram identificados derivados desses fitoconstituintes também no plasma dos suínos, indicando absorção dos mesmos. O tratamento crônico com a IMV por 28 dias nas concentrações de 1, 10 e 20% não causou alterações hematológicas, bioquímicas e de metabólitos sanguíneos afstando a possibilidade de efeitos toxigênicos nas doses relativas testadas. Através dos resultados do nosso trabalho podemos sugerir que o tratamento dos animais com a IMV melhorou significantemente parâmetros zootécnicos como conversão alimentar, ganho de peso e peso final, sugerindo uma possível atividade fitobiótica da infusão da *M. vulgare*, sem apresentar efeitos toxigênicos.

Palavras-chave: Fitobiótico. Planta medicinal. Fitoterapia veterinária. Promotor de crescimento. Desempenho zootécnico.

ABSTRACT

Until recently pig feed contained antibiotics to prevent diseases and animal growth promoting in industrial pig farming. In that context, there have been an increasing attention in the usage of biological products which are alternative feed additives including phytogenic products. Currently, the potential for agricultural antibiotics to contribute to the development of antibiotic-resistant bacteria of human concern is the subject of intense debate and research. Thus for several years antibiotics were added as growth promoters in diets for post-weaning piglets. In this context, interest in the use of biological products has increased that may be alternative to feed additives including phytogenic products. The medicinal plant *Marrubium vulgare* L (Labiateae), due to its pharmacological properties such as antioxidant, antimicrobial and digestion improvement, previously demonstrated in preclinical experiments, encouraged us to investigate the potential alternative additive to growth-promoting antibiotics. The study was carried out in the Southwest region of Paraná in the city of Santa Izabel do Oeste in a unit producing termination piglets. The infusion of M. vulgare aerial parts was administered orally daily to newly weaned pigs of both sexes for 28 consecutive days. Thirty male piglets were divided into 5 groups of 6 piglets each. The groups were distributed in group 1 (G1) as a control, where only physiological solution was administered; group 2 (G2) as a positive control, which received clenbuterol at a dose of 0.08 mg/kg; group 3 (G3) which was admnistered *M. vulgare* infusion (IMV) at a concentration of 1% (IMV1); group 4 (G4) which was administered IMV at a concentration of 10% (IMV10); group 5 (G5) which was administered IMV at a concentration of 20% (IMV20). On days zero (0), seven (07), fourteen (14), twenty one (21) and twenty eight (28) the animals were weighed and blood was collected from the jugular vein for hematological and biochemistry analysis. Treatment of animals for 28 days resulted in increases in feed conversion in IMV1 with -12.14 and IMV10 with -12.21 compared to G2. In the same groups, a final weight of 7.35 and 4.03, respectively, was observed in relation to G2. The results showed that the IMV promoted increases in weight growth, weight gain and feed conversion in the relative concentrations of IMV 1 and IMV 10 when compared with

the control group and positive control group. In the same groups, a final weight of 7.35 and 4.03, respectively, was observed in relation to G2. The weight gain was 9 and 9.49 respectively in relation to G2. Standard diterpenoid spectra were obtained from IMV10 chromatograms by mass-coupled high-efficiency ultrasonography (UPLC-MS) and derivatives of these phytoconstituents were also identified in pig plasma, indicating their absorption. Chronic treatment with IMV for 28 days at concentrations 1, 10 and 20 did not cause hematological, biochemical and blood metabolite changes, ruling out the possibility of toxigenic effects at the relative doses tested. From the results of our work we can suggest that the treatment of animals with IMV significantly improved zootechnical parameters such as feed conversion, weight gain and final weight, suggesting a possible phytobiotic activity of *M. vulgare* infusion, without presenting toxigenic effects.

Key words: Phytobiotics. Medicinal plant. Veterinary phytotherapy. Growth promoter. Zootechnical performance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – A *Marrubium vulgare* no seu estado natural em época de floração.....14

Figura 2 - Estrutura molecular do labdano diterpeno marrubiína, marcador fitoquímico das plantas do gênero *Marrubium* sp 15

Figura 3 - Modelo da arquitetura comum de biossíntese de labdano diterpenóides, onde diterpeno sintetases (diTPSs) monofuncionais e diversas P450s são requeridas para a biossíntese de marrubiína na biomassa da *M. vulgare*.....16

Figura 4 - Perfil terpenóide de diferentes órgãos da *M. vulgare*. O mapa de calor mostra a abundância de terpenóides detectados nos órgãos acima do solo e tricomas-tronco da *M. vulgare*. 18

Figura 5 - Método adaptado de contenção dos leitões para facilitar a administração da infusão da *Marrubium vulgare* através de sonda oro-gástrica 22

Figura 6 - Crescimento ponderal dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* em suínos de creche.....28

Figura 7 - Ganho de peso global de suínos em fase de creche tratados com infusão da *M. vulgare* 29

Figura 8 - Índice de conversão alimentar global de suínos em fase de creche tratados com infusão da *M. vulgare* 30

Figura 9 - Eritrócitos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* em suínos de creche. 31

Figura 10 - Hemoglobina dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* em suínos de creche 31

Figura 11 - Hematócrito dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* em suínos de creche 32

Figura 12 - Volume corpuscular médio (VCM) dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* em suínos de creche 33

Figura 13 - Leucócitos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* em suínos de creche 34

Figura 14 - Neutrófilos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* em suínos de creche 35

Figura 15 - Linfócitos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* em suínos de creche 36

Figura 16 - Monócitos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* em suínos de creche 37

Figura 17- Eosinófilos dos animais tratados com a infusão da M. vulgare em suínos de creche..... 37

Tabela 1 - Análise metabolômica de terpenóides através ultracromatografia líquida de alta eficiência acoplada às massas..... 42

Figura 18 - Cromatograma obtido a partir de UPLC–MS, representativo da injeção de plasma de suíno tratado com a infusão da planta a 10% (A), da marrubiína padrão (B) e da infusão de *M. vulgare* (C) 43

Tabela 2 - Resultados de bioquímica enzimática e metabólitos sanguíneos obtidos no sangue de suínos tratados com a infusão da *M. vulgare* ao final do 28º dia de tratamento..... 46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....11
1.1 OBJETIVOS 19
1.1.1 Objetivo geral 19
1.1.2 Objetivos específicos 19
2 MATERIAL E MÉTODOS 20
2.1 PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL 20
2.2 LOCAL EXPERIMENTAL..... 20
2.3 PREPARO DA INFUSÃO DA *M. vulgare* 20
2.4 ANIMAIS 21
2.5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 21
2.6 COLETA DE SANGUE 23
2.7 ANÁLISE HEMATIMÉTRICA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA..... 23
2.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA (CLAE-FR) ACOPLADA À MASSA 24
2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA 25
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 26
3.1 EFEITOS DA INFUSÃO DA *M. vulgare* SOBRE ÍNDICES PRODUTIVOS..... 27
3.2 INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DA INFUSÃO DA *M. vulgare* SOBRE CÉLULAS SANGUÍNEAS.....30
3.3 CONSTITUIÇÃO FITOQUÍMICA DA INFUSÃO DA *M. vulgare* E ATIVIDADES BIOLÓGICAS QUE CONTRIBUEM PARA A AÇÃO FITOBIÓTICA.....39
3.4 INFLUÊNCIA DA INFUSÃO DA *M. vulgare* SOBRE ENZIMAS MARCADORAS DE LESÃO HEPÁTICA, PROTEÍNAS E METABÓLITOS 45
4 CONCLUSÃO 49
REFERÊNCIAS 50

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil se destaca como o quarto maior produtor mundial de suínos e quarto maior exportador de carne suína (MORÉS et al., 2013). O Estado do Paraná tem destaque como o maior rebanho nacional, representando 17,7% do total. A suinocultura vem se tecnificando para atender aos consumidores internos e externos, e com isso, busca-se cada vez mais reduzir os custos. O maior custo é com a alimentação dos animais variando de 67 a 77% do custo total de produção. Com isso, para incrementar os índices de crescimento dos animais por vários anos foram adicionados antibióticos como promotores de crescimento em dietas para leitões pós-desmame (COSTA, TSE e MIYADA, 2007), Mas em 2008, a União Europeia (UE) proibiu o uso de todos os antibióticos como promotores de crescimento em toda a cadeia produtiva (BRUMANO e GATTÁS, 2009) e a restrição do uso de antibióticos em alimentos em muitos países, fez com que a cadeia produtiva da carne brasileira se adaptasse e buscasse alternativas para os suinocultores. Neste contexto, tem ocorrido um interesse crescente no uso de produtos biológicos, incluindo as enzimas, os probióticos, os prebióticos, os simbióticos, os ácidos orgânicos e extratos de plantas ou fitobióticos, como alternativas de aditivos em rações (JACELA et al., 2010).

A utilização de óleos essenciais, extratos vegetais e plantas medicinais para humanos, data de milhares de anos, sendo muito difundida no Egito Antigo, na China, na Índia e na Grécia (KAMEL, 2000b). Uma possível alternativa são as ervas que estão sendo testadas como alternativas em terapias humanas e animais. Estas apresentam efeitos antimicrobianos, antivirais, antioxidante e estimulante imunológico (CLOSE, 2000),

Atualmente, há um crescente interesse em produtos como os extratos de plantas (fitobióticos) como uma alternativa para aditivos na dieta de animais monogástricos. Esses produtos são compostos bioativos naturais derivados de plantas que podem ser incorporados às dietas para promover melhoria no desempenho e no bem-estar de animais.

Segundo Windisch et al. (2008), os fitobióticos são produtos derivados de plantas adicionados aos alimentos que melhoram o desempenho dos animais de produção, e não os produtos vegetais utilizados para fins veterinários no tratamento

de doenças diagnosticadas. Alguns fitobióticos são assim chamados por conter efeitos antimicrobianos. Eles podem ter ação bacteriostática ou bactericida, podem ainda estimular a alimentação através de suas características aromáticas e saborizantes (VALE et al., 2010). Um grande número de plantas e compostos são estudados como promotores de crescimento e várias pesquisas tem demonstrado que esses produtos naturais podem incrementar ganhos na suinocultura industrial. Os fitobióticos representam uma ampla gama de compostos derivados de plantas.

Wenk (2003) relatou que ervas, especiarias e seus extratos podem estimular o apetite e a secreção endógena tais como enzimas e ter atividades antimicrobiana, coccidiostática ou anti-helmíntica em animais monogástricos. Os efeitos dos fitobióticos muitas vezes são mediados indiretamente por metabólitos gerados pela microflora intestinal que usam os compostos bioativos para o seu próprio metabolismo.

O Brasil é um país com um vasto potencial na pesquisa de espécies de plantas, pois possui a mais variada e rica biodiversidade do mundo, distribuído em seis diferentes biomas. Um gênero de plantas que atraíram muito interesse da comunidade científica internacional devido às suas promissoras propriedades químicas e biológicas é o *Marrubium* (Lamiaceae). Esse gênero geralmente consiste de arbustos tropicais, com aproximadamente 40 espécies nativas de regiões temperadas da Europa e Asia, tais como a *Marrubium vulgare* (mais estudada), *M. thessalum*, *M. peregrinum*, *M. cylleneum*, *M. velutinum*, etc. Algumas crescem principalmente no Brasil, tal como a *M. vulgare*, encontrada em áreas de Mata Atlântica e savanas. Diversas espécies são usadas na medicina popular para os mesmos fins terapêuticos.(LODHI et al., 2017).

É uma planta utilizada na medicina popular do meio rural (Figura 1) principalmente sob a forma de chás, com benefícios contra afecções do sistema respiratório e do trato gastrointestinal. Também é usada pela população por suas propriedades estimulantes e antiespasmódicas, indicada para dores de cabeça, diurética, expectorante, digestiva, para hepatopatias e tratamento de resfriados e asma (BALMÉ, 1982; DI VICENZI e MAIALETTI, 1995; LORENZI e MATOS, 2002).

A *M. vulgare*, conhecida mundialmente como *white horehound* (maromba ou marroio no Brasil) é uma planta herbácea perene que pode alcançar de 30 a 100 cm de altura, com galhos cobertos por pelos lanosos (Figura 1). De desenvolvimento arbustivo com uma base ligeiramente arborizada e haste branca com uma seção

quadrangular ou arredondada. Em geral se apresenta ramificada, coberta com pelos simples e estrelados. As folhas de sete centímetros de comprimento por quatro centímetros de largura, são pecioladas, irregularmente dentadas, profundamente sulcado-reticuladas de aspecto crespo, peludas, rugosas com nervos marcados em revés. Possuem pecíolos lanosos, de 0,5 a 3,5 centímetros de comprimento. As inflorescências de *M. vulgare* se desenvolvem desde meados da primavera até meados do outono em forma de verticilos axilares, subglobosos, de mais ou menos 1,5 centímetros de diâmetro, com muitas flores tubulosas com corola bilabiada, de cor branco ou creme, de cinco a oito milímetros de largura, cálice tubular, com seis a doze dentes, de três a sete milímetros de comprimento. Os estames estão incluídos no tubo da corola, os inferiores mais longos, com filamentos muito curtos e estigma bífido. Os frutos têm aspecto de pequenas nozes de contorno oblongo de até 2,5 milímetros de comprimento por 1,5 milímetros de largura, e são de cor parda, pardo grisáceo ou pardo negro.(BALMÉ, 1982).

Pesquisas científicas pré-clínicas com o extrato hidroalcoólico, obtido a partir das partes aéreas da planta demonstraram efeitos biológicos significativos baseados na sua indicação etnofarmacológica. O extrato hidroalcólico da *M. vulgare* apresentou potente ação antiespasmódica contra diversos agonistas contracturantes em preparações de músculos liso intestinal (SCHLEMPER et al., 1996). Além disso, são atribuídas ações multifuncionais muito variadas à *M. vulgare* tais como propriedades analgésica (DE SOUZA et al. 1998, JESUS et al., 2000), protetora gástrica (OLIVEIRA et al., 2011), hepatoprotetor (ELBERRY et al., 2010; ETTAYA et al., 2016), além de outras atividades biológicas importantes terapia adicional para distúrbios digestivos, que envolvem perda de apetite e dispepsia (BLUMENTHAL; GOLDBERG e BRINCKMANN, 2000), anti-hipertensivo (EL BARDAI et al., 2004), antiedematogênico (STULZER et al., 2006), anti-inflamatório (SAHPAZ et al., 2002), inseticida (PAVELA et al., 2004), citoprotetor (MARTIN-NIZARD et al., 2003), como reversor de lesão isquêmica no coração de ratos (GARJANI et al., 2017), antioxidante (WEEL et al., 1999; MATKOWSKI e PIOTROWSKA, 2006), antimicrobiana (MASOODI et al., 2008; ZARAI et al., 2011), antidiabética (VILLANUEVA, ESTEBAN e VILLANUEVA, 2017), efeito inseticida (PAVELA et al., 2004), antiplasmodial (RAMOS-GUERRA et al., 2007) e efeito citoprotetor (MARTIN-NIZARD et al., 2003), dentre outras (LODHI et al., 2017).

Figura 1. A planta *Marrubium vulgare* no seu estado natural em época de floração. Em cima no canto direito da imagem o detalhe das folhas pilosas.

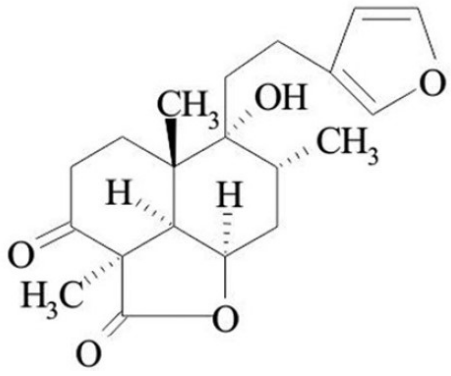


Fonte: Acervo particular.

O gênero *Marrubium* sp. é conhecido por produzir muitos diterpenóides como a marrubiína (Figura 2), identificada em 1842, a qual foi o primeiro diterpenóide a ser isolado e caracterizado das folhas da *M. vulgare (*APPLETON et al., 1967; HENDERSON e MCCRINDLE, 1969). A marrubiína já foi isolada da *M. vulgare* com 0,8% das partes aéreas secas da planta onde é produzida e acumulada (PICCOLI e BOTTINI, 2008; APPLETON et al., 1967). As maiores quantidades foram encontradas nas folhas e flores e até 4 mg de furano labdano diterpenos por grama de peso fresco foram encontradas (PICCOLI e BOTTINI, 2008).

Os diterpenóides das plantas são produzidos do difosfato geranil-geranil através de rotas modulares com diferentes combinações de diterpeno sintetases (diTPSs), monooxigenases dependentes de citocromo P450 e várias outras enzimas que aumentam a diversidade estrutural. O grande grupo de lábdano relacionado a diterpenóides em plantas angiospermas é formado por pares de diterpeno-sintetases da classe I e II (Figura 3). Além disso, várias modificações da marrubiína ou vias intremediárias podem incrementar a descoberta de outros dipeterpenóides relacionados à *Marrubium* sp.

Figura 2. Estrutura molecular do labdano diterpeno marrubiína marcador fitoquímico das plantas do gênero *Marrubium* sp.

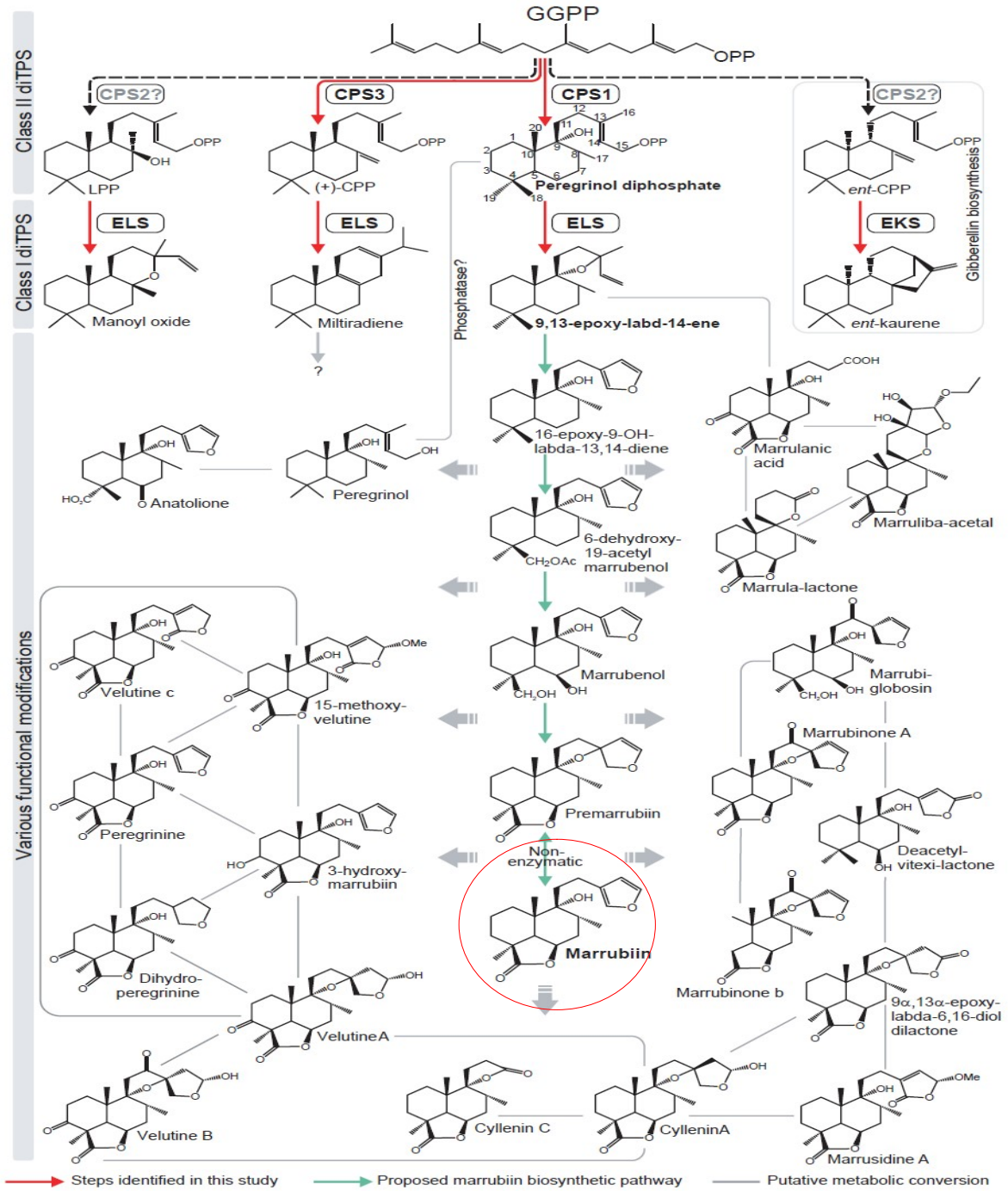


Fonte: LODHI et al., 2017

A expressão combinatória das diterpeno sintetases (diTPSs) da *M. vulgare* ilustra oportunidades para a engenharia metabólica e plataformas biológicas sintéticas para a marrubiína e outros diterpenos fitoterapêuticos. Estudos recentes sobre acumulação de marrubiína sugerem que este composto fitoquímico é um produto estável e com pouco catabolismo, o qual é uma boa prerrogativa de uso para compostos terapêuticos e nutracêuticos de importância econômica (PICCOLI e BOTTINI, 2008).

É importante frisar que a marrubiína é gerada como um artefato do composto natural pré-marrubiína, durante métodos de extração que utilizam o processo de aquecimento para a concentração de extratos brutos (Figura 3) (HENDERSON e McCRINDLE, 1969). Considerando que a planta inteira é usada em fitopraparações de chá foi observado que a marrubiína é sempre produzida ao invés de pré-marrubiína (RODRIGUES et al., 1998). Em relação à composição fitoquímica mais completa, as plantas deste gênero produzem uma grande variedade de compostos pertencentes a grupamentos fitoquímicos de natureza diversa principalmente diterpenos, polifenóis, esteróides, lactonas, fenilpropanóides, flavonóides, taninos, açúcares e vitamina C, alguns dos quais tem importantes propriedades biológicas (CAPECKA, MARECZEK e LEJA, 2005; MANDAL, DIAS e FRANCO, 2017).

Figura 3. Modelo da arquitetura comum de biossíntese de labdano diterpenóides, onde diterpeno sintetases (diTPSs) monofuncionais e diversas P450s são requeridas para a biossíntese de marrubiína na biomassa da *M. vulgare*. Usando estruturas conhecidas foi descrita a caracterização funcional de quatro diferentes diTPSs na *M. vulgare*, que produzem diterpenóides intermediários especializados C–9 oxygenados identificadosem todo o gênero *Marrubium* sp.

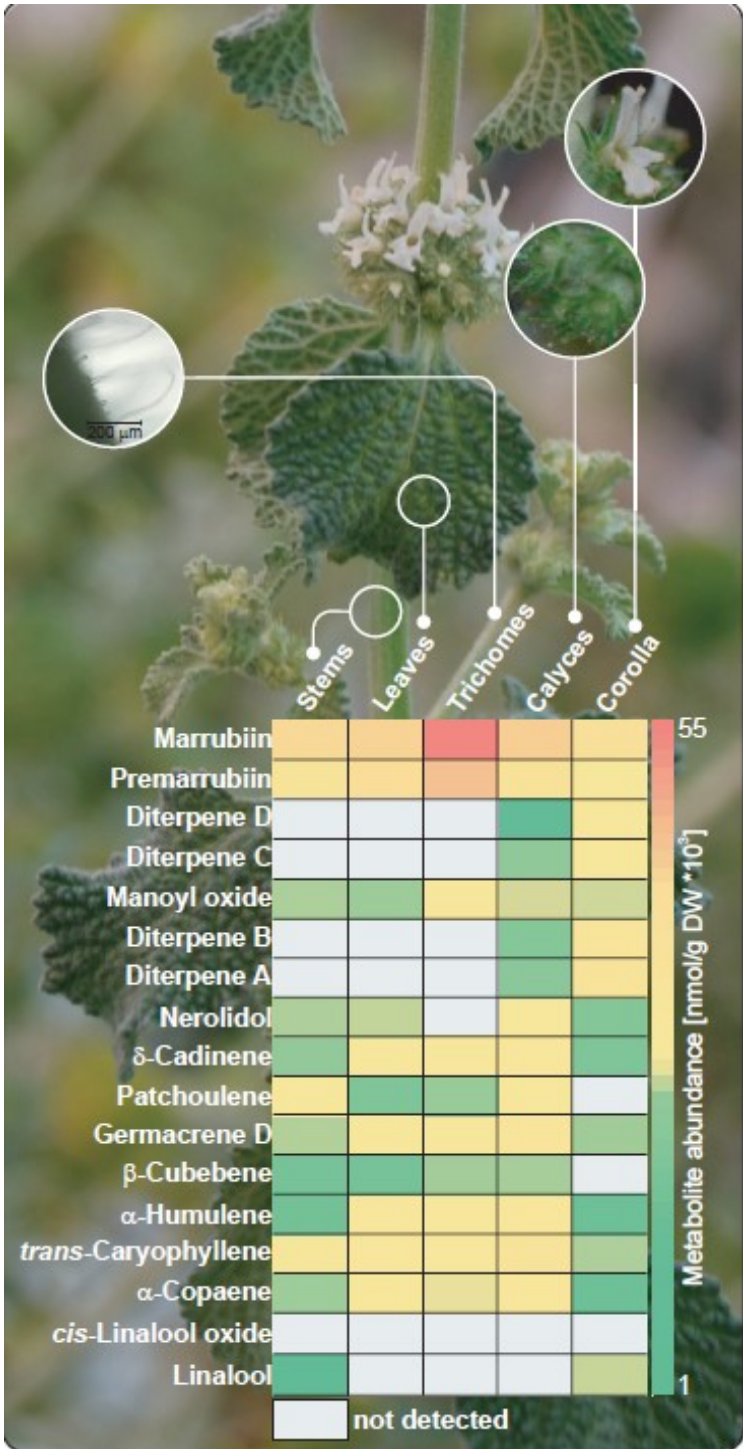


.Fonte: ZERBE et al., 2014.

Além dos diterpenos aparentados da marrubiína alguns compostos isolados da *M. vulgare* foram a apigenina e análogos, luteolina e análogos, crisoeriol, quercetina 3-*O*-β-L-ramnosil-glucoside, isoquercitrina, ácido ursólico, ácido gálico, ácido cafeico, cafeoil maleico, vulgarol, vulgarina, β-sitosterol, stigmasterol, vitexina, acteosido, forsitosido B, arenariosido, ballotetrosido, marrubosido, acetil marrubosido, pré–marrubiina, marrubenol, fenilpropanóide esters e monoterpenos, todos com histórico de atividade biológica (NAWWAR et al., 1989; AMER, 1993; SAHPAZ et al., 2002).

Foi estabelecida a distribuição espacial de diterpenóides na *M. vulgare,* com perfis que variaram entre os extratos de raiz, folhas, caules e seus tricomas, cálices da flor e corolas (Figura 4). Estudos anteriores bastante consistentes (KNÖSS e ZAPP, 1997; BELHATTAB e LAROUS, 2006), foram encontrados apenas terpenóides nos tecidos acima citados, com a marrubiína sendo o mais abundante terpenóide nos cálices, folhas e tricomas (ZERBE et al., 2014) e também pré-marrubiína, o metabólito com padrão de distribuição espacial similar mas contendo uma ponte 9,13–epoxi ao invés do grupo C–9 hidroxi presente na marrubiína (Figura 2). A pré-marrubiina tem um padrão de fragmentação de massa muito próximo à da marrubiína e converte para marrubiína por aquecimento (HENDERSON e McCRINDLE,1969). Outros diterpenóides compreendem óxido manoil, abundante em tricomas e quatro diterpenos (A a D) exclusivamente detectados nas flores com uma grande abundância no tecido da corola. O espectro desses diterpenos A – D mostrou uma similaridade significante com o peregrinol (labda-13-en-9-ol), sugerindo a estrutura diterpeno tipo labdano com uma funcionalidade de oxigênio no carbono C–9, característico para a marrubiína e muitos dos diterpenóides especializados no Gênero *Marrubium* sp (ZERBE et al., 2014).

Figura 4. Perfil terpenóide de diferentes órgãos da *Marrubium vulgare*. O mapa de calor mostra a abundância de terpenóides detectados nos órgãos acima do solo e tricomas-tronco da *M. vulgare*. Os metabólitos foram isolados de tecidos moídos por extração de pentano e identificados por análise GC-MS e comparação com marrubiina autêntica e em bancos de dados de espectro de massa de referência (Wiley W9N08L). A quantificação foi baseada no 1-eicoseno como padrão interno (n. 3).



Fonte: ZERBE et al., 2014.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade fitobiótica da infusão da *Marrubium vulgare* sobre parâmetros produtivos em leitões recém-desmamados.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Mensurar índices produtivos, tais como, desenvolvimento ponderal, ganho de peso e conversão alimentar em suínos jovens submetidos à administração da infusão da *M. vulgare;*

- Investigar possíveis efeitos toxigênicos através dos exames clínico, hematológico e bioquímico em leitões recém desmamados submetidos à administração crônica da infusão da *M. vulgare*.

- Verificar a metabolômica da infusão da planta e do plasma dos animais que receberam o tratamento contínuo com a infusão da *M. vulgare*;

- Identificar a absorção de fitoconstituintes presentes na planta e que poderiam estar associados à promoção da atividade fitobiótica induzida pela administração da infusão da *M. vulgare.*

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRINCÍPIOS ÉTICOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Os experimentos foram efetuados segundo os princípios éticos básicos do bem-estar animal da Lei 11.794/2008 (Lei Arouca), estando em acordo com a aprovação e institucionalização deste trabalho na Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza – PR e todos os procedimentos realizados com os animais estando de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), submetido à Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFFS sob protocolo de aprovação nº 23205.001521/2018-11. Sendo assim os suínos em experimento não tiveram alterações no ambiente, sofrendo o mínimo de estresse nos momentos de manejo e administração da infusão.

2.2 LOCAL EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado em uma UPL na cidade de Santa Izabel do Oeste/PR, no período da primavera, onde as temperaturas são mais amenas, evitando que oscilações intensas da temperatura interferissem nos resultados obtidos. Os animais foram locados em uma sala, que é constituída por 6 creches, onde eles permaneceram em somente uma. Cada creche tinha a dimensão de 3,5 x 2,9 metros, sendo que a densidade de animais foi igual a utilizada habitualmente na granja, que é de 3 animais/m^2, que é a densidade indicada para o bem-estar animal dessa espécie e idade. Desta maneira o experimento não alterou a densidade comumente utilizada na criação industrial de suínos. Os leitões receberam água e ração *ad libitum*, sendo que a ração administrada foi a mesma utilizada na propriedade, sendo esta, fabricada na granja. A ração administrada foi pesada em quilos, para obter a índice conversão alimentar global (CAG) de cada grupo.

2.3 PREPARO DA INFUSÃO DA *M. vulgare*

No preparo da infusão da *M. vulgare* (IMV) as partes aéreas foram coletadas e posteriormente levadas ao laboratório de Farmacologia e Terapêutica da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, Campus Realeza- PR. O material

botânico obtido foi submetido à desidratação em forno a uma temperatura de 55ºC durante 2 dias, sendo que após esse processo a planta foi triturada no moinho de facas em partículas inferiores a 1 mm e embalada à vácuo em sacos plásticos devidamente pesados e identificados. Posteriormente esse material processado foi congelado à temperatura de ⁻10 ± 2ºC, até o dia da preparação da infusão. Em cada dia dos experimentos foi colocado o material botânico processado da planta em infusão com água na temperatura de 100ºC e deixado em repouso por 20 minutos para a extração dos princípios ativos da planta. Em seguida a infusão foi filtrada e deixada esfriar a temperatura ambiente e assim administrada aos animais diariamente.

2.4 ANIMAIS

Foram utilizados 60 leitões machos de uma linhagem *Large White*, raça comercial comumente utilizada na propriedade, recém-desmamados, com peso médio de 7,5 kg, distribuídos aleatoriamente em cinco grupos de seis animais cada e devidamente brincados para facilitar a identificação (Figura 5A). Os animais foram imobilizados em um dispositivo de contensão adaptado para aplicação das soluções através de sonda oro-gástrica plástica conectada a frasco plástico de 100 mL de capacidade (Figura 5B). No grupo 1 ou controle negativo, foi administrado solução fisiológica; no Grupo 2, controle positivo, foi administrada a solução de clembuterol na dose de 0,08 mg/kg; no Grupo 3 foi administrada a IMV na concentração de 1% (IMV1); no Grupo 4 foi administrada a IMV na concentração de 10% (IMV10) e no Grupo 5 foi administrada a IMV na concentração de 20% (IMV20).

2.5 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O estudo foi realizado durante 28 dias, sendo que nos dias zero (0), sete (07), quatorze (14), vinte e um (21) e vinte e oito (28) os animais foram pesados todos no mesmo horário para obtenção dos resultados de crescimento ponderal (crescimento dos leitões em função do tempo, em quilos) e o ganho de peso (peso final menos o peso inicial, em quilos). Para a análise e cálculo do índice de conversão alimentar (ICA) global (ração consumida em quilos, dividido pelo ganho de peso dos animais, em quilos) foi descontada ao final do experimento, conforme a fórmula:

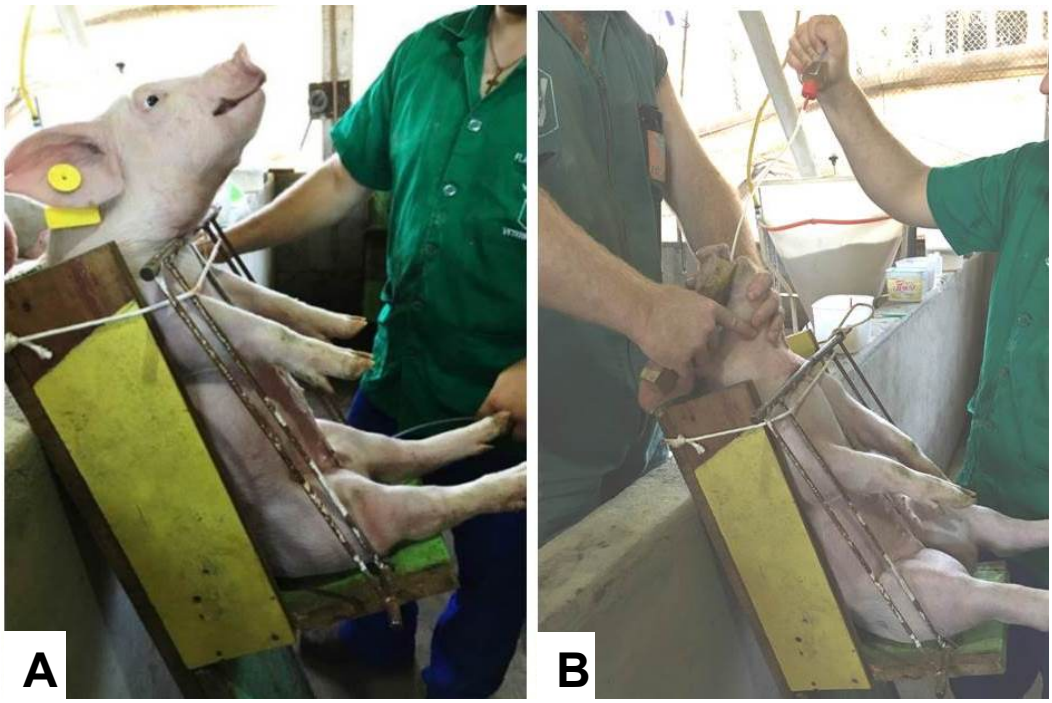
$$ICA = \frac{CR}{GP}$$

Onde: **ICA** = Índice de conversão alimentar

CR = Consumo de ração

GP = Ganho de peso

Figura 5. Método adaptado de contenção dos leitões (5A) para facilitar a administração da infusão da *Marrubium vulgare* através de sonda oro-gástrica (5B).



Fonte: Acervo do autor.

Todos os animais receberam a dose relativa equivalente a 1% do seu peso vivo, que foi recalculada semanalmente nos dias de coleta, tendo sido feita a administração através de sondagem oro-gástrica em temperatura ambiente (Figuras 5A e 5B). Nos dias zero, 7, 14, 21 e 28 os animais foram pesados individualmente e foi realizada coleta sanguínea para posterior avaliação hematológica e bioquímica, sempre sendo realizadas cerca de 30 minutos após a administração da infusão.

Toda a ração fornecida aos animais foi pesada para mensurar o ganho de peso. A água foi fornecida *ad libitum* e retirada 30 minutos antes da administração da infusão, para evitar sobrecarga gástrica.

2.6 COLETA DE SANGUE

Nas coletas de amostras de sangue dos animais foram utilizados agulha hipodérmica 40 x 12 mm conectadas a tubos de coleta a vácuo de cinco mL de capacidade, com venóclise da veia jugular externa. Os tubos sem anticoagulante foram usados para separação do soro, sendo utilizado para análises hematológicas e séries bioquímicas. No dia 28 foi coletado também um tubo contendo anticoagulante que foi utilizado para obtenção do plasma sanguíneo. Plasma esse que foi encaminhado para a realização do teste de ultracromatografia líquida de alta eficiência acoplada às massas (UPL-MS), realizado no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, para identificar a presença do diterpeno marcador marrubiína ou moléculas correlatas que porventura foram absorvidas para plasma dos suínos a partir da mucosa gastrointestinal.

Após as coletas, o sangue foi levado até o laboratório da UFFS onde foi centrifugado a 3000 rpm por um tempo de 10 minutos, para a separação do soro e plasma. O plasma e o soro foram pipetados com micropipeta automática e colocado em tubos *eppendorf* devidamente identificados e lacrados com parafilme, sendo levados ao ultrafreezer, permanecendo congelados à uma temperatura de -80ºC, até o descongelamento natural para serem processados e realizados os testes. O hemograma foi realizado pelo laboratório de análises químicas Vilson, sediado na cidade de Ampére, PR.

2.7 ANÁLISE HEMATIMÉTRICA E BIOQUÍMICA SANGUÍNEA

Para realização dos exames hematológicos e bioquímicos dos suínos foram obtidas amostras sanguíneas através da punção da veia jugular, sendo que para realização do hemograma foram coletados cinco mL de sangue em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 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.

Conforme o mesmo autor, 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.

As amostras de soro obtidas sem a adição de EDTA 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-glutamiltransferase (GGT) e alanina-aminotransferase (ALT), 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, HARVEY e BRUSS, 2008).

2.8 ULTRACROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA (UCLAE-FR) ACOPLADA À MASSA

Para identificar a presença do diterpeno marcador marrubiína ou moléculas correlatas no plasma dos suínos, foram realizados experimentos de metabolômica na infusão da *M. vulgare* e no plasma dos animais. As análises por UCLAE em fase reversa da infusão foram realizadas de acordo com o método descrito por Francisco e Ressurrecion (2009), com algumas modificações. Dez microlitros de cada amostra foram injetados em um cromatógrafo líquido acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos e coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula

de cinco milímetros. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (0,1%, v/v) (solvente A) e acetonitrila/ácido acético (0,1% v/v) (solvente B), com vazão constante de 1 mL/min. O gradiente iniciou com 5% do solvente B até 7% de B em sete minutos, 17% de B em 75 minutos, 45% de B em 110 minutos, 70% de B em 117 minutos, 100% de B em 124 minutos e 5% de B em 129 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30^{o}C e os cromatogramas processados através de software específico. Os compostos foram identificados pela comparação do tempo de retenção e pelo espectro de absorção na região ultravioleta, utcincolizando padrões autênticos de compostos fitoquímicos. Neste trabalho, foram utilizados padrões autênticos de marrubiína, ácido gálico, ácido *trans-cinâmico,* ácido vanílico, ácido elágico, ácido salicílico, rutina, quercetina, ácido cafeico, ácido cumárico, epigalocatequina, catequina, epicatequina, epigalocatequina galato.

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de cada grupo coletado foram ordenados como média mais ou menos o erro padrão das médias (E.P.M.). Para verificar possíveis diferenças estatísticas foi realizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias e confirmados pelos pós-testes de Dunnet ou Neuman-Keuls quando necessário, levando em conta dados que ultrapassaram a normalidade do teste. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando ultrapassaram o valor de $P < 0,05$ ou menos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fitobióticos são compostos bioativos naturais derivados de plantas que podem ser Eles representam um grande rol de compostos derivados de planta. Wenk (2003) relatou que ervas temperos e seus extratos podem estimular o apetite e as secreções endógenas tais como enzimas ou ter atividade antimicrobiana, coccidiostática ou anti-helmíntica em animais monogástricos.

Nossos resultados corroboram e extendem os estudos sobre o potencial fitogênico da *M. vulgare*, que iniciaram recentemente com frangos de corte (SCHLEMPER et al., 2019) e que agora foram direcionados a uma diferente espécie de mamífero monogástrico como o suíno. Da mesma maneira que na avicultura intensiva, na suinocultura qualquer substância que promova pequenos incrementos nos índices zootécnicos pode representar uma economia ou lucros de alguns milhares de dólares quando possui reflexos no ganho de peso e melhoria na conversão alimentar de um número grande de animais confinado em galpões.

Inicialmente, podemos inferir que pela primeira vez foi avaliada a toxicidade da infusão da *M. vulgare* nas doses relativas aqui utilizadas e aplicadas numa espécie de criação intensiva como os suínos. A administração crônica da infusão da *M. vulgare* não promoveu alterações deletérias dos parâmetros clínicos fisiológicos, os quais rigorosamente foram avaliados. Não foram observados sinais de diarréia, coprostase, estados febris, inapetência e anorexia em nenhum momento no decorrer dos experimentos. Digno de menção e factualmente não levantado de forma precisa em nossa 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, evidente em relação ao grupo controle colateral (dados não demonstrados). Também é digno de nota que o consumo de ração comercial e água potável foram progressivos e acompanhados de maior ganho de peso dos animais 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 infeciosa, em maior ou 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 tratados. Não foram observadas alterações no estado geral tais como estados febris ou o seu oposto, estados hipotérmicos, bem como não foram identificados sintomas como taquicardia, bradicardia, taquipnéia ou bradipnéia, aumento ou redução do transito intestinal, alteração na coloração de mucosas, dentre outros parâmetros de higidez e saúde.

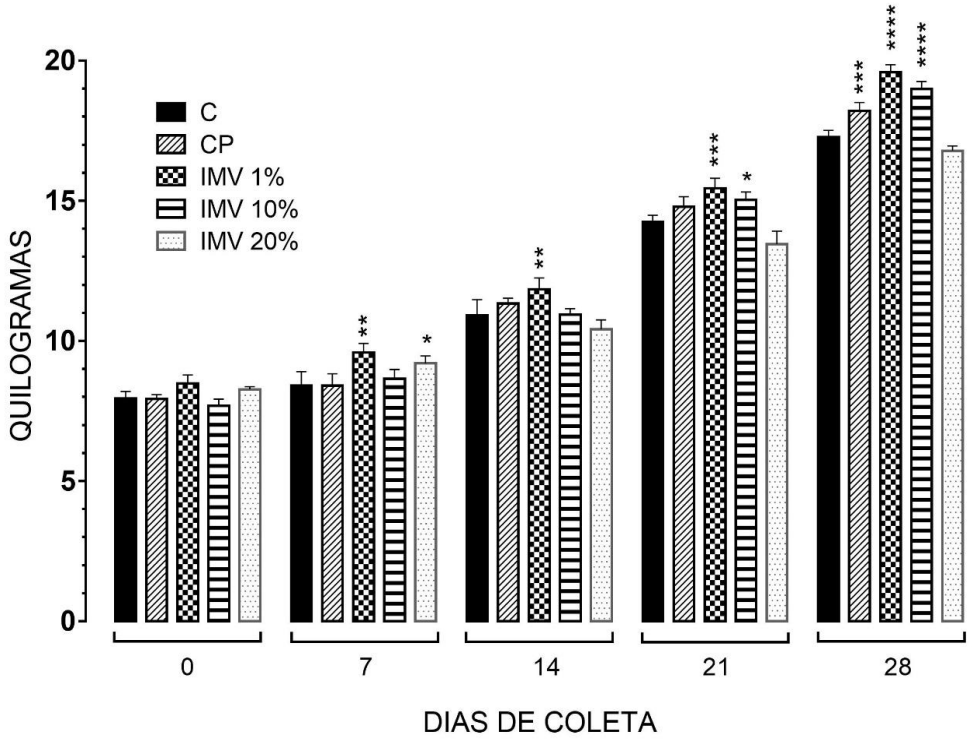
3.1 EFEITOS DA INFUSÃO DA *M. vulgare* SOBRE ÍNDICES PRODUTIVOS

Com relação ao crescimento ponderal podemos observar que houve incremento no peso dos animais em função do tempo (Figura 6) (peso ajustado). O grupo dos indivíduos tratados com IMV 1%, IMV 10% e IMV 20% apresentaram aumentos de 15,2 ± 0,56%, 4 ± 0,7% e 11,4 ± 0,35% em relação ao grupo controle respectivamente, com significância ($P < 0,01$ Dunnett) a partir do sétimo dia de tratamento. Na mesma data, apesar do grupo IMV 10% apresentar aumento de em relação ao grupo controle, houve um menor grau de significância ($P < 0,05$ Dunnett). A partir do dia 14 foram observadas maiores variações dos pesos dos animais, sendo mais significantes aqueles tratados com IMV 1%, com um aumento 11,4 ± 0,99% com significância ($P < 0,01$ Dunnett) em relação ao grupo controle, e um aumento de 6,15 ± 1,73% em relação ao grupo controle positivo. Na mesma coleta, o grupo IMV 10% obteve um aumento de 3,15 ± 0,03% em relação ao grupo controle e observou-se um valor inferior ao grupo controle positivo (-2 ± 0,92%). A concentração IMV 20% apresentou um decréscimo de -1,62± 1,15% e -6,54 ± 2,03% em relação grupo controle e o grupo controle positivo, respectivamente. Com 21 dias de experimento, a concentração IMV 1% apresentou um aumento de 9,18 ± 1,19% e 6,3 ± 0,36% quando comparados com o grupo controle (com significância $P < 0,001$ Dunnett) e o grupo controle positivo, respectivamente. O grupo IMV 10% apresentou um aumento de 6,25 ± 0,92% com significância ($P < 0,05$ Dunnett) em relação ao grupo controle e um aumento de 3,45 ± 0,58% em relação ao grupo controle positivo. Já o grupo IMV 20% que obteve um decréscimo de -4,87 ± 2,25% e -7,41 ± 0,86% com relação ao grupo controle e ao grupo controle positivo, respectivamente. Assim, ao final do período de tratamento (28 dias), o perfil dos resultados permaneceu semelhante aqueles da semana anterior. Os animais tratados com IMV 1% e IMV 10% promoveram ganho de peso superior em relação ao grupo controle ($P < 0,0001$ Dunnett), com resultados de 42,95 ± 5,35% e 26,35 ±

9,94%, respectivamente. Os resultados dessas duas concentrações superaram o controle positivo ao fim do protocolo experimental, com incrementos de 21,65 ± 11,52% e 17,35 ± 8,17%, respectivamente. Entretanto, o grupo IMV 20% apresentou um decréscimo de -3,06 ± 0,26 e -6,27 ± 0,17% com relação ao grupo controle e ao grupo controle positivo, respectivamente.

O motivo pelo qual as concentrações maiores apresentaram um ganho de peso inferior às concentrações menores carece de uma explicação plausível, mas o fato é que o desempenho foi semelhante ao grupo controle. Vários fatores, na suinocultura podem influenciar negativamente nos resultados zootécnicos ao longo de um determinado período dependendo da sua sazonalidade, oscilações na imunidade e temperatura, ventilação e correntes de ar (manejo de cortinas) (KUMMER et al., 2009).

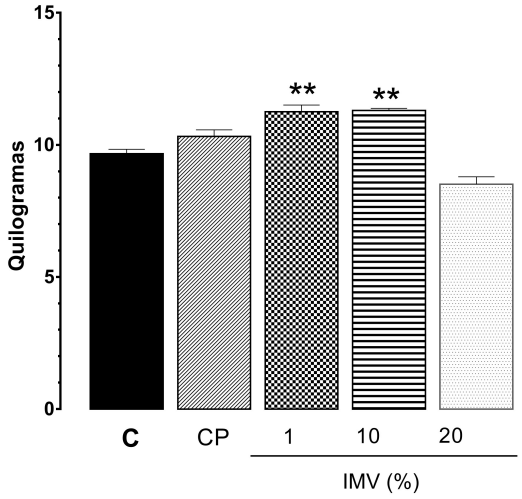
Figura 6. Crescimento ponderal dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* (IMV) em suínos de creche. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais representa o E.P.M. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001; **** P < 0,0001; consideradas estatisticamente significantes.



Fonte:Elaborado pelo autor

Em relação ao ganho de peso (peso final menos peso inicial) ao longo do experimento, foi observado que o tratamento dos animais de forma crônica com a IMV 1% e IMV 10% promoveram incrementos (P < 0,01) importantes nesse índice em relação ao grupo controle (Figura 7). As percentagens de ganho de peso foram de 15,76 ± 2,7% e 13,86 ± 1,39%, para as concentrações de IMV 1% e IMV 10%, respectivamente. Paradoxalmente, a maior concentração testada nos animais, apresentou valores inferiores com relação ao grupo controle (-14,25 ± 1,31%). O resultado dessa variável não surpreende, haja vista que existe a relação direta com o parâmetro de peso ponderal.

Figura 7. Ganho de peso global de suínos em fase de creche tratados com infusão da *M. vulgare* (IMV). Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais representa o E.P.M. ** P < 0,01 no teste de Dunnet, considerados estatisticamente significantes.

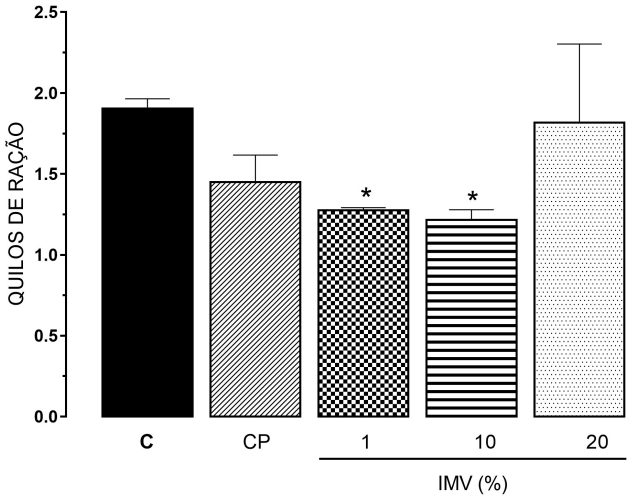


Fonte:Elaborado pelo autor

Quando analisado o índice de conversão alimentar global (CAG) (NÉVOA et al, 2013) (Figura 8) foi observado que houve uma tendência de redução, porém não significativa na redução da conversão alimentar relativa, tanto em relação ao controle negativo quanto em relação ao controle positivo nas contrações de IMV 1% (CAG= 1,277) e IMV 10% (CAG= 1,273) com inibições máximas de 34,49 ± 15,44% e 35,09 ± 14,68%, respectivamente. Novamente, o grupo IMV 20% apresentou um resultado oposto as menores concentrações, com aumento da conversão alimentar com valores de 14,45 ± 5,65% (CAG= 1,817). Esse índice se mostra de suma importância, pois os custos com nutrição chegam a 77%, conforme apregoa a

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2016), e dessa forma, quanto menor a CAG, melhor para a suinocultura industrial.

Figura 8. Índice de conversão alimentar global (CAG) de suínos em fase de creche tratados com infusão da *M. vulgare* (IMV). Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M. * P < 0,05 no teste de Dunnet, considerados estatisticamente significantes.



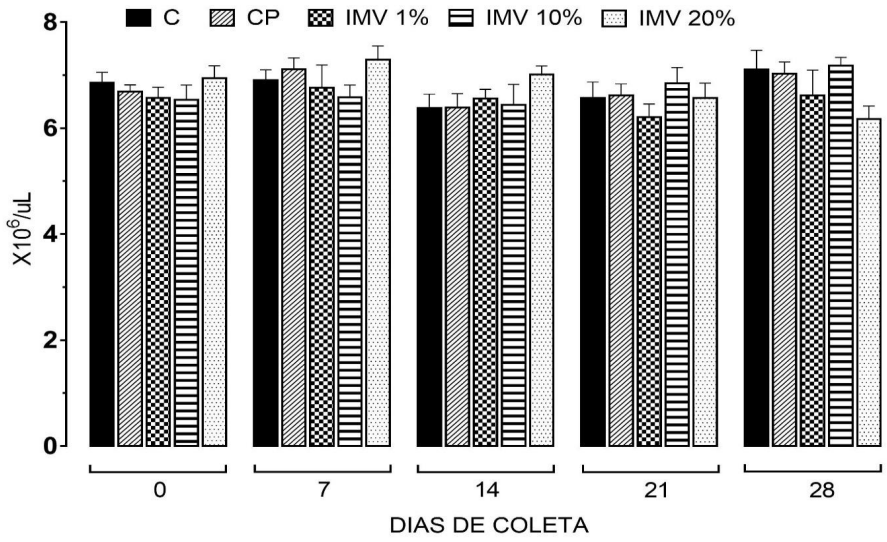
Fonte: Elaborado pelo autor

3.2 INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO DA INFUSÃO DA *M. vulgare* SOBRE CÉLULAS SANGUÍNEAS

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 e os animais não deram indicativos de estados anêmicos, icterícia ou mesmo hemoglobinúria em qualquer período do experimento.

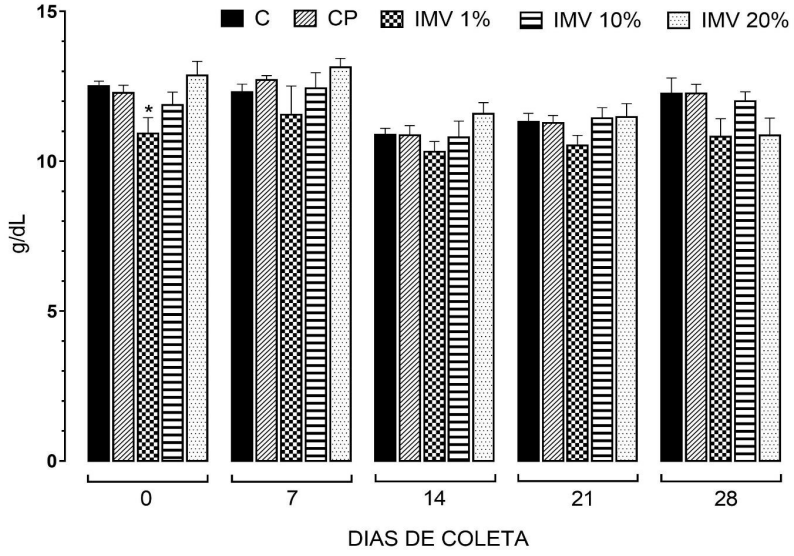
Para analisar possíveis efeitos da administração crônica da IMV observamos que em relação aos eritrócitos (Figura 9) e consequentemente à hemoglobina total (Figura 10), todos os resultados observados ficaram dentro dos valores de referência. No dia 28 da pesquisa, os grupos IMV 1%, IMV 10% e IMV 20% tiverem decréscimo virtual de eritrócitos de -10,78 ± 1,86%, -6,68 ± 0,87% e -19,62 ± 1,45% em relação ao grupo controle, respectivamente. Quando comparamos com o grupo controle positivo, os grupos IMV 1%, IMV 10% e IMV 20% tiverem decréscimo de -5,93 ± 2,08%, -1,07 ± 2,08% e -15,22 ± 1,98%, respectivamente.

Figura 9. Eritrócitos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* (IMV) em suínos de creche. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M. *P < 0,05; consideradas estatisticamente significantes.



Fonte: Elaborado pelo autor

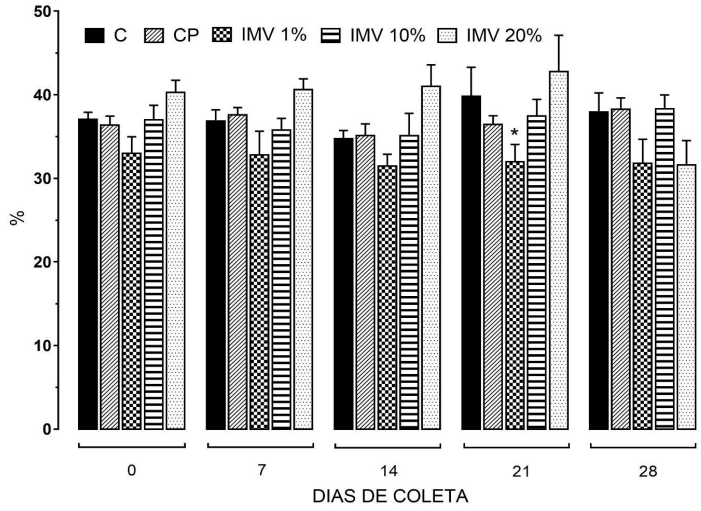
Figura 10. Hemoglobina dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* (IMV) em suínos de creche. As barras representam a média de seis animais e as linhas verticais representam os E.P.M.



Fonte: Elaborado pelo autor

Quando analisado o conteúdo de hemoglobina (Figura 10), como também esperado, os resultados estavam dentro dos valores de referência (LUZ et al., 2017). No dia 28 do experimento, os grupos IMV 1%, IMV 10% e IMV 20% tiveram um decréscimo de -14,1 ± 1,12%, -6,79 ± 0,97% e -14,63 ± 1,66% em relação ao grupo controle, respectivamente. Valores de hematócrito (Figura 11), apresentaram-se ao longo do trabalho, normais, com exceção do grupo IMV 1%, que obteve nos dias 0 (zero) e sete, valor médio igual a 32 (limite inferior do valor de referência (BROCKUS et al., 2005), mas nos dias 14, 21 e 28, obteve valor médio igual a 31, abaixo do limite. Quando comparado com os grupos controle e controle positivo, o grupo IMV 1% obteve valores -11,44 ± 1,8% e -8,8 ± 2,8%, respectivamente. Mesmo dentro dos valores de referência, os grupos IMV 10% e IMV 20% apresentaram valores inferiores aos grupos controle e controle positivo, sendo eles IMV 10% -5,87 ± 1,53% e -3,17 ± 0,5% e IMV 20% -12,41 ± 2,41 e -10,08 ± 3,67%, respectivamente.

Figura 11. Hematócrito dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* (IMV) em suínos de creche. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M. *P<0,05; consideradas estatisticamente significantes.

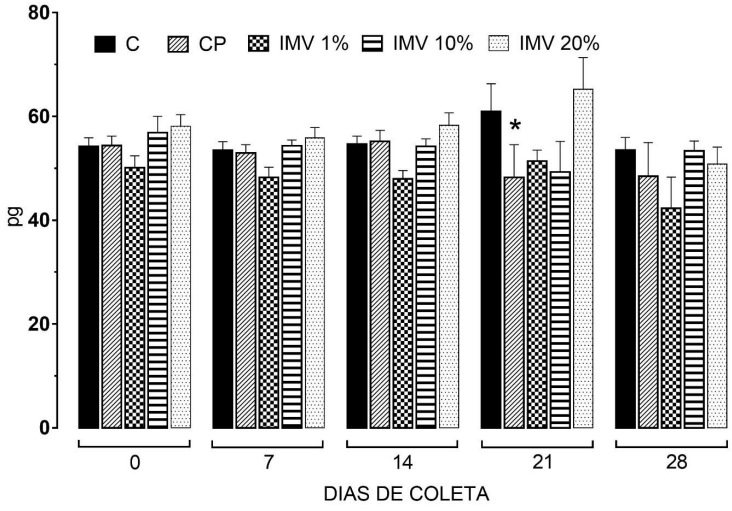


Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação ao VCM (volume corpuscular médio), foi observado (Figura 12) no dia 28 da pesquisa que nos grupos tratados com IMV 1%, IMV 10% e IMV 20% obtiveram valor menor que no grupo controle, em -10,78 ± 0,84%, -5,02 ± 0,19 e -

0,77 ± 1,45%, respectivamente. Os resultados -9,5 ± 1,35%, -3,64 ± 1,26% e -1,6 ± 1,3% foram obtidos quando comparado os grupos IMV 1%, IMV 10% e IMV 20% com o grupo controle positivo, respectivamente. É importante destacar que o grupo controle positivo obteve valor abaixo da referência no dia 14, enquanto o grupo IMV 1% obteve lavores inferiores aos de referência nos dias 7, 14 e 28, sendo que este último dia ficou 16% abaixo do limite inferior dos valores de referência, mas sem significância estatística.

Figura 12 - Volume corpuscular médio (VCM) dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* (IMV) em suínos de creche. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M. *P < 0,05; consideradas estatisticamente significantes.

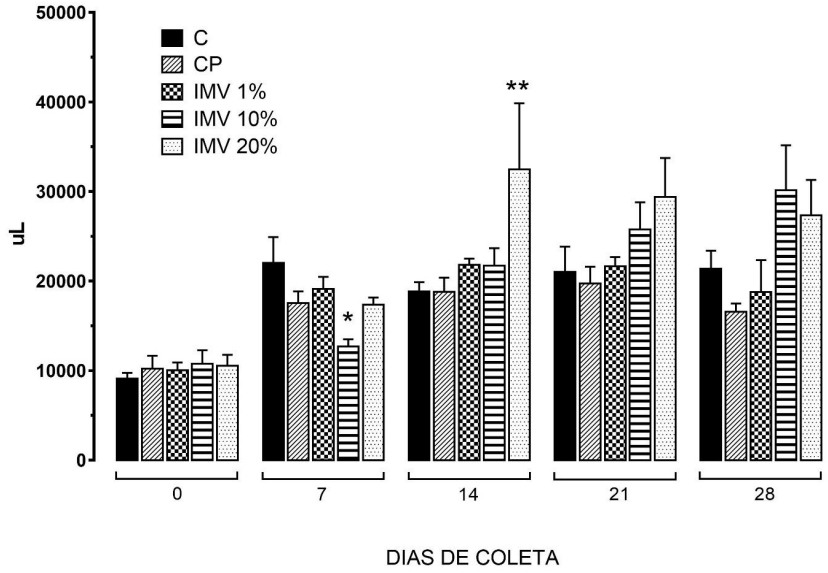


Fonte: Elaborado pelo autor

Quando analisada a influência da administração crônica da IMV sobre os leucócitos (Figura 13), dados do 28º dia de estudo, os resultados observados que o grupo IMV 1% teve um decréscimo de -12,03 ± 3,57% em relação ao grupo controle e um acréscimo de 13,47 ± 3,57% em relação ao grupo controle positivo. Já os grupos IMV 10% e IMV 20% obtiveram acréscimos de 41,26 ± 5,01% e 28,24 ± 3,9% em relação ao grupo controle, respectivamente. Em relação ao grupo controle positivo os grupos IMV 10% e IMV 20% tiveram um acréscimo de 82,23 ± 5,01% e 65,38 ± 3,9%, respectivamente. Salienta-se que nos dias 14, 21 e 28 de estudo o grupo IMV 20% ultrapassou o limite máximo do valor de referência, e nos dias 21 e

28 da pesquisa o grupo IMV 10% também extrapolou o valor máximo de referência. Os outros valores se mantiveram dentro dos valores de referência.

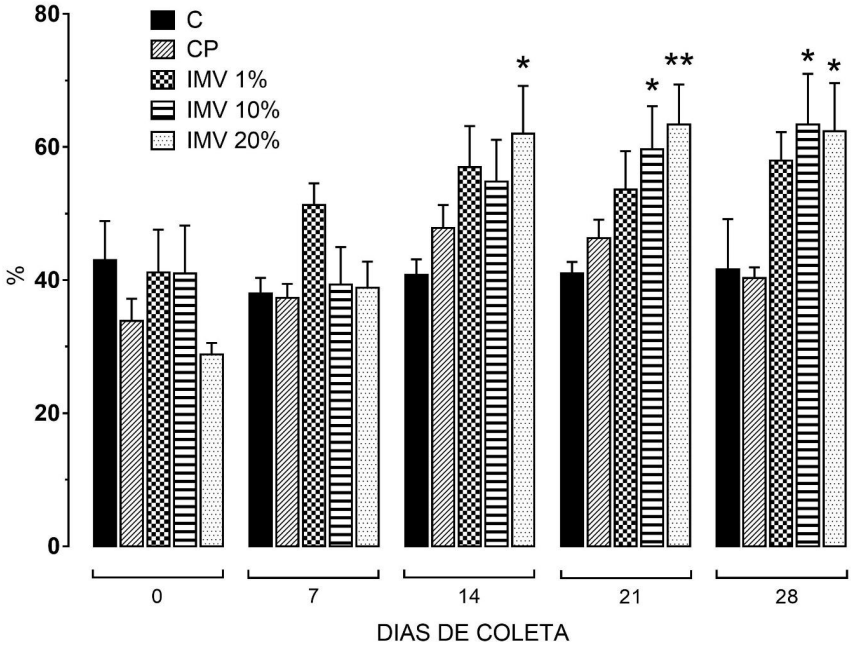
Figura 13 - Leucócitos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* (IMV) em suínos de creche. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M. *P < 0,05; **P < 0,01 consideradas estatisticamente significantes.



Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação aos neutrófilos (Figura 14), os grupos tratados com IMV 1%, IMV 10% e IMV 20% obtiveram um incremento de 39,22 ± 4,24%, 52,18 ± 7,6% (com significância P < 0,05 Dunnett) e 49,78 ± 7,22% (com significância P < 0,05 Dunnett) em relação ao grupo controle, respectivamente. Os mesmos grupos quando comparados com o grupo controle positivo, resultaram num acréscimo de 43,81 ± 4,24%, 57,2 ± 7,6% e 54,72 ± 7,22%, respectivamente. O grupo IMV 1% no dia 7 da pesquisa ultrapassou o limite máximo do valor de referência. Além disso, os grupos IMV 1%, IMV 10% e IMV 20% obtiveram nos dias 21 e 28 do experimento números superiores ao valor de referência.

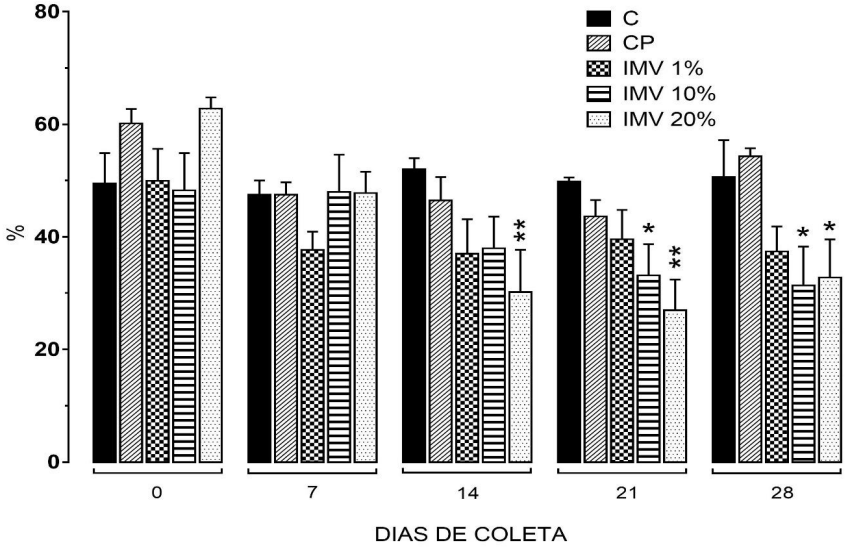
Figura 14. Neutrófilos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* (IMV) em suínos de creche. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M. *P<0,05; **P< 0,01 consideradas estatisticamente significantes.



Fonte: Elaborado pelo autor

No 28º dia de estudo, os linfócitos (Figura 15), os resultados apresentados dos grupos tratados com IMV 1%, IMV 10% e IMV 20% mostraram um decréscimo de -26,17 ± 4,45%, -38,01 ± 6,88% (com significância P < 0,05 Dunnett) e -35,25 ± 6,77% (com significância P < 0,05 Dunnett) quando comparados com o grupo controle, respectivamente. Ao compararmos com o grupo controle positivo, os grupos IMV 1%, IMV 10% e IMV 20% obtiveram um declínio de -31,16 ± 4,45%, -2,20 ± 6,88% e -39,62 ± 6,77%, respectivamente. Salienta-se que o grupo IMV 1% obteve resultados abaixo do limite do valor de referência nos dias 7, 14 e 28 do experimento, enquanto que os grupos IMV 10% e IMV 20% apresentaram valores abaixo da referência nos dias 14, 21 e 28 da pesquisa.

Figura 15. Linfócitos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* (IMV) em suínos de creche. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M. *P<0,05; **P<0,01 consideradas estatisticamente significantes.

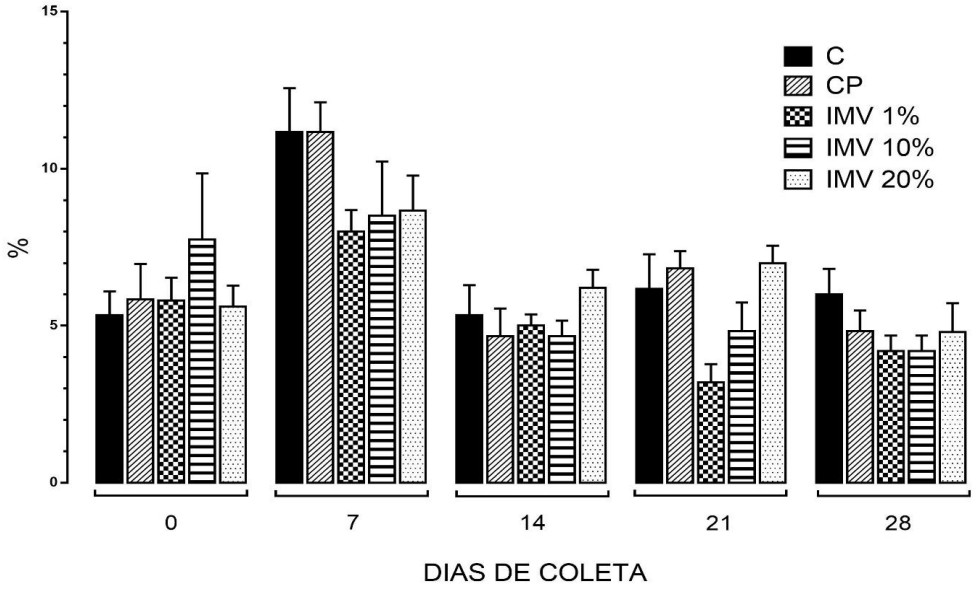


Fonte: Elaborado pelo autor

Quando analisado os monócitos (Figura 16), no dia 28 do experimento, dos grupos IMV 1%, IMV 10% e IMV 20%, quando comparados com o grupo controle, se observa um declínio de -30 ± 0,49%, -30 ± 0,49% e -20 ± 0,91%, respectivamente. Os mesmos grupos quando comparados com o controle positivo também demonstram uma queda de -13 ± 0,49%, -13 ± 0,49% e -23 ± 0,91%, respectivamente.

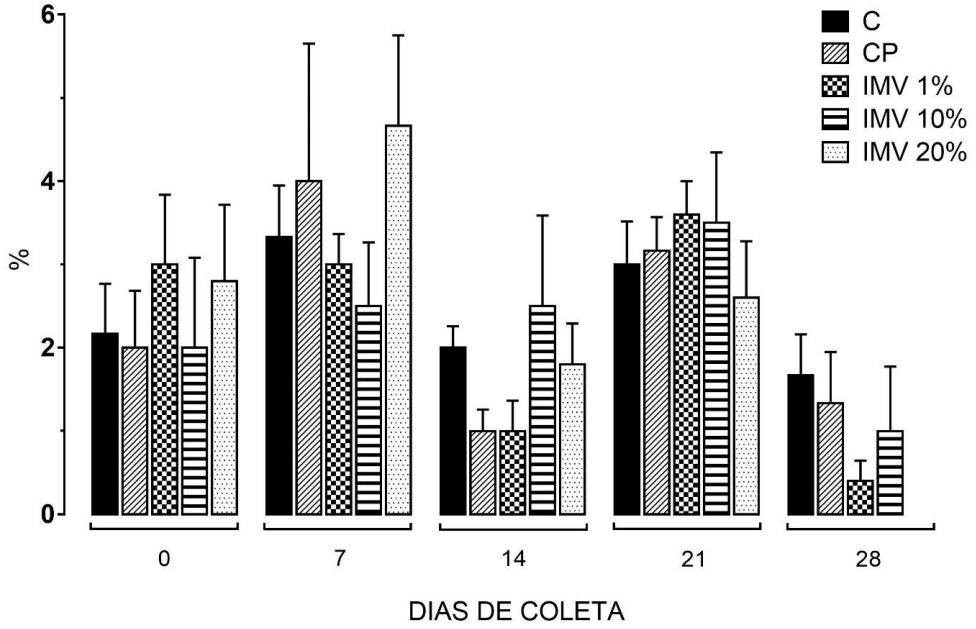
Com relação aos eosinófilos (Figura 17), no 28º dia de estudo, foi observado que no grupo IMV 1% houve um decréscimo de -75 ± 0,24% ao ser comparado com o grupo controle e uma queda de -69,2 ± 0,24% ao se comparado com o grupo controle positivo. O grupo IMV 10% apresentou um declínio de 37,5 ± 0,77% em relação ao grupo controle, já quando comparado ao grupo controle positivo o decréscimo é de -23,07 ± 0,77%. O grupo IMV 20% não apresentou nenhum eosinófilo no dia 28 do experimento.

Figura 16 - Monócitos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* (IMV) em suínos de creche. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 17 - Eosinófilos dos animais tratados com a infusão da *M. vulgare* (IMV) em suínos de creche. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam os E.P.M.



Fonte: Elaborado pelo autor

Em um aspecto global, a interferência sobre células vermelhas e brancas foram muito sutis, e em virtude das grandes oscilações nas médias, pouca foi a

significância estatística encontrada entre tratados e controles. O que chama atenção é o perfil inibitório sobre linfócitos e eosinófilos, sugerindo uma interferência na mobilidade de células brancas e na degranulação de eosinófilos, que poderia ser interpretado como uma ação imunomodulatória da planta, o que confirma a achados anteriores em estudos utilizando produtos da *M. vulgare* (SOARES et al. 2016). Estudos adicionais serão necessários para esclarecimento dessas ações.

Observamos com esses resultados de crescimento ponderal, ganho de peso e conversão alimentar global, que podem ser atribuídos a diferentes ações e efeitos observados anteriormente para a planta em diferentes modelos experimentais. Os principais indicadores para esse efeito melhorador de índices zootécnicos ou um efeito fitobiótico poderiam advir da interação das atividades antimicrobiana (ZARAI et al., 2011), antioxidante (WEEL et al., 1999; MATKOWSKI e PIOTROWSKA, 2006), protetor de mucosa (OLIVEIRA et al. 2011), anti-inflamatória STULZER et al., 2006) e imunomoduladora (DAOUDI, AARAB e ABDEL-SATTAR, 2013), que em conjunto contribuem para uma maior higidez dos animais, normalizando variáveis intrínsecas do sistema de criação intensivo de suínos confinados. Estudos adicionais no futuro serão necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nessa ação fitogênica da planta, consolidando assim um novo fitoterápico a ser incorporado às rações industriais de suínos, livre de aditivos químicos.

Os mecanismos de ação pelos quais os fitogênicos atuam levando a um melhor desenvolvimento zootecnico ainda estão por ser esclarecidos (WALLACE et al., 2010; WINDISCH et al., 2008). As principais evidências para um aumento de índices zootecnicos e melhoria do sabor da carne poderia estar relacionado com a interação entre atividades antimicrobiana (ZARAI et al., 2011), antioxidante (MATKOWSKI e PIOTROWSKA, 2006; WEEL et al., 1999), protetora de mucosa (OLIVEIRA et al., 2011), antiinflamatória (El ABBOUYI et al., 2013) e imunomoduladora (DAOUDI, AARAB e ABDEL-SATTAR, 2013), que em conjunto, poderiam contribuir para uma melhor saúde dos animals, resultando então num efeito normalizador fitogênico em sistemas de confinamento de suínos.

3.3 CONSTITUIÇÃO FITOQUÍMICA DA INFUSÃO DA *M. vulgare* E ATIVIDADES BIOLÓGICAS QUE CONTRIBUEM PARA A AÇÃO FITOBIÓTICA

Desde os anos 1980 um significante aumento no interesse na pesquisa e uso de antioxidantes naturais ao invés de produtos sintéticos, causado por uma demanda de consumidores para aditivos de comida natural e o fato de que o ônus da prova de segurança pode ser menos rigoroso do que o necessário para antioxidantes sintéticos (GIESE, 1996; AMARAL, SILVA e LANNES, 2018). A atividade antioxidante de muitas plantas tem sido investigada (XU et al., 2017), no entanto, até o momento, apenas alecrim e sálvia estão disponíveis comercialmente como extratos antioxidantes sem sabor, inodoro e incolor. Numerosos estudos mostram que a maioria das substâncias ativas antioxidantes ocorre em extratos de plantas, entretanto alguns óleos voláteis foram também testados como retardadores da oxidação lipídica. Por exemplo, óleos essenciais contendo eugenol e isoeugenol (cravo, pimenta da Jamaica), timol e carvacrol (tomilho), e outros compostos fenólicos, exibiram maior atividade antioxidante (WEEL et al., 1999). Mais recentemente tem crescido o interesse em plantas medicinais contendo antioxidantes e fitoquímicos ativos tais como compostos fenólicos, terpenóides e vitaminas, e seu potencial uso como nutracêuticos e/ou aditivos de rações na prevenção de muitas doenças (CRAIG, 1999).

A *M. vulgare* é essencialmente rica em compostos fenólicos entre outros fitoquímicos e é largamente usada na medicina tradicional humana e animal. Caso contrário as importantes atividades biológicas da *M. vulgare* descritas na literatura podem ser atribuídas aos seus diferentes compostos bioativos tais como os flavonoides, diterpenos e glicosídeos feniletanóides (TAKEDA et al., 2000; SAHPAZ et al., 2002). Um dos mais bem conhecidos diterpenóides foi caracterizado como a marrubiina, isolado pela primeira vez da *M. vulgare* in 1842. Este diterpeno furanico-labdano é, pelo menos em parte, responsável pelas propriedades terapêuticas observadas para a *Marrubium* sp. (STULZER et al., 2006).

As folhas da *M. vulgare* possuem uma grande variedade de compostos fitoquímicos citados acima. Por outro lado, a dosagem colorimétrica tem mostrado que o extrato metanólico contém mais flavonóides e taninos, atividade sequestradora de radicais livres entre 51.90 a 97.15%. Os extratos acetônico e metanólico da planta inibiram o radical DPPH, a capacidade redutora de ferro

(AMESSIS-OUCHEMOUKH et al., 2014). A capacidade do extrato metanólico em sequestrar o H_2O_2 foi também considerável (59,73%) o que destaca a importância dessa matriz de planta como fonte promissora de antioxidantes naturais (MATKOWSKI e PIOTROWSKA, 2006; AMESSIS-OUCHEMOUKH et al., 2014).

Outra possibilidade para a infusão apresentar uma atividade fitobiótica se deve à atividade antimicrobiana anteriormente observada em diferentes produtos oriundos da planta. Uma atividade reguladora da microflora bacteriana intestinal é desejável para produtos com potencial fitobiótico particularmente. Algumas substâncias bioativas de plantas, de modo semelhante aos agentes antimicrobianos exercem seus efeitos através da modulação da membrana celular de micróbios (KAMEL, 2000a). Além disso, um forte aumento na hidrofobicidade das espécies microbianas na presença de alguns extratos de planta pode influenciar as características da superfície da célula bacteriana e deste modo afetar a virulência dos micróbios. Esse conceito pode ter implicações para o intestino no qual a adesão de microorganismos na mucosa é de vital importância para a microflora patogênica e é fortemente influenciada pelas propriedades hidrofóbicas da superfície de células microbianas (KAMEL, 2001).

O extrato metanólico da planta inteira exibiu de moderada a significante atividade antibacteriana contra diferentes cepas bacterianas sempre em comparação com antibióticos controles positivos. Os estudos revelaram que o extrato metanólico da droga crua foi muito eficaz contra bactérias gram positivas (ex: *B. subtilis, S. epidermidis* and *S. aureus* e moderadamente eficaz contra Gram negativas (Ex: *E. coli* e *Proteus vulgaris*) e ineficaz contar *P. aeruginosa*. (MASOODI et al., 2008; AL-BAKRI e AFIFI, 2007; ZARAI et al., 2011). A *M. vulgare* mostrou uma atividade antimicrobiana promissora contra *B. subtilis* e *S. aureus* (ZARAI et al., 2011). Em outro estudo o extrato metanólico da raiz da *M. vulgare*, inibiu in vitro o crescimento planctônico, a formação de biofilme e a aderência de uma cepa de *S. aureus* resistente à meticilina em 40 horas (QUAVE e SMELTZER, 2009).

Também o óleo essencial da *M. vulgare* apresentou uma variada atividade antibacteriana e antifúngica entre diferentes patógenos estudados. Ele inibiu o crescimento de cepas bacterianas produzindo zonas de diâmetro de inibição de 6,6 a 25,2 mm para bactérias Gram (+) com valores de IC_{50} e MIC entre 560-1100 µg/ml e 1120-2600 µg/ml, respectivamente. Já para bactérias Gram (-) não foi

observada atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra todas as cepas testadas tais como *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Klebsiella pneumoniae* WHO24, *Escherichia coli* 25922 e *Salmonella* sp. As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais das partes aéreas da *M. vulgare* são suspeitas de estarem associadas em parte aos seus altos níveis de compostos oxigenados (em torno de 46%) em várias partes do mundo.

Varias misturas de óleos essenciais as quais contém compostos polifenólicos ou flavonóides com principal dos ingredientes ativos foram identificados como potencial agentes antioxidante e antimicrobiano (CRUICKSHANK, 2001; FRIEDMAN, BUICK e ELLIOTT, 2004). A suplementação de dietas de frangos com misturas de óleos essenciais pode criar uma microflora intestinal saudável ajudando na digestão ideal e melhorando a performance das aves (CRUICKSHANK, 2001). Diversos pesquisadores também relataram que mono e sesquiterpenóides são os principais componente dos óleos essenciais, os quais são fenólicos na sua natureza (OYEDEJI e AFOLAYAN, 2005; CAKIR et al., 2004). Portanto, é razoável supor que sua atividade antimicrobiana possa estar relacionada à abundância de compostos fenólicos. Referindo-se à literatura, a atividade antimicrobiana do óleo essencial testado pode estar relacionada à contribuição da mistura entre diferentes compostos fenólicos (KADRI et al., 2011).

É muito provável que numerosos componentes dos óleos essenciais desempenhem um papel crucial na definição das características dos óleos, tais como, a atração lipofílica ou hidrofílica e a fixação sobre a parede celular, e membranas e distribuição celular (CAL, 2006). O óleo essencial concentra os fitoconstituintes terpênicos pertencentes a uma planta e a *M. vulgare* é constituída principalmente por aproximadamente equal quantidade monoterpenos/diterpenos oxigenados (40.02%) e sesquiterpenes (42,70%). Essa característica fitoquímica é muito importante porque dependendo de seus componentes a distribuição dos componentes, a distribuição do óleo na célula determina os diferentes tipos de atividades biológicas tais como antibacteriana, antifúngica e citotóxica.

A análise fitoquímica da infusão da *M. vulgare* por nós administrada aos leitões em doses relativas e crescentes revelou através da ultracromatografia líquida de alta eficiência (UPLC) a predominância de uma família de diterpenos aparentados tais como o marrubenol, marrubiina e seus isômeros num tempo de retenção entre 6,44 e 9,08 (Tabela 1 e Figura 18).

Em nosso estudo, quando confrontados os cromatogramas da infusão da planta e da furanolactona diterpênica marrubiína que é um marcador padrão da *M. vulgare* podemos observar que o pico do ponto de retenção desse composto fitoquímico coincide com o pico obtido com a injeção da infusão e que por sua vez coincide com o pico no ponto de retenção do plasma dos suínos, denotando absorção de diterpenos transformados farmacocineticamente, que no nosso caso poderia ser uma família de isômeros diterpênicos como observado no cromatograma do plasma dos suínos (Figura 18).

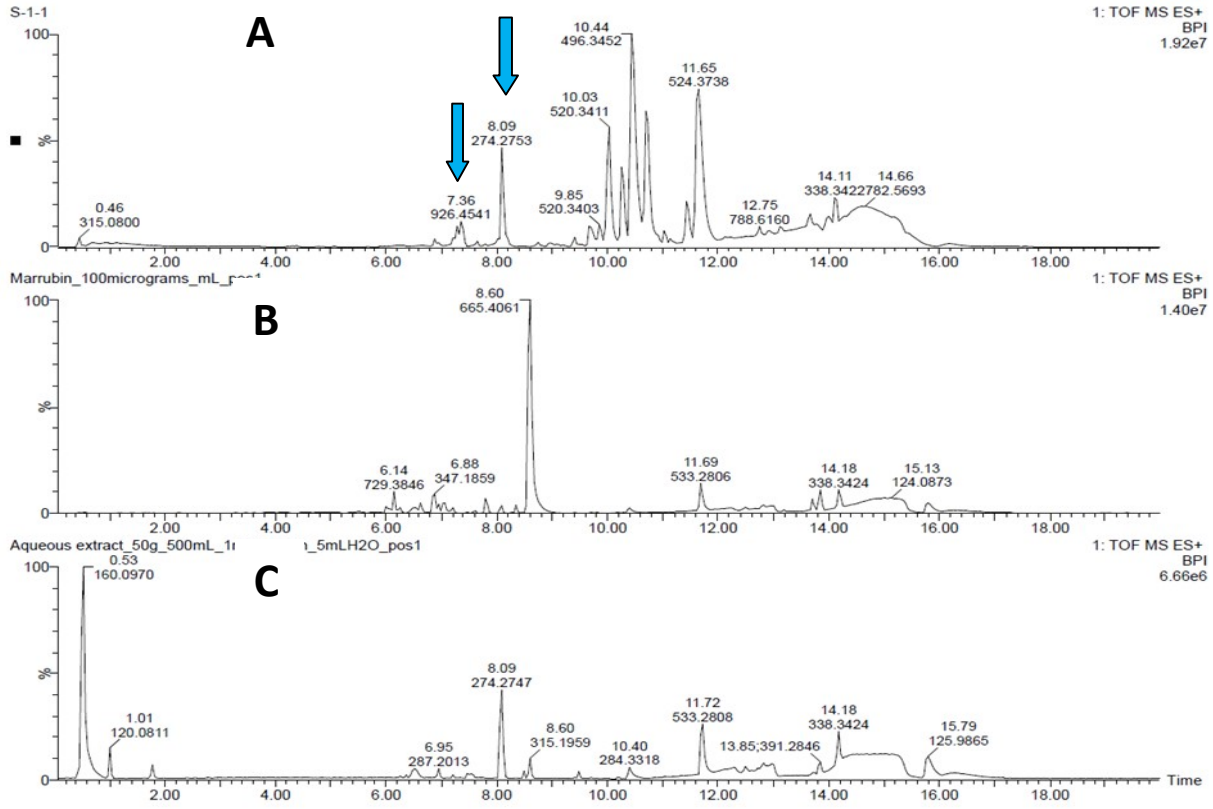
Os constituintes característicos do gênero *Marrubium* sp. são considerados os diterpenos, incluindo a marrubiína como seu principal composto que é o mais conhecido e o primeiro a ser isolado (PIOZZI et al., 2006). Estes podem classificados de acordo com os diferentes tipos de sua estrutura (furanolabdanos, labdanos pre-furanóides os quais incluem hemiacetals/espiroeters e anéis butenolida).

Tabela 1. Análise metabolômica de terpenóides através ultracromatografia líquida de alta eficiência acoplada às massas (UPLC-MS), modo positivo numa janela de retenção de 6,44 a 9,08, obtida a partir da injeção da infusão da *Marrubium vulgare.*

Tempo retenção	Massa observada	Massa teórica	Forma molecular	Identidade
6,44	319,2286	319,2273	C20H30O3	Marrubenol
7,03	287,2001	287,2011	C19H26O2	Diterpeno
7,25	317,2114	317,2117	C20H28O3	Diterpeno
7,54	315,0880	315,0869	C17H14O6	Dimetoxiflavona
8,13	301,2185/ 319,2286	319,2273	C20H30O3	Isômero de marrubenol
8,64	665,4077 $[2M+H]^+$	665,4053	2xC20H28O4	Marrubiina
8,93	315,1970/ 333,2072	333,2066	C20H28O4	Isômero de marrubiína
9,08	315,1970/ 333,2072	333,2066	C20H28O4	Isômero de marrubiína

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 18. Cromatograma obtido a partir de UPLC–MS, representativo da injeção de plasma de suíno tratado com a infusão da planta a 10% (A), da marrubiína padrão (B) e da infusão de *M. vulgare* (C). A seta indica os picos nos tempos de retenção entre 6,44 e 9,08 em "A" que sugerem a presença de derivados diterpênicos no plasma dos suínos, indicando absorção de diterpenóides modificados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em geral o esqueleto labdano mostra que a marrubiína é um típico marcador para todo o gênero *Marrubium* sp e por isso escolhemos a molécula para essa finalidade na metabolômica do plasma dos suínos tratados cronicamente com a infusão. Investigações prévias com *M. velutinum* e *M. cyllenium* revelaram que estas plantas são uma rica fonte de diterpenos, glicosídeos feniletanóides e flavonóides com interessantes atividades biológicas (KARIOTI, HEILMANN e SKALTSA, 2005a,b). Os diterpenóides em particular tem uma ampla variedade de usos farmacêuticos, além de suas diversas outras aplicações industriais (BOHLMANN e KEELING, 2008; HILLWIG et al., 2011).

Também já foi caracterizado que a atividade fitobiótica de uma planta medicinal poderia estar associada a efeitos imuno-moduladores. Em nosso estudo a administração crônica da infusão da *M. vulgare* determinou alterações paradoxais na série de células brancas encontradas no sangue periférico dos suínos. Evidências

empíricas sugerem que extratos de plantas podem oferecer benefícios em impulsionar o sistema imune, prevenindo assim doenças na produção animal de espécies não-ruminantes (WENK, 2003). A família Labiateae contém uma grande família de ervas aromáticas usada como temperos tais como manjericão, endrol, erva-doce, manjerona, hortelã, alecrim, orégano, sálvia e tomilho (CRAIG, 1999). A mistura de alguns óleos essenciais baseados no carvacrol e o timol, cujas maiores fontes são o orégano e o tomilho, respectivamente (BURT, 2004), parecem ser promissoras devido à potenciais propriedades imunomodulatória (WOOLLARD, TATHAM e BARKER, 2007). Efeitos imunomoduladores já foram observados para uma série de diterpenos (KARIOTI et al., 2007).

Nesse sentido, foi demonstrado anteriormente que o extrato hidrometanólico das partes aéreas da *M. vulgare* apresenta certa atividade anti-inflamatória sobre células de defesa. O consumo de oxigênio, produção de ânions superóxido e a estimulação de leucócitos polimorfonucleares pleurais de rato foram observados após a aplicação de zimosan e o extrato da *M. vulgare* exibiu um efeito anti-inflamatório significante em doses de 300 e 400 mg/kg/dia (EL ABBOUYI et al., 2013). Essa atividade pode estar ligada ao fato do extrato da *M. vulgare* conter uma abundância de compostos fenólicos. Diversos estudos têm demonstrado que os polifenóis impedem profundamente a produção intermediários reativos do oxigênio produzidos por neutrófilos e outras células fagocíticas (GRASSMANN, HIPPELI e ELSTNER, 2002; YOON e BAEK, 2005).

DAOUDI et al. (2008) e DAOUDI, AARAB e ABDEL-SATTAR (2013) estudaram a atividade imuno-modulatória do extrato aquoso de várias plantas medicinais marroquinas incluindo a *M. vulgare.* Flores e extratos foram testados contra a proliferação de células imunes usando o ensaio do brometo de 3-(4, 5-dimethylthiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) sobre a atividade mitogênica de esplenócitos de camundongos, sugerindo a associação da planta como profilático e adjuvante da quimioterapia para o câncer. Nesse caminho, O mais interessante achado relacionado à *M. vulgare*, o qual levou ao isolamento e identificação da ladaneína. Foi demonstrado que essa flavona teve uma atividade citotóxica moderada sobre uma linhagem de células imortalizadas de leucemia humana e refratárias ao imatinib (que é um inibidor de tirosina quinase), fornecendo uma fonte para a hemi-síntese de flavonas com atividade anti-leucêmica (ALKHATIB et al., 2010). A citotoxidade e a característica imunomoduladora de labdano diterpenos

foram investigadas também com a marrubinona B, que se mostrou o mais potente estimulador de células natural killer, com significante citotoxicidade em uma gama de células tumorais, incluindo de leucemia, carcinoma de mama e cervical (KARIOTI et al., 2007).

O que obtivemos em termos de resultados com células da série branca foi um perfil inibitório sobre neutrófilos e linfócitos, ao mesmo tempo que causou aumento nos leucócitos circulantes totais nas maiores doses relativas de IMV10 e IM20, possivelmente aumentando a mobilidade periférica de células brancas, porém com menor predominância de células granulocíticas como os eosinófilos e basófilos, que poderia ser interpretado como uma ação imuno-moduladora da planta, o que confirma a achados preliminares anteriores utilizando a infusão da *M. vulgare* por longos períodos em bezerros recém-desmamados (SOARES et al. 2016). Nessa espécie houve inibição dignificante dose-resposta de neutrófilos e monócitos. Estudos adicionais serão necessários para esclarecimento das diferenças interespécie dessas ações inibitórias sobre células de defesa.

3.4 INFLUÊNCIA DA INFUSÃO DA *M. vulgare* SOBRE ENZIMAS MARCADORAS DE LESÃO HEPÁTICA, PROTEÍNAS E METABÓLITOS

Os resultados da bioquímica hematológica (Tabela 2) neste estudo contribuem para a elucidação dos possíveis efeitos toxigênicos da planta medicinal *M. vulgare* em um modelo de toxicidade em suínos jovens. Somente alguns estudos com roedores avaliaram em algum grau os efeitos deletérios desta planta e de seus compostos fito-constituintes que apresentaram atividade biológica significativa (ETTAYA et al., 2015). Aqui pela primeira vez foi verificado que a administração crônica da *M. vulgare* sob a forma de infusão, nas doses relativas testadas não apresentou efeitos toxigênicos relevantes nem sobre células vermelhas ou brancas bem como sobre órgãos como rins e fígado na análise bioquímica enzimática e de metabólitos sanguíneos. A ausência de sintomatologia clínica visível nos animais tratados corrobora para descartar tais efeitos nocivos da infusão da *M. vulgare*. Esse fato tem especial importância porque até então somente uns poucos testes com roedores de laboratório foram obtidos e essa avaliação, em uma espécie mais próxima de humanos na escala filogenética tal como o suíno contribui para reforçar a

segurança dos derivados da planta, haja vista que infusões e decoctos da planta são consumidas desde tempos imemoriais.

Tabela 2 - Resultados de bioquímica enzimática e metabólitos sanguíneos obtidos no sangue de suínos tratados com a infusão da *Marrubium vulgare* ao final do 28º dia de tratamento. Os números são o resultado da média ± Erro padrão das médias. N = 6.

Testes laboratoriais	**Controle negativo**	**Controle positivo**	**Infusão *M. vulgare* 1%**	**Infusão *M. vulgare* 10%**	**Infusão *M. vulgare* 20%**
GGT (UI/L)	37,33± 6,54	28,96 ± 11,68	41,94 ± 21,80	40,04 ± 20,55	44,82±18,27
AST (UI/L)	28,50±4,18	31,83 ± 5,84	37,00 ± 6,92	35,00 ± 6,51	36,20 ± 7,42
ALT (UI/L)	43,33±11,70	54,25 ± 12,96	45,00 ± 9,40	51,60 ± 12,25	36,20 ± 8,40
Fosfatase alcalina (UI/L)	12,83± 8,83	15,81 ± 4,75	19,71 ± 5,90	24,21 ± 12,84	11,25 ± 3,94
Colesterol (mg/dL)	80,50±17,73	68,83 ± 12,13	70,50 ± 14,65	82,60 ± 26,60	68,60±14,58
Creatinina (mg /dL)	1,06±0,23	1,07 ± 0,08	0,97 ± 0,17	0,96 ± 0,16	1,00 ± 0,12
Albumina (g /dL)	3,42±0,30	3,36 ± 0,22	3,17 ± 0,47	3,11 ± 0,19	3,26 ± 0,21
Proteínas totais (g /dL)	4,69±0,71	4,42 ± 0,77	4,11 ± 1,36	4,03 ± 1,14	5,58 ± 1,85
Proteínas plasmáticas (g/dL)	5,84 ± 0,88	5,56 ± 0,51	5,92 ± 0,86	5,92 ± 1,28	6,15 ± 0,91

Legenda: GGT - Gama glutamil transpeptidase ou Gama GT; AST - Aspartato aminotransferase; ALT - Alanina aminotransferase. Fonte: elaborado pelo autor.

Procuramos 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 leitões recém-desmamados até um mês de vida.

Não observamos alterações estatisticamente significantes no perfil das enzimas hepáticas GGT, AST, ALT e fosfatase alcalina, entre os grupos controles e tratados com a IMV. Da mesma forma não houve variações significantes no que diz

respeito aos metabólitos sanguíneos colesterol e creatinina bem como de proteínas plasmáticas, proteínas totais e albumina sanguíneos (Tabela 2), indicando ser a infusão da *M. vulgare*, nas doses relativas testadas em nosso trabalho, é totalmente inócua em termos de toxicidade sistêmica e de órgãos.

Também não podemos deixar de fazer referências e comentários sobre algumas ações biológicas adicionais que poderiam contribuir para a atividade fitogênica/fitobiótica que estariam envolvidas diretamente na saúde do sistema digestório dos suínos, principalmente na fase jovem de crescimento. Todas as partes como um todo da *M. vulgare* são usadas na medicina popular para o tratamento de desordens gastrointestinais. O efeito antiespasmódico foi produzido através da inibição da ação de neurotransmissores tais como a acetilcolina, prostaglandina E_2, histamina, bradicinina com seletividade para as contrações colinérgicas (OLIVEIRA et al., 2011; SCHLEMPER et al., 1996). Além disso, o extrato hidroalcoólico da *M. vulgare* (50 e 100 mg/kg) produziu um significante efeito protetor no modelos de úlcera induzida pelo etanol comparável ao omeprazol e a marrubiina isolada do extrato metanólico das folhas da *M. vulgare* e avaliada suas propriedades gastro-protetoras e de lentificação do trânsito gastro-intestinal (OLIVEIRA et al., 2011). Baseados nesses resultados, pode-se deduzir, que a infusão da *M. vulgare* induz a uma maior permanência dos nutrientes nos intestinos aumentando assim a absorção de nutrientes.

Aprofundando o tema anteriormente abordado, é reconhecida a capacidade de extratos de plantas e outras substâncias naturais de melhorar a resposta imune intestinal local e a imunidade sistêmica. Em adição, em muitos dos experimentos, as células imunes do sangue periférico são mais facilmente estudadas do que as células imunes da mucosa gastrointestinal. Entretanto, só 2% de todos os linfócitos estão no sangue periférico (BLUM e PABST, 2007)

Finalmente, a *M. vulgare* é largamente distribuída na Ásia e tem sido usada na medicina popular de diversos países para o tratamento de doenças hepáticas. O extrato da planta inteira e o ácido marrubico exibiram uma significante atividade hepatoprotetora (ELBERRY et al., 2010). Foi observada a redução dos níveis elevados de enzimas no soro tais como GGT em torno de 40%, AST em torno de 35%, e a fosfatase alcalina em 30%. Os níveis de proteínas totais foram também aumentados. Em outro estudo, 12 compostos da *M. vulgare* por sua semelhança à algumas drogas e atividade biológica, foram testadas *in silico* quanto à atividade

hepatoprotetora (VERMA, MASOODI e AHMED, 2012). A atividade hepatoprotetora *in vivo* do extrato metanólico da *M. vulgare* foi estudada contra a toxicidade hepática induzida pelo paracetamol em ratos Wistar e os efeitos tóxicos do paracetamol foram significantemente controlados restaurando todos os parâmetros bioquímicos enzimáticos do soro (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, ALP, albumina, bilirrubina total e triglicerídeos) para próximo dos níveis normais (AKTHER et al., 2013). Foram estudados também efeitos hepatoprotetores contra o éter do petróleo do extrato etanólico da *M. vulgare* e contra a toxicidade do CCl_4 sobre células do fígado em camundongos e os parâmetrois funcionais de fígado e rins permaneceram em níveis normais quando avaliado nos grupos tratados com extrato etanólico na dose de 250 mg/kg/dia por cinco dias (IBRAHIM, IBRAHIM e OMER, 2014).

As atividades biológicas dos extratos da *M. vulgare* crus podem diferir devido à variação geográfica e de clima da planta, e também os tipos de solvente utilizados nas abordagens, desde que a caracterização fitoquímica de cada extrato é um importante passo para o conhecimento sobre os compostos e sua atividade biológica. Há ainda uma necessidade de alguns estudos moleculares para o conhecimento dos mecanismos ligados aos efeitos antimicrobianos e seguir com estudos clínicos. Também estudos fitoquímicos serão importantes para identificar os constituintes ativos responsáveis para a atividade fitobiótica.

4 CONCLUSÃO

Com a administração crônica da infusão da *M. vulgare* em leitões recém-desmamados, conclui-se que sua utilização na dieta suína em contraposição ao uso dos antibióticos, tem uma influência positiva no crescimento dos animais, ganho de peso, conversão alimentar, além de inibir células de defesa.

Portanto, com base nos resultados obtidos, podemos levar em consideração a possibilidade do uso da *M. vulgare* como um incrementador de desenvolvimento corporal na produção suinícola, demonstrando um potencial para substituir os antibióticos utilizados como promotores de crescimento. Serão necessários estudos que envolvem a elaboração de rações acrescidas da planta seca e pulverizada para mistura aos nutrientes normais da dieta de suínos em crescimento para avaliar o consumo espontâneo da planta adicionada na dieta de terminação dos suínos em confinamento e tentar reproduzir os resultados obtidos com a infusão da planta.

REFERÊNCIAS

AKTHER, N. et al. Hepatoprotective activity of *Marrubium vulgare* against paracetamol induced toxicity. **Journal of Pharmacy Research**, v.7, n.7, p.565-70, 2013.

AL-BAKRI, A.G; AFIFI, F.U. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 1, p. 19-25, 2007.

ALKHATIB, R. et al. Activity of ladanein on leukemia cell lines and its occurrence in *Marrubium vulgare*. **Planta Medica**, v. 76, p. 86–87, 2010.

AMARAL, A.B.; SILVA, M.V.; LANNES, S.C.S. Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors – a review. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 38, suppl. 1, p. 1-15, 2018.

AMER, M.M.A. Constituents of the aerial parts of *Marrubium vulgare* L. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 9, n. 1, p. 92-8, 1993.

AMESSIS-OUCHEMOUKHA, N. et al. Phytochemical profiling, in vitro evaluation of total phenolic contentsand antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria. **Industrial Crops and Products,** v. 61, p.120–129, 2014.

APPLETON, R. A. et al. The stereochemistry of marrubiin. **Journal of Chemical Society,** v. C, p. 1943-1948, 1967.

BALMÉ, F. **Plantas medicinais**. São Paulo: Hemus, 1982.

BELHATTAB, R.; LAROUS, L. Essential oil composition and glandular trichomes of *Marrubium vulgare* L. growing in wild Algeria. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 369–373, 2006.

BLUM, K. S.; PABST, R. Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs? **Immunology Letters.** v. 108, p. 45–51, 2007.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal medicine**. Expanded Commission Monographs. Austin, TX: American Botanical Council, 2000.

BOHLMANN, J.; KEELING, C.I. Terpenoid biomaterials. **The Plant Journal**, v. 54, p. 656–669, 2008.

BROCKUS, C. H. et al. Hematologic and serum biochemical reference intervals for Vietnamese potbellied pigs (*Sus scrofa*). **Comprehensive Clinical Pathology,** v. 13, p. 162–165, 2005.

BRUMANO, G.; GATTÁS, G. Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime,** v.6, n.3, p. 953-959, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology,** v. 94, p. 223–253, 2004.

CAKIR, A. et al. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. **Flavour and Fragancy Journal,** v. 19, n. 1, p. 62-68, 2004.

CAL, K. Skin penetration of terpenes from essential oils and topical vehicles. **Planta Medica**, v.72, n. 4, p.311-316, 2006.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 93, p. 223-226, 2005.

CLOSE, W.H. Producing pigs without antibiotic growth promoters. **Advanced in Pork Production**, v. 11, p. 47-56, 2000.

COSTA, L.B.; TSE, M.L.P.; MIYADA, V.S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, v. 36, n. 3, p.589-595, 2007.

CRAIG, W.J. Health-promoting properties of common herbs. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n.3 , p. 491s–499s, 1999.

CRUICKSHANK, G. Botanical growth enhancers offer natural option for broiler growers. **Poultry World**, v. 10, p 19–22, 2001.

DAOUDI, A. et al. Screening of fourteen Moroccan medicinal plants for immune-modulating activities. **Moroccan Journal of Biology**, v. 5, p. 24-30, 2008.

DAOUDI, A.; AARAB, L.; ABDEL-SATTAR, E. Screening of immunomodulatory activity of total and protein extracts of some Moroccan medicinal plants. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 3, p. 245-253, 2013.

DE SOUZA. M. M.; JESUS, R.A.P.; CECHINEL-FILHO, V.; SCHLEMPER, V. Analgesic profile of hydroalcoholic extract obtained from *Marrubium vulgare* **Phytomedicine,** v. 5, n. 2, p.103-107, 1998.

DI VICENZI, M.; MAIALETTI, F. *Marrubium vulgare* L. **Fitoterapia**, v. LXVI, n. 3, p.207, 1995.

EL ABBOUYI, A. et al. Anti-inflammatory effect of hydromethanolic extract from *Marrubium vulgare* lamiaceae on leukocytes oxidative metabolism: an *in vitro* and *in vivo* studies. **International Journal of Green Pharmacy**., v. 7**,** n. 3, p. 224-229, 2013.

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**, New York, v. 26, n. 6, p.465-474, 2004.

ELBERRY, A. A. et al. Antihepatotoxic effect of *Marrubium vulgare* and *Withania somnifera* extracts on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, Jeddah, v. 1, n. 4, p.247-254, out. 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves. **Custos de produção, câmbio e competitividade da suinocultura brasileira a partir dos dados da rede InterPIG**. Itu: EMBRAPA, 2016. 7p.

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. 44144, 2016.

FRANCISCO, M.L.D.; RESURRECCION, A.V. A. Development of a reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. **Food Chemistry**, v. 119, p. 356-363, 2009.

FRIEDMAN, M.; BUICK, R.; ELLIOTT, C.T. Antibacterial activities of naturally occurring compounds against antibiotic–resistant *Bacillus cereus* vegetative cells and spores, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection** v. 67, p. 1774–1778, 2004.

GARJANI, A. et al. An investigation on cardioprotective potential of *Marrubium vulgare* aqueous fraction against ischaemia-reperfusion injury in isolated rat heart. **Folia morphologica,** v. 76, n. 3, p. 361-371, 2017.

GIESE, J. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. **Food Technology**, v.50, p.72, 1996.

GRASSMANN, J.; HIPPELI, S.; ELSTNER, E.F. Plant's defense and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. **Plant Physiology Biochemistry,** v.40, p.471-8, 2002.

HENDERSON, M.S.; MCCRINDLE, R. Premarrubiin. A diterpenoid from *Marrubium vulgare* L. **Journal of Chemical Society,** v. C, p. 2014-5, 1969.

HILLWIG, M.L., MANN, F.M.; PETERS, R.J. Diterpenoid biopolymers, new directions for renewable materials engineering. **Biopolymers**, v. 95, n. 2, p. 71–76, 2011.

IBRAHIM, F.M.; IBRAHIM, A.Y.; OMER, E.A. Potential effect of *Marrubium vulgare* L. extracts on CCL4 model induced hepatotoxicity in albino mice. **World Journal of Pharmaceutical Science,** v.2, p.1664-70, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **PIB agropecuário surpreende com alta de 1,8% em 2015.**

JACELA, J.Y. et al. Feed additives for swine: fact sheets–prebiotics and probiotics, and phytogenics. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports**, v. 18, n. 3, p.132-136, 2010.

JESUS, R.A.P. et al. Analysis of the antinociceptive properties of marrubiin isolated from *Marrubium vulgare*. **Phytomedicine**, Itajaí, v. 7, n. 2, p.111-115, 2000.

KADRI, A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. **African Journal of Biotechnolgy**, v. 10, n. 198, p. 3908 - 3914, 2011.

KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plant extracts The focus on herbs and spices in modern animal feeding is too often forgotten. **Feed Mix**, v. 8, n. 4; p. 19-23, 2000a.

KAMEL, C. Natural plant extracts: classical remedies bring modern animal production solutions. In: CONFERENCE OF FEED MANUFACTURERS OF THE MEDITERRANEAN*,* 3., 2000, Zaragoza, Reus, Spain: Institut Agronomique Mediterraneen. **Proceedings...** Zaragoza, 2000b.

KAMEL, C. Tracing modes of action and the roles of plant extracts in non–ruminants. In: GARNSWORTHY, P.C.; WISEMAN, J. **Recent advances in animal nutrition**, Nottingham, UK: Nottingham University Press, 2001. p. 135–150.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th. ed. Davis, CA: Academic Press, 2008. 928p.

KARIOTI, A.; HEILMANN, J.; SKALTSA, H. Labdane diterpenes from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum***. Phytochemistry**, v.66, p.1060–1066, 2005a.

KARIOTI, A.; HEILMANN, J.; SKALTSA, H., Secondary metabolites from *Marrubium velutinum*, growing wild in Greece. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 60b, p. 1–5, 2005b.

KARIOTI, A. et al. Cytotoxicity and immunomodulating characteristics of labdane diterpenes from *Marrubium cylleneum* and *Marrubium velutinum*. **Phytochemistry,** v. 68, p. 1587–1594, 2007.

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

KNOSS, W.; ZAPP, J. Accumulation of furanic diterpenes in *Marrubium vulgare* and *Leonurus cardiaca*. **Planta Medica,** v.64, p.357–361, 1997.

KOWALEWSKI, Z.; MATLAWSKA, I. Flavonoid compounds in the herb *Marrubium vulgare*. **Herba Polonica,** v.24, n.4, p. 183-6, 1978.

KUMMER, R. et al. Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche. **Acta Scientiae Veterinariae**, Videira, v. 37, n. 1, p.195-209, 2009.

LODHI, S. et al. *Marrubium vulgare* L.: a review on phytochemical and pharmacological aspects. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 6, n. 4, p. 429-452, 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil**: nativas e exóticas**.** Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

LUZ, C.S.M. et al. Physiological parameters of pigs raised with and without environmental enrichment. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n.4, p. 176-185, 2017.

MANDAL, S.M.; DIAS, R.O.; FRANCO, O.L. Phenolic compounds in antimicrobial therapy, **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 10, p. 1031–1038, 2017.

MARTIN-NIZARD, F. et al. Natural phenylpropanoids protect endothelial cells against oxidized LDL-induced cytotoxicity. **Planta medica**, v. 69, n. 03, p.207-211, 2003.

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.

MATKOWSKI, A; PIOTROWSKA, M. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. **Fitoterapia**, v. 77, n. 5, p. 346–353, 2006.

MORÉS, N. et al. **Produção de suínos em família, sem uso preventivo de antimicrobiano e privilegiando o bem-estar animal**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2013. 114 p.

NAWWAR, M.A.M. et al. Flavonoid lactates from leaves of *Marrubium vulgare*. **Phytochemistry**, v**.** 28, n.11, p. 3201-6, 1989.

NÉVOA, M.L.; CARAMORI JÚNIOR, J.G.; CORRÊA, G.S.S.;. ARANTES, V.M;. KAMIMURA, R.; GONÇALVES, F.C.; OLIVEIRA, M.S.F.; SANTOS. A.L.; NALON, R.P Desempenho e características bioquímicas de leitões submetidos a dietas com aditivos probióticos, prebióticos, simbióticos e antibióticos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 447- 454, 2013.

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.

OYEDEJI, O.; AFOLAYAN, A. Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of *Leonotis leonurus* and *L. ocymifolia* in the Eastern Cape. **African Journal of Botany,** v. 71, p.114-116, 2005.

PAVELA, R. et al. Insecticidal activity of certain medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 745-749, 2004.

PICCOLI, P.N.; BOTTINI, R. Accumulation of the labdane diterpene marrubiin in glandular trichome cells alog the ontogeny of *Marrubium vulgare* plants. **Plant Growth Regulation**, v. 56, n. , p. 71-6, 2008.

PIOZZI, F. et al. A. The diterpenoids of the genus *Marrubium* (Lamiaceae). **Natural Products Communications**, v. 7, p. 585–592, 2006.

QUAVE. C.L.; SMELTZER, M. Anti-biofilm activity of *Marrubium vulgare* L. (*Lamiaceae*) extract on MRSA. **Planta Medica**, v. 75, P96, 2009.

RAMOS-GUERRA, M.C. et al. *In vitro* activity of organic leaf/stem extracts from *Marrubium vulgare* and *Mentha spicata* against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia.* **Pharmacology Online**. v. 1, p. 108-12, 2007.

RODRIGUES, C. A.; SAVI, A. O.S.; SCHLEMPER, V. et al. An improved extraction of marrubiin from *Marrubium vulgare*. **Chromatographia**, v. 47, n. 7/8, p.449-50,1998.

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.

SALEI, L.A. et al. The structure of peregrinol, a diterpenoid from *Marrubium peregrinum*. **Khimija Prirodnykh Soyedineniy,** v. 8, p. 90– 95, 1967.

SOARES, E.L.; SCHLEMPER, V.; BARICHELLO, D.; SCHLEMPER, S.R.M. Administração crônica de *Marrubium vulgare* em bezerros Jersey. **Archives of Veterinary Science,** v.21, supl. 2, 2016.

SCHLEMPER, V. et al. Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. **Phytomedicine,** v. 3, n. 2, p. 211-216, 1996.

SCHLEMPER, S.R.M; SCHLEMPER, V.; MOLINETTI, W.T.; WEBER, J. *Marrubium vulgare* e *Leonurus sibiricus* como aditivos fitogênicos para frangos de corte tipo *griller.* SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO VALE DO SÃO FRANCISCO e FRANCE-BRAZIL MEETING ON NATURAL PRODUCTS, 7/1, 2019. **Anais**...Petrolina, 2019. Far2325.

STULZER, H. K. et al. Antioedematogenic effect of marrubiin obtained from *Marrubium vulgare*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 379-384, 2006.

TAKEDA, Y. et al. Labdane diterpenoids from *Marrubium globosum* sp. globosum **Chemical and Pharmacological Bulletin**, v. 48, n. 8, p. 1234–1235, 2000.

THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582p.

VALE, P.A.C.B. et al. Desempenho de leitões recém-desmamados alimentados com rações contendo óleos essenciais e promotores de crescimento. **Global Science and Technology**, Campos dos Goytacazes, v. 3, n. 3, p.59-66, dez. 2010.

VERMA, A.; MASOODI, M.; AHMED, B. Lead finding from whole plant of *Marrubium vulgare* L. with hepatoprotective potentials through *in silico* methods. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine,** v.2, p.S1308-11, 2012..

VILLANUEVA, J.R.; ESTEBAN, J.S.; VILLANUEVA, L.R. A reassessment of the *Marrubium vulgare* L. herb's potential role in diabetes mellitus type 2: First results guide the investigation toward new horizons. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 57, 2017.

WALLACE, R.J. et al. Dietary plant bioactives for poultry health and productivity. **British Poultry Science**, v. 51, n. 4, p. 461-87, 2010.

WEEL, K.G.C. et al. Antioxidant activity of horehound (*Marrubium vulgare* L.) grown in Lithuania. **Lipid - Fett**, v. 101, n. 10, p.395-400, 1999.

WENK, C. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 16, n. 2, p. 282-289, 2003.

WINDISCH, W. et al. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 14, p.140-148, 2008.

WOOLLARD, A.C.; TATHAM, K.C.; BARKER, S. The influence of essential oils on the process of wound healing: a review of the current evidence. **Journal of Wound Care,** v.16, p.255–257, 2007.

XU, D.P. et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. **International Journal of Molecular Science**. v. 18, n. 96, p. 1-32, 2017.

YOON, J.H.; BAEK, S.J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, p. 585-96, 2005.

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. 161, 2011.

ZERBE, P. et al., Diterpene synthases of the biosynthetic system of medicinally active diterpenoids in *Marrubium vulgare*. **The Plant Journal**, v. 79, p. 914–927, 2014.