



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANA CAROLINE DA SILVA

Estudo da composição química de *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae) e seus efeitos fitogênicos em suínos recém-desmamados: parâmetros bioquímicos e perfil metabólico do soro animal.

Florianópolis
2024

ANA CAROLINE DA SILVA

Estudo da composição química de *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae) e seus efeitos fitogênicos em suínos recém-desmamados: parâmetros bioquímicos e perfil metabólico do soro animal.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo

Florianópolis

2024

Silva, Ana Caroline da

Estudo da composição química de *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae) e seus efeitos fitogênicos em suínos recém-desmamados: parâmetros bioquímicos e perfil metabólico do soro animal / Ana Caroline da Silva ; orientador, Louis Pergaud Sandjo, 2024.

96 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química. 2. *Marrubium hamatum*. 3. Efeitos fitogênicos . 4. UPLC-ESI-MS. 5. Criação de suínos . I. Sandjo, Louis Pergaud. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

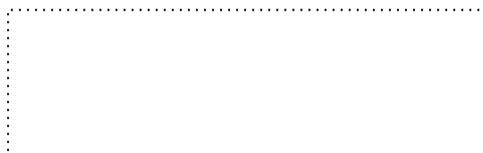
Ana Caroline da Silva

Estudo da composição química de *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae) e seus efeitos fitogênicos em suínos recém-desmamados: parâmetros bioquímicos e perfil metabólico do soro animal.

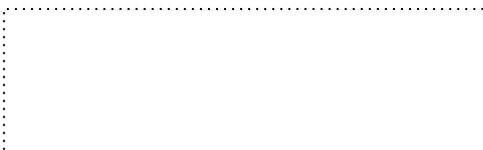
O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 11 de julho de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:



Profa. Dra. Christiane Meyre da Silva Bittencourt,
Universidade Federal de Santa Catarina

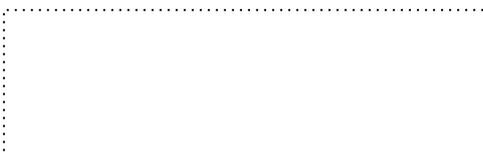


Prof. Dr. Diego Galvan,
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Bruno Silveira De Souza,
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Química Orgânica.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo
Orientador

Florianópolis, 2024

Dedico este trabalho à Guadalupe Ortiz de Landázuri [*in memoriam*] pela intercessão. Aos meus pais, e a todos os familiares e amigos que foram presentes em minha vida durante essa jornada, demonstrando apoio, incentivo, amor e zelo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que “não é uma sombra, um ser longínquo [...] Ainda que não o percebamos com os nossos sentidos, a sua existência é muito mais verdadeira que a de todas as realidades que tocamos e vemos”. A Ele, que me dotou de vida e alma, e “é a alma que levanta os nossos olhos até às estrelas, para que vejamos a beleza, conheçamos a verdade e amemos o bem”.

Aos meus pais, Antônio Ramiro da Silva Junior e Andresa Silva, por toda ajuda e incentivo, pelo apoio em cada escolha, por serem suporte mesmo à distância, e principalmente pelo dom da vida.

A todos os familiares, principalmente, à minha tia avó, Ana Maria Custódio, pelo amor demonstrado nas preocupações e mensagens trocadas diariamente, por toda oração que com certeza me sustentam.

A meus amigos e colegas, que tornam a vida mais leve, alegre e colorida, pelos momentos de distração e divertimento, pela presença e palavras afáveis nos momentos difíceis, e pela compreensão de minha ausência em alguns momentos especiais e importantes.

A todos do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), que fizeram parte dos meus dias nesses últimos dois anos, pelas partilhas, risadas, conversas e trocas de experiências que me fizeram crescer em conhecimento ao longo desse período de formação acadêmica. Obrigada pela ajuda nas disciplinas, pela paciência em ensinar as técnicas necessárias para que eu pudesse mexer de maneira adequada nos equipamentos, materiais de laboratório e *softwares*. Agradeço, de modo especial, àqueles que, de certa forma, contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração e conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador, Dr. Louis Pergaud Sandjo, por nunca ter medido esforços para me ajudar e auxiliar ao longo deste trabalho, pela paciência e compreensão com as disciplinas e prazos, pelas palavras amigas e sugestões que levarei para além da vida acadêmica, e pelo seu exemplo de dedicação e persistência que muito me incentivam e motivam.

Ao professor Dr. Valfredo Schlemper, pela parceria neste trabalho, por ter fornecido a planta em estudo e realizado os ensaios biológicos nos animais.

A cidade de Florianópolis, acolhedora e bela, pelos momentos únicos e especiais, por cada cantinho repleto de beleza que enchem meus olhos e são oásis

em meio a correria, por cada pessoa que permitiu que eu encontrasse e conhecesse, pelos vários lugares, que são descanso e acalento para o coração.

Por fim, à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por todas as diferentes experiências proporcionadas, ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ), pelas dúvidas sanadas, aos técnicos e à Central de Análises do Departamento de Química, pelos equipamentos emprestados e dados adquiridos, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela bolsa de pesquisa (Nº 2021TR000341) e a todos os órgãos de fomento que financiaram esse projeto.

“Para tudo isto, é preciso: a oração contínua para obter de Deus a graça sem a qual as nossas forças são vãs; organização e disciplina para estarmos prontos para a ação no momento oportuno e, finalmente, o sacrifício das nossas paixões e de nós mesmos, porque sem isso não se pode atingir o objetivo” (FRASSATI, 1922).

RESUMO

Os antibióticos são amplamente utilizados na criação industrial de suínos como aditivos alimentares para promover o crescimento e controlar a proliferação de microrganismos patogênicos que podem afetar negativamente a saúde dos animais e consequentemente trazer prejuízo econômico. De acordo com pesquisas recentes, os antibióticos mais usados em fazendas de suínos são a amoxicilina, penicilina, enrofloxacina e canamicina. Apesar dos benefícios, observam-se problemáticas quanto ao uso dessas substâncias, uma vez que sua contribuição veterinária colabora para a resistência de bactérias patogênicas em humanos trazendo riscos à saúde pública, além de ser altamente prejudicial para os aquíferos devido à baixa absorção no intestino do animal. Devido a associação de bactérias multirresistentes em humanos juntamente à problemática supracitada, se faz necessário à busca por alternativas que possam substituir os antibióticos na pecuária. Uma alternativa é a introdução de plantas comestíveis que possuem compostos fitobióticos. A planta em estudo no presente trabalho, *Marrubium vulgare* é conhecida na literatura por suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antiparasitárias e antioxidantes, devido à presença de metabólitos secundários como flavonóides, diterpenos e ácidos fenólicos. Os extratos dessa planta foram utilizados para avaliação de efeitos fitobióticos e bioestimulantes na criação de suínos recém-desmamados. As amostras foram preparadas por infusão em água e administradas via oral nos animais, que foram pesados semanalmente para acompanhar seu crescimento. O ensaio se deu com um grupo de 30 suínos, cinco grupos de 6 animais que receberam solução fisiológica, clenbuterol e doses dos extratos de infusão (1, 10 e 20% mL de extrato/ kg animal) por 28 dias. Também se realizou a coleta de sangue semanalmente para análises hematimétrica e bioquímica para observar a saúde dos animais, no qual foram analisados os parâmetros bioquímicos, incluindo eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, níveis enzimáticos no sangue, entre outros. Para avaliar os compostos bioativos e seus produtos de degradação no metabolismo do animal, o soro foi separado do sangue e submetido a análise UPLC-ESI-MS. Foi observado que as doses MVI 1 e 10% (mL extrato/ kg animal) levaram a ganho de peso superior aos controles negativo e positivo, além de não terem sido observadas alterações significativas nos parâmetros bioquímicos e níveis enzimáticos no sangue. Os dados de UPLC-ESI-MS do soro animal mostraram a presença de um diterpeno, um flavonóide e diversos derivados do ácido cólico. Os resultados obtidos nestas análises indicaram que a *M. vulgare* é um potencial aditivo para produção pecuária. Os extratos de infusão aquosa também foram submetidos a UPLC-ESI-MS, após dereplicação o perfil químico indicou a presença de 33 metabólitos secundários. Através de técnicas cromatográficas foram isolados dois compostos conhecidos da *Marrubium vulgare* L., caracterizados por técnicas espectroscópicas sendo eles a marrubiína e a apigenina.

Palavras-chave: *Marrubium hamatum* 1; Marroio 2; Efeitos fitogênicos 3; UPLC-ESI-MS 4; Criação de suínos 5.

ABSTRACT

Antibiotics are widely used in industrial pig farming as food additives to promote growth and control of pathogenic microorganisms that can harm the health of animals and consequently bring economic losses. According to recent research, the types of antibiotics most used in pig farms were amoxicillin, penicillin, enrofloxacin and kanamycin. Despite the benefits, there is a concern with the use of these substances, since their veterinary impact contributes to the resistance of pathogenic bacteria in humans, bringing risks to public health, in addition to being highly harmful to aquifers due to low absorption in the animal's intestine. Considering the threat of multidrug-resistant bacteria in humans and the aforementioned problem, it is necessary to look for alternatives that can replace specific antibiotics. An alternative is the introduction of edible plants that contain phytochemical compounds. The plant under study in the present work, *Marrubium vulgare*, is already known in the literature for its anti-inflammatory, antimicrobial, antiparasitic and antioxidant properties, due to secondary metabolites present in species, such as flavonoids, diterpenes and phenolic acids. Extracts from this plant were used to evaluate its phytochemical and biostimulant effects in the raising of recently weaned pigs. The samples were prepared by infusion in water and administered orally to animals, which were weekly weighed to monitor their growth. The experiment was carried out on a group of 30 animals, five groups of 6 animals that received saline solution, clenbuterol and doses of infusion extracts (1, 10 and 20% mL of extract/ animal kg) for 28 days. Blood was also collected for hematimetric and biochemical analyzes. the health of the animals was evaluated by biochemical parameters, including erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume, enzyme levels in the blood, among others. To evaluate plant active compounds and its degradation products in the animal's metabolism, the serum was separated from the blood and UPLC-ESI-MS analysis was performed. It was observed that MVI 1 group and doses of 10% (mL of extract/animal kg) led to greater weight gain than negative and positive controls, in addition to no significant changes in biochemical parameters and enzymatic levels in the blood. UPLC-ESI-MS data from animal serum showed the presence of a diterpene, a flavonoid and several cholic acid derivatives. The results obtained in these analyzes indicated *M. vulgare* as a potential food additive for livestock production. The aqueous infusion extracts were also subjected to UPLC-ESI-MS showing the presence of 33 secondary metabolites. Through chromatographic techniques, two known compounds from *Marrubium vulgare* L. were isolated and characterized by spectroscopic techniques as marrubiin and apigenin.

Keywords: *Marrubium hamatum* 1; Marroio 2; Phytochemical effects 3; UPLC-ESI-MS 4; Pig farming 5.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplo de plantas da família Lamiaceae a. <i>Salvia viscida</i> ; b. <i>Hyptis monticola</i> ; c. <i>Vitex sellowiana</i> Cham.; d. <i>Hyptis radicans</i>	25
Figura 2 – Imagens da planta <i>Marrubium vulgare</i> L.....	27
Figura 3 – Compostos identificados na espécie <i>Marrubium vulgare</i> L.	29
Figura 4 – Fotos da planta <i>Marrubium vulgare</i> L. coletada	33
Figura 5 – Extração por maceração exaustiva	34
Figura 6 – Extrato hidroalcolico obtido através de filtração simples	35
Figura 7 – Fracionamento líquido-líquido realizado no funil de separação	36
Figura 8 – Colunas cromatográficas.....	37
Figura 9 – Esquema de isolamento dos constituintes químicos da fração de AcOEt das flores	39
Figura 10 – Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de algumas frações	39
Figura 11 – Administração do extrato aquoso de <i>M. vulgare</i> através de sonda orogástrica plástica	41
Figura 12 – Coleta de sangue por punção venosa da veia jugular externa.....	43
Figura 13 – Efeitos da infusão de <i>M. vulgare</i> (MVI) no ganho de peso dos animais.48	
Figura 14 – Ganho de peso global dos suínos tratados com infusão de <i>M. vulgare</i> (MVI)	49
Figura 15 – Índice global de conversão alimentar (GCA) de suínos tratados com infusão de <i>M. vulgare</i> (MVI)	50
Figura 16 – Concentrações de eritrócitos (A), hemoglobina (B), hematócrito (C) e Volume Corpuscular Médio (D) dos suínos tratados com infusão de <i>M. vulgare</i> L. (MVI) em amostras de sangue periférico	52
Figura 17 – Leucócitos totais (A), neutrófilos (B), linfócitos (C) e monócitos (D) de suínos tratados com infusão de <i>M. vulgare</i> (MVI) em amostras de sangue periférico	54
Figura 18 – Espectro de UPLC-ESI-MS do extrato de infusão de <i>M. vulgare</i> L.	57
Figura 19 – Estrutura química elucidada do composto 1 (Mv1)	67
Figura 20 – Estrutura química elucidada do composto 2 (Mv2)	69
Figura 21 – Cromatograma obtido por UPLC-MS do soro animal obtido nos modos de ionização negativo e positivo.....	71

Figura 22 – Esquema de padrão de fragmentação para caracterização do metabólito sanguíneo m/z 541,1145 no pico 35	74
Figura 23 - Esquema de padrão de fragmentação para caracterização do metabólito sanguíneo m/z 303,2330 no pico 42	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massa obtida nos fracionamentos do extrato bruto de <i>M. vulgare</i> L.	36
Tabela 2 – Dados das colunas cromatográficas realizadas para <i>M. vulgare</i> L.....	38
Tabela 3 – Condições da fase móvel da corrida cromatográfica.....	45
Tabela 4 – Parâmetros de função hepática e renal dos animais após 28 dias de tratamento com <i>M. vulgare</i>	55
Tabela 5 – Perfil químico por UPLC-ESI-MS do extrato de infusão de <i>M. vulgare</i> L.	61
Tabela 6 – Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (CDCl ₃) de Mv1 em comparação com a literatura para marrubiína	68
Tabela 7 – Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (DMSO) de Mv2 em comparação com a literatura para Apigenina	69
Tabela 8 – Perfil químico por UPLC-ESI-MS do soro do sangue animal	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de Etila
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
BuOH	Butanol
C	Controle negativo
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GGT	Gamaglutamiltransferase
Hex	Hexano
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
MeOH	Metanol
MVI	Infusão aquosa de <i>Marrubium vulgare</i> L.
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Controle Positivo
Ppm	Partes por milhão
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	Rotações por minuto
TMS	Tetrametilsilano
UPLC-ESI-MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas)
VCM	Volume Corpuscular Médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. METABÓLITOS OBTIDOS DE PLANTAS MEDICINAIS COM EFEITOS DE CRESCIMENTO EM ANIMAIS	22
2.2. FAMÍLIA LAMIACEAE	24
2.3. ESPÉCIE <i>MARRUBIUM VULGARE</i> L.	26
2.3.1. Marcadores quimiotaxonômicos da espécie <i>Marrubium vulgare</i> L.	28
2.4. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4. PARTE EXPERIMENTAL	32
4.1. MATERIAIS E INSTRUMENTAÇÃO.....	32
4.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA <i>MARRUBIUM VULGARE</i> L.....	33
4.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE <i>M. VULGARE</i> L. PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA	34
4.3.1. Particionamento líquido-líquido de <i>Marrubium vulgare</i> L.	35
4.4. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>M. VULGARE</i> L.....	36
4.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS	40
4.5.1. Princípios éticos na experimentação animal	40
4.5.2. Preparação de amostras para administração oral	40
4.5.3. Administração oral do extrato bruto aquoso	40
4.5.4. Análise do Índice Global de Conversão Alimentar (GCA)	42
4.5.5. Coleta de sangue	42
4.5.6. Análise hematimétrica e bioquímica do sangue	43
4.5.7. Análise estatística	44
4.6. ANÁLISES FITOQUÍMICAS E SANGUÍNEAS.....	45
4.6.1. Preparo de amostra para UPLC-ESI-MS	45
4.6.2. Método de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa (UPLC-ESI-MS)	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1. PARÂMETROS BIOLÓGICOS	47

5.1.1.	Efeitos do extrato de infusão de <i>M. vulgare</i> (MVI) no ganho de peso dos animais	47
5.1.2.	Análise das células sanguíneas	51
5.1.3.	Análise bioquímica e metabólica.....	54
5.2.	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>M. VULGARE</i> L.	55
5.2.1.	Caracterização dos constituintes químicos de <i>M. vulgare</i> L. através de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas	56
5.2.2.	Purificação fitoquímica.....	67
5.2.2.1.	Composto 1 - Marrubiína (Mv1).....	67
5.2.2.2.	Composto 2 - Apigenina (Mv2).....	68
5.3.	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS NO SORO ANIMAL.....	70
5.3.1.	Análise por UPLC-ESI-MS do soro animal.....	70
6.	CONCLUSÃO.....	77
	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICE A – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 1 (MV1) - MARRUBIÍNA	90
	APÊNDICE B – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (200 MHZ, CDCL ₃) DO COMPOSTO 1 (MV1)	91
	APÊNDICE C – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (50 MHZ, CDCL ₃) DO COMPOSTO 1 (MV1)	92
	APÊNDICE D – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 2 (MV2) - APIGENINA	93
	APÊNDICE E – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (200 MHZ, DMSO) DO COMPOSTO 2 (MV2)	94
	APÊNDICE F – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (50 MHZ, DMSO) DO COMPOSTO 2 (MV2)	95
	APÊNDICE G – EOSINÓFILOS DE SUÍNOS RECÉM-DESMAMADOS TRATADOS COM INFUSÃO DE <i>M. VULGARE</i> (MVI).....	96

1. INTRODUÇÃO

A medicina tradicional é praticada há milênios, resultando em uma rica herança de conhecimento e vasta influência no uso profilático e terapêutico de medicamentos fitoterápicos (WATANABE; SHIBUYA, 2003). Os compostos químicos de interesse nas plantas são chamados de metabólitos, que podem ser divididos em primários ou secundários. Esses últimos dentro da fitoterapia, são moléculas que muitas vezes apresentam estruturas químicas diversas, de baixa massa molecular sintetizadas por plantas, fungos, bactérias, algas e animais, que podem ser classificados em terpenos (glicosídeos cardíacos, carotenóides e esteróis), fenóis (flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, estilbenos, taninos e lignina) e compostos contendo nitrogênio (alcalóides e glucosinolatos) (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

Esses metabólitos são também agentes quimiotaxonômicos, sendo associados a espécies que constituem um determinado grupo filogenético e compostos bioativos de plantas medicinais, aromáticas, corantes e condimentares e estão relacionados a adaptação das espécies ao *habitat* natural, bem como nas interações multitróficas quimicamente mediadas (AGOSTINI-COSTA et al., 2012; KHARE et al., 2020). As plantas medicinais, sua composição química e suas propriedades biológicas em humanos oferecem várias possibilidades de exploração em ciências veterinárias e agrárias.

Sabe-se também que a constituição química é distinta para cada parte da planta, e que condições ambientais, como clima, altitude, época de coleta, ritmo circadiano e fatores ontogênicos influenciam na biossíntese dos metabólitos secundários (ERB; KLIEBENSTEIN, 2020). Por conta disso, faz-se necessário salientar que a planta estudada no presente trabalho é a *Marrubium vulgare* L. coletada no dia 8 de novembro de 2021 no município de Bom Retiro, Santa Catarina. Em vista da rica diversidade e aplicações dos metabólitos, a utilização de produtos naturais no contexto da suinocultura tem ganhado atenção nos últimos anos por conta de seus potenciais benefícios para promover o crescimento, melhorar a saúde intestinal e reduzir o uso de antibióticos na produção pecuária (PLACHA; GAI; POGÁNY SIMONOVÁ, 2022).

Já é de conhecimento que os antibióticos são utilizados a décadas na pecuária, bem como na criação industrial de suínos como aditivos alimentares para promover o crescimento e regular a proliferação de microrganismos patogênicos, prevenindo os animais de doenças infecciosas, podendo trazer vantagens econômicas devido ao rápido crescimento dos animais (CHAN et al., 2022; DE ALMEIDA OLLÉ et al., 2017; POKHAREL; SHRESTHA; ADHIKARI, 2020). Apesar dos benefícios ressaltados, existe uma problemática em torno do uso exacerbado desses antibióticos, que podem favorecer resistência a bactérias patogênicas trazendo riscos à saúde pública, além de serem altamente prejudiciais aos aquíferos devido à baixa absorção no intestino do animal (OLLÉ et al., 2017; CHAN et al., 2022).

De acordo com o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), o uso indevido e excessivo de antibióticos em humanos e pelas indústrias agroalimentares são as principais causas da resistência dos patógenos humanos aos antibióticos, se tornando uma preocupação global para o sistema de saúde, uma vez que contribuiu para 4,95 milhões de mortes globais em 2019, sendo responsável diretamente por 1,27 milhões delas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023), impelindo muitos países a adotar regulamentações que restringem ou até mesmo proíbem antibióticos na agroindústria (POKHAREL; SHRESTHA; ADHIKARI, 2020).

O uso de antibióticos e hormônios sintéticos pode ser reduzido adicionando aditivos fitogênicos na forma de extratos à ração ou introduzindo plantas comestíveis na alimentação dos animais. No setor de rações, as plantas medicinais são utilizadas por suas substâncias com características biológicas distintas, como atividades antimicrobianas, imunomoduladoras, antiestresse e estimulantes do crescimento, contribuindo para a diminuição do uso de antibióticos (BUTAYE; DEVRIESE; HAESBROUCK, 2003; HASHEMI; DAVOODI, 2011; IVANOVA et al., 2024). Além disso, estudos anteriores que se basearam na atividade antimicrobiana que ocorreu através da modulação do sistema imunológico do hospedeiro (LEE et al., 2011), mostraram que a administração diária durante 28 dias de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) em porcos levou a um aumento de peso de 2,81% (MANUELIAN et al., 2021).

Os compostos fitobióticos são substâncias bioativas derivadas das plantas, que podem promover o bem estar e saúde dos animais. Apesar das evidências experimentais serem limitadas e pouco exploradas, há uma suposição que esses compostos podem aumentar atividades de enzimas digestivas, melhorar a absorção de nutrientes e reduzir colônias bacterianas, refletindo numa melhora do equilíbrio intestinal. Esses benefícios podem respaldar os estudos que relatam melhoras na saúde e crescimento dos animais após o fornecimento de aditivos fitogênicos (WINDISCH et al., 2008).

Em vista disso, foi estudado as propriedades fitogênicas do extrato de infusão aquosa de *Marrubium vulgare*, planta comum na região serrana do estado de Santa Catarina, em leitões recém desmamados. Essa planta possui atividades já reportadas na literatura como anti-inflamatórias, antimicrobianas, antiparasitárias e antioxidantes, devido aos metabólitos secundários presentes na espécie como flavonóides, diterpenos, ácidos fenólicos, ácidos fenilpropanóides, ácido clorogênico, flavonóides glicosilados, monoterpenos e sesquiterpenos (AĆIMOVIĆ et al., 2020).

Baseando-se na literatura pode-se dizer que os metabólitos são promissores para crescimento de animais de consumo como aves, gados e suínos, porém os seus potenciais efeitos adversos e limitações necessitam de investigação abrangente para garantir a utilização de plantas medicinais de forma segura e eficaz na produção de suínos. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos de extratos de infusão de *M. vulgare* no metabolismo e crescimento de suínos recém-desmamados através de parâmetros bioquímicos e avaliar o perfil químico do extrato aquoso, bem como a presença dos seus metabólitos no sangue e soro dos animais por meio de UPLC-ESI-MS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. METABÓLITOS OBTIDOS DE PLANTAS MEDICINAIS COM EFEITOS DE CRESCIMENTO EM ANIMAIS

A medicina tradicional é praticada há milênios, resultando em uma rica herança de conhecimento e vasta influência no uso profilático e terapêutico de medicamentos fitoterápicos (WATANABE; SHIBUYA, 2003). Desse modo, é possível dizer que a fitoquímica é um campo de estudo que possui grande importância já que se dedica na obtenção de substâncias químicas com potencial biológico, além de visar a obtenção de derivados semissintéticos e sintéticos de protótipos com interesse medicinal (SIMÕES et al., 2016; YUNES; CECHINEL FILHO, 2016).

Os compostos químicos de interesse nas plantas são chamados de metabólitos, que podem ser divididos em primários ou secundários. O metabolismo primário consiste em um conjunto de processos comuns, que levam à síntese de substâncias fundamentais para a manutenção dos processos vitais da planta, como os carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (DEWICK, 2009). Já os metabólitos secundários são moléculas, muitas vezes complexas, sintetizadas por plantas, fungos, bactérias, algas e animais, que podem ser classificados em terpenos (glicosídeos cardioativos, carotenóides e esteróis), fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, estilbenos, taninos e lignina) e compostos contendo nitrogênio (alcalóides e glucosinolatos) (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

Metabólitos secundários são importantes agentes quimiotaxonômicos, sendo associados a espécies que constituem um determinado grupo filogenético e compostos bioativos de plantas medicinais, aromáticas, corantes e condimentares e estão relacionados a adaptação das espécies ao *habitat* natural, bem como nas interações multitróficas quimicamente mediadas (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

Sabe-se também que a constituição química é distinta para cada parte da planta, e que condições ambientais, como clima, altitude, época de coleta, ritmo circadiano e fatores ontogênicos influenciam na biossíntese dos metabólitos secundários. Devido à rica diversidade e aplicações dos metabólitos, a utilização de produtos naturais no contexto da suinocultura tem ganhado atenção nos últimos

anos por conta de seus potenciais benefícios para promover o crescimento, melhorar a saúde intestinal e reduzir o uso de antibióticos na produção pecuária (PLACHA; GAI; POGÁNY SIMONOVÁ, 2022).

É de conhecimento que os antibióticos são amplamente utilizados na criação industrial de suínos como aditivos alimentares para promover o crescimento e regular a proliferação de microrganismos patogênicos, prevenindo os animais de doenças infecciosas, podendo trazer vantagens econômicas devido ao rápido crescimento dos animais, mas gerar prejuízos à sua saúde (CHAN et al., 2022; DE ALMEIDA OLLÉ et al., 2017; POKHAREL; SHRESTHA; ADHIKARI, 2020). De acordo com pesquisas recentes, os tipos de antibióticos mais usados em fazendas de suínos são a amoxicilina, penicilina, enrofloxacina e canamicina. Apesar dos benefícios ressaltados, há preocupação no uso exacerbado desses antibióticos, os quais podem favorecer resistência em bactérias patogênicas, trazendo riscos à saúde pública, além de serem altamente prejudiciais aos aquíferos devido à baixa absorção no intestino do animal (CHAN et al., 2022; DE ALMEIDA OLLÉ et al., 2017).

De acordo com o relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS), o uso indevido e excessivo de antibióticos em humanos e pelas indústrias agroalimentares são as principais causas da resistência dos patógenos humanos aos antibióticos, se tornando uma preocupação global para o sistema de saúde, uma vez que contribuiu para 4,95 milhões de mortes globais em 2019, sendo responsável diretamente por 1,27 milhões delas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2023). Esses dados impeliram muitos países a adotarem regulamentações que restringem ou até mesmo proíbem antibióticos na agroindústria (POKHAREL; SHRESTHA; ADHIKARI, 2020).

Em 2006, a União Europeia emitiu um regulamento sobre aditivos alimentares para proibir antibióticos utilizados para fins não medicinais (EUROPEAN COMMISSION, 2005), mas só em 2017, a OMS se pronunciou sobre a correlação entre antibióticos e sua resistência aos patógenos, recomendado a interrupção da sua utilização como promotores de crescimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Devido a isso, uma alternativa para substituir o uso dos antibióticos é a introdução de plantas comestíveis que possuem compostos fitobióticos aos animais

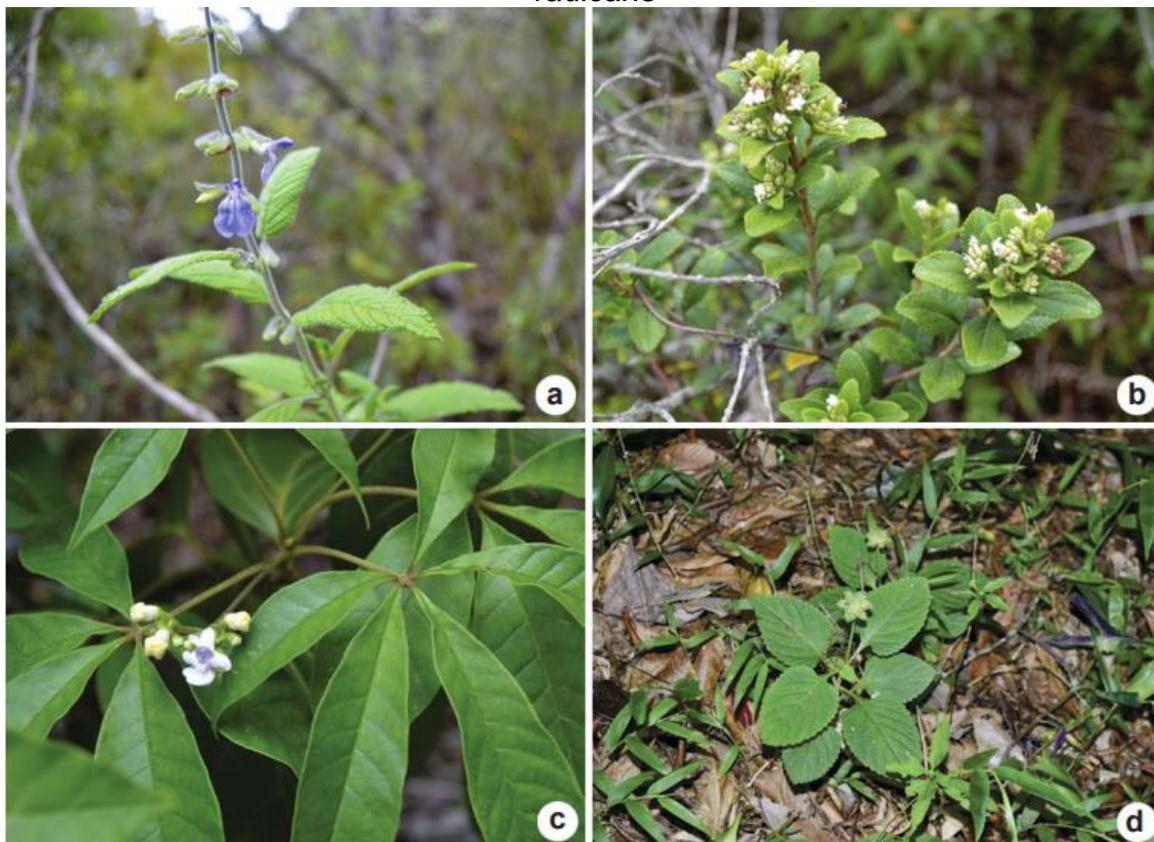
(BUTAYE; DEVRIESE; HAESEBROUCK, 2003; HASHEMI; DAVOODI, 2011). Estudos anteriores mostraram que a administração diária durante 28 dias de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) em porcos levou a um aumento de peso ganho de 2,81% (MANUELIAN et al., 2021), o mesmo se deu no desempenho de crescimento de frangos que receberam doses de tomilho (*Thymus vulgaris*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) (HASHEMI; DAVOODI, 2011). Esses estudos se basearam na atividade antimicrobiana que ocorreu através da modulação do sistema imunológico do hospedeiro (LEE et al., 2011).

2.2. FAMÍLIA LAMIACEAE

As Lamiaceae, também conhecida como Labiatae, é uma família de plantas angiospermas que engloba uma ampla variedade de ervas aromáticas e plantas ornamentais. É reconhecida por suas características distintivas, como folhas opostas, serrilhadas e frequentemente aromáticas devido à presença de óleos essenciais. Suas flores são frequentemente pequenas, podendo formar inflorescências vistosas. A morfologia da flor é frequentemente do tipo bilabiada, onde a corola é dividida em dois lábios, com o lábio superior e inferior formando uma estrutura labiada. Geralmente possuem caules quadrados, o que é uma característica distintiva. São em sua maioria plantas herbáceas ou arbustivas (JOLY, 1977).

É uma das maiores famílias de plantas com flores (Figura 1), abrangendo cerca de 250 gêneros e mais de 7.000 espécies reconhecidas (Napoli et al., 2020). Sua distribuição é global, mas muitas espécies são encontradas em regiões tropicais e subtropicais. Algumas espécies conhecidas dessa família são a menta (*Mentha*), o manjeriço (*Ocimum*), a sálvia (*Salvia*) e a lavanda (*Lavandula*) (KUBITZK, 2004).

Figura 1 – Exemplo de plantas da família Lamiaceae
a. *Salvia viscida*; b. *Hyptis monticola*; c. *Vitex sellowiana* Cham.; d. *Hyptis radicans*



Fonte: MOTA et al., 2017

Muitas plantas da família Lamiaceae tem sido exploradas para sua utilização como alimento funcional e medicinal devido às suas propriedades curativas e preventivas. Possuem um potencial uso em doenças cardiovasculares, por sua atividade antioxidante, anti-hiperlipidêmica ou hipocolesterolêmica, efeito vasorrelaxantes, ação antitrombótica e efeito diurético (MICHEL; ABD RANI; HUSAIN, 2020). Devido ao alto teor de compostos fenólicos, flavonóides, terpenóides que possuem atividade antimicrobiana seu uso é reportado em infecções por Giardia (ALNOMASY et al., 2021), além de servirem de tratamento para problemas respiratórios (HAILE et al., 2022) e de diabetes (ASADI-SAMANI et al., 2017).

Possuem também propriedades inseticidas (AMOABENG; JOHNSON; GURR, 2019; AVILA et al., 2022; HERNÁNDEZ-CARLOS; GAMBOA-ANGULO, 2019), antivirais (BEKUT et al., 2018), antinematodais (HERNÁNDEZ-CARLOS; GAMBOA-ANGULO, 2019), e antimicrobianas (ALNOMASY et al., 2021; HAO et

al., 2022). De modo geral, essas plantas possuem óleos essenciais e extratos ricos com vários constituintes bioativos, como compostos fenólicos, flavonóides, e terpenóides, de interesse biológico por suas atividades farmacológicas com potencial em diversas aplicações, desde pesticidas até medicamentos. Seu estudo revela uma gama de atividades biológicas e químicas, destacando seu valor tanto na pesquisa científica quanto na aplicação prática (SKENDI; IRAKLI; CHATZOPOULOU, 2017).

2.3. ESPÉCIE *MARRUBIUM VULGARE* L.

O gênero *Marrubium* que pertence à família Lamiaceae compreende quarenta e oito espécies, dentre as quais está a *Marrubium vulgare* L., planta nativa do planalto oeste europeu. A espécie foi trazida ao Brasil por colonizadores, e se adaptou ao planalto serrano catarinense, podendo ser encontrada nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (AL-ZABAN; NAGHMOUCHI; ALHARBI, 2021; BITTENCOURT, 2003; MEYRE-SILVA; CECHINEL-FILHO, 2010)

A *M. vulgare* L. é uma planta herbácea (Figura 2), com caule quadrangular medindo de 40 a 60 cm de altura, folhas ovais-arredondadas de 4 a 5 cm de comprimento e flores em pseudo verticilos possuindo de 20 a 50 flores, localizadas nas axilas das folhas superiores (CORRÊA, 1984 apud BITTENCOURT, 2003). É popularmente conhecida como marroio, marroio-branco, marroio-comum e maromba, sendo a sua infusão usada como estimulante. No Marrocos é usada como uma planta medicinal por seus efeitos curativos (CECHINEL FILHO, 2000; MSSILLOU et al., 2021).

Figura 2 – Imagens da planta *Marrubium vulgare* L.

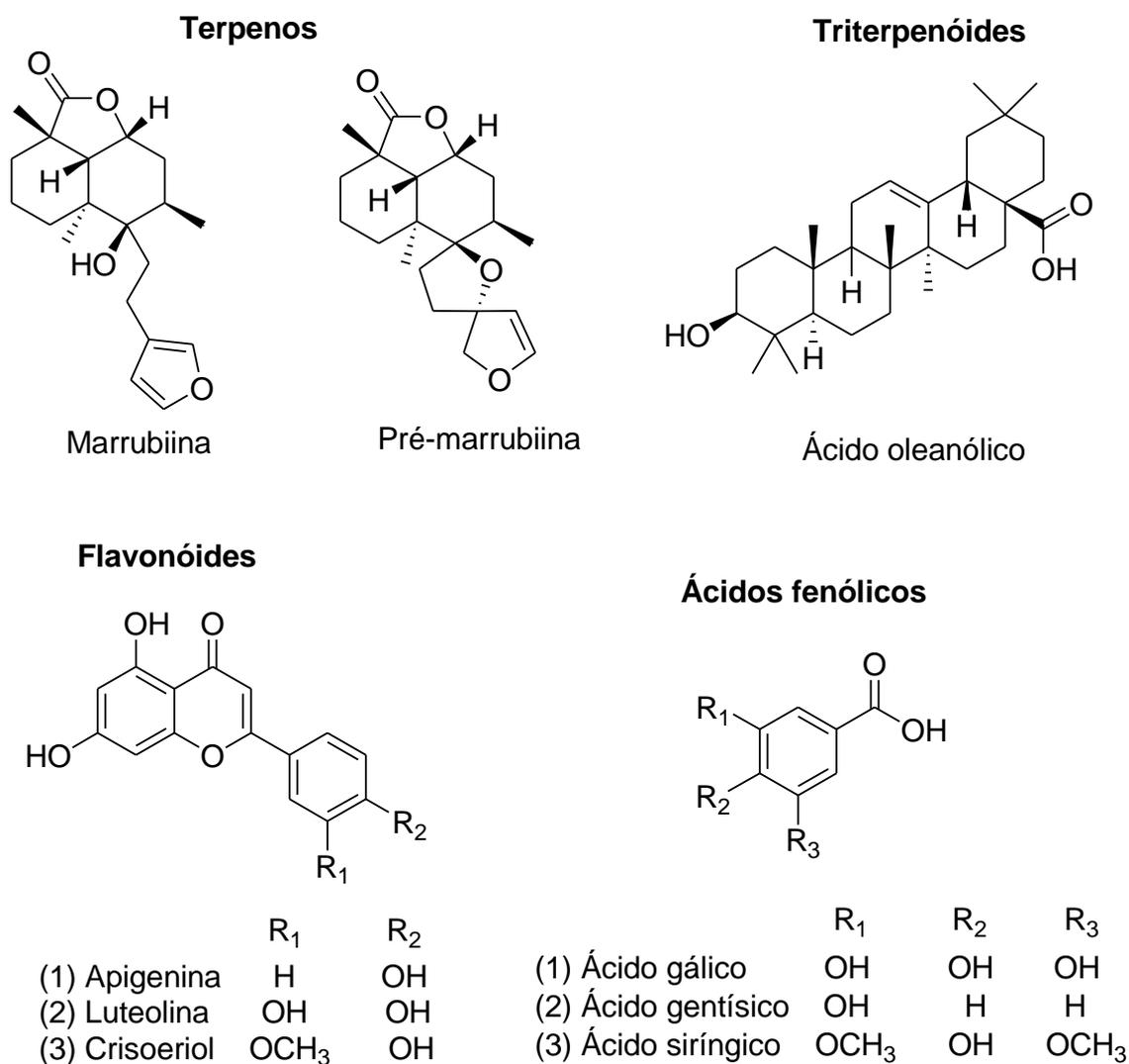
Fonte: CONSELHO DE CURADORES DO ROYAL BOTANIC GARDENS, 2024

A planta é rica em compostos químicos como polifenóis, diterpenos, saponinas e taninos, sendo assim um potencial agente terapêutico para o tratamento de diversas doenças, como problemas gastroentéricos, doenças respiratórias, e renais (AL-ZABAN; NAGHMOUCHI; ALHARBI, 2021; CECHINEL FILHO, 2000; MSSILLOU et al., 2021), que podem ser justificados por suas atividades antioxidantes, antifúngicas, hipoglicemiantes, hipotensoras, antibacterianas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antiespasmódicas, antinociceptivas e inseticidas. Além disso, possui efeitos, vasorrelaxantes e analgésicos (MEYRE-SILVA; CECHINEL-FILHO, 2010; REZGUI et al., 2020).

De acordo com estudos realizados, constatou-se que o efeito analgésico que a planta possui é devido ao seu composto majoritário, a marrubiína (produzida em maior concentração nas partes aéreas da planta), sendo mais pronunciado do que o ácido acetilsalicílico, indometacina e diclofenaco, quando testadas em camundongos (SCHLEMPER et al., 1996; DE JESUS et al., 2000).

2.3.1. Marcadores quimiotaxonômicos da espécie *Marrubium vulgare* L.

A *Marrubium vulgare* L. possui marcadores quimiotaxonômicos distintos (Figura 3) pertencentes à classe química de terpenos, flavonoides e ácidos fenólicos que desempenham um papel crucial na identificação e classificação taxonômica da espécie. Estudos anteriores demonstraram que a marrubiína é a considerada o principal marcador quimiotaxonômico não só para a espécie, mas também para o gênero *Marrubium* (AMRI et al., 2017), seguida do seu precursor pré-marrubiína. Entre os flavonóides, é possível encontrar apigenina, luteolina, crisoeriol, e derivados de flavonas, como as lactoiflavonas. Possui ácidos fenólicos como, ácido gálico, ácido gentísico e ácido siríngico. Além disso nos extratos de *M. vulgare*, podem ser encontrados triterpenóides, como ácido oleanólico e entre outros (AĆIMOVIĆ et al., 2020). A espécie também produz óleo essencial com monoterpenos, como canfeno, *p*-cimol, fencheno, limoneno, α -pineno, sabineno e α -terpinoleno (YABRIR, 2019).

Figura 3 – Compostos identificados na espécie *Marrubium vulgare* L.

Fonte: elaborado pela autora

Estes marcadores são compostos por vários metabólitos secundários, englobando principalmente as classes citadas, porém é importante ressaltar que a composição química da espécie pode ser influenciada por alterações ambientais. Além disso, como já mencionado, foi demonstrado que esses compostos possuem diversas atividades biológicas, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacterianas, o que contribui para o valor medicinal da planta.

2.4. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS

Existem algumas metodologias para a preparação de extratos vegetais, tendo em vista o isolamento dos compostos químicos. Segundo Cechinel Filho e Yunes (1998), um dos métodos considerados “adequados para a análise químico-farmacológica é a preparação de um extrato hidroalcoólico (etanol/água 50/50, v/v)”, utilizando grandes quantidades de planta, para que seja possível determinar constituintes que estão em baixa concentração (KUMAR et al., 2023).

Se porventura, este extrato apresentar efeitos biológicos procede-se com um método sistemático de estudo, submetendo-o a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de diferentes polaridades, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Para se obter os princípios ativos, estes extratos particionados devem ser isolados e purificados através de técnicas cromatográficas como a cromatografia em coluna aberta, tendo sílica gel como fase estacionária, e cromatografia de camada delgada para reunir as frações obtidas de acordo com seu perfil cromatográfico (FOTSING YANNICK STÉPHANE et al., 2022; MARINI-BETTÒLO et al., 1981). Em seguida, esses constituintes isolados devem ser extensivamente caracterizados através de métodos espectroscópicos e espectrométricos, e cromatográficos hifenados (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; SALEM et al., 2020).

Posteriormente podem ser feitas algumas modificações estruturais na molécula, a fim de introduzir grupos que gerem maior ou menor hidrofobicidade, ou grupos doadores ou aceptores de elétrons, que gerem correlação entre a estrutura química e a atividade biológica. Essas modificações também podem ser feitas para compostos inativos, apoiando-se na similaridade com compostos de ação biológica conhecida (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998). Além disso, os compostos naturais ativos podem ser usados como modelos para a síntese de substâncias análogas mais potentes e seletivas, que muitas vezes podem ser obtidas de maneira simples e a baixo custo. Muitos dos fármacos que se tem disponíveis na indústria farmacêutica foram obtidos sinteticamente com base em estruturas naturais ativas (BARREIRO et al., 1997; KUMAR et al., 2023; MONTANARI, 1995).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar os metabólitos secundários de *Marrubium vulgare* L. através de métodos cromatográficos, espectroscópicos e espectrométricos. Avaliar a propriedade fitogênica da infusão aquosa das partes aéreas de *M. vulgare* (MVI) em leitões recém-desmamados, bem como identificar o perfil químico da planta e dos metabólitos no sangue dos animais.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar e identificar a planta *Marrubium vulgare* L.;
- Obter extrato hidroalcólico e particionado em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol dos diferentes órgãos vegetativos para investigação fitoquímica.
- Obter o extrato fluído por infusão aquosa das partes aéreas da planta para investigação fitoquímica e metabolômica.
- Identificar metabólitos presentes no extrato aquoso de *Marrubium vulgare* L. através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (UPLC-ESI-MS);
- Isolar os compostos majoritários da planta através de métodos cromatográficos;
- Caracterizar os metabólitos secundários isolados através de técnicas espectroscópicas, como Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Avaliar os efeitos fitogênicos dos extratos brutos da planta no crescimento dos suínos;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos dos animais;
- Identificar os metabólitos da planta presentes no sangue dos animais em estudo por UPLC-ESI-MS.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS E INSTRUMENTAÇÃO

Na preparação dos extratos hidroalcoólicos foram utilizados água destilada, submetida a destilação por osmose reversa no departamento de química da UFSC e álcool anidro da marca Rauter® (Gravataí, Rio Grande do Sul, Brasil), submetido a destilação no Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da UFSC. Para a infusão de *M. vulgare* (MVI) também foi utilizado água destilada.

Nos métodos de separação foram utilizados solventes de grau P.A., adquiridos de fontes comerciais e solventes de grau técnico da Quimidrol® (Joinville, Santa Catarina, Brasil) e Rauter®, submetidos a destilação no próprio laboratório, sendo eles hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt), butanol (BuOH), metanol (MeOH) e diclorometano (DCM).

Nas caracterizações por UPLC-ESI-MS, foram utilizados solventes de grau LC/MS (metanol, acetonitrila e água) adquiridos da Servylab® (representante Sigma-Aldrich/Merck no Brasil). O ácido fórmico foi fornecido pela Vetec® (Duque de Caxias, Brasil).

Nas separações e fracionamentos por cromatografia em coluna foi utilizado sílica gel Sigma-Aldrich® de granulação 70-230 mesh (0,063-0,2 mm) e nas análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel da mesma marca com revelador fluorescente com absorção em comprimento de onda de 245 nm. A revelação dos compostos nessas placas cromatográficas foi realizada por irradiação ultravioleta em comprimentos de onda de 254 e 365 nm, e imersão em solução de vanilina sulfúrica (15 g de vanilina, 250 ml de etanol e 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado) seguida de aquecimento com soprador térmico.

Os espectros de absorção na região do Infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro Bruker modelo Alpha utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr) de grau analítico.

Já os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D (¹H e ¹³C) foram registrados em espectrômetros Bruker 200 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno e os solventes adequados para solubilizar cada

amostra, como clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido (DMSO), sendo os deslocamentos químicos (δ) medidos em ppm.

As análises de UPLC-ESI-MS foram realizadas em um sistema Acquity UPLC H-Class (Waters, USA) equipado com um gerenciador de solvente quaternário, amostrador automático e forno de coluna acoplado a um espectrômetro de massa Waters Xevo® G2-S QToF (Waters®Co., USA) equipado com uma sonda de eletropulverização e analisadores de tempo de voo quadrupolo (QToF). A coluna utilizada foi do tipo ACQUITY UPLC BEH C18 50 mm, 2,1 mm, 1,7 μm , 130 Å.

Os equipamentos utilizados encontram-se na central de análise do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), com exceção do espectrômetro de massas, que se encontra no Departamento de Ciências Farmacêuticas da mesma universidade.

4.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA *MARRUBIUM VULGARE* L.

A coleta da *M. vulgare* L. (Figura 4) foi realizada no dia 8 de novembro de 2021 na cidade de Bom Retiro, Santa Catarina, nas coordenadas geográficas 27°47'50" Sul e 49°29'21" Oeste, em colaboração com o professor Dr. Valfredo Schlemper da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS). A espécie foi identificada por comparação com a exsicata armazenada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o número 26699.

Figura 4 – Fotos da planta *Marrubium vulgare* L. coletada



Fonte: autoria própria

4.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS DE *M. VULGARE* L. PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

A planta coletada foi dividida em caule, flores e folhas. Foi utilizado 1 kg de cada parte da planta e o material vegetal foi submetido à maceração exaustiva à temperatura ambiente em solventes orgânicos em uma proporção de 60% etanol:água por 19 dias em recipiente fechado (Figura 5). Posterior à fase de maceração, o extrato hidroalcolólico foi filtrado (Figura 6) e o solvente foi removido sob pressão reduzida em um evaporador rotatório, na qual obteve-se extratos brutos.

Figura 5 – Extração por maceração exaustiva



Fonte: autoria própria

Figura 6 – Extrato hidroalcolico obtido através de filtração simples



Fonte: autoria própria

4.3.1. Particionamento líquido-líquido de *Marrubium vulgare* L.

Os 3 extratos brutos (flores, folhas e galhos) foram submetidos ao particionamento realizado em um funil de separação com auxílio de solventes orgânicos (Figura 7), que seguiram ordem crescente de polaridade, iniciando com hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (BuOH), totalizando em 12 frações distintas. Cada particionamento foi feito com 600 mL do solvente orgânico e com 400, 500 ou 800 mL de extrato bruto explicitados na Tabela 1. Algumas dessas frações foram purificadas por cromatografia em coluna.

Figura 7 – Fracionamento líquido-líquido realizado no funil de separação



Fonte: autoria própria

O resultante de cada fracionamento foi colocado no rota-evaporador a fim de obter cada fração de forma concentrada. As frações foram pesadas em balança analítica para se obter a quantidade de massa (Tabela 1):

Tabela 1 – Massa obtida nos fracionamentos do extrato bruto de *M. vulgare* L.

Particionamento líquido-líquido dos extratos hidroalcóolicos			
Frações	Galhos	Folhas	Flores
Hexano partindo de 500mL de extrato bruto	0,1607 g	0,129 g	0,288 g
DCM partindo de 500mL de extrato	0,532 g	1,2047 g	0,885 g
AcOEt partindo de 800mL de extrato de flores/folhas e 400mL de extrato de galhos	2,1601 g	2,581 g	7,6167 g
BuOH partindo de 500mL de extrato bruto	2,947 g	2,1718 g	2,381 g

Fonte: elaborado pela autora

4.4. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *M. VULGARE* L.

Para o isolamento dos compostos foi utilizada a técnica de cromatografia em coluna. Foram realizadas cinco colunas cromatográficas, a fim de isolar os compostos majoritários da planta (Figura 8). Para isso, pegou-se alíquotas dos

extratos fracionados, que foram submetidas ao fracionamento em coluna cromatográfica, utilizando-se como fase estacionária um leito de sílica gel 60 (70-230 mesh / 0,063-0,2 nm - Sigma Aldrich) de 15 à 24 cm de altura por 2,5 à 6,5 cm de diâmetro.

Figura 8 – Colunas cromatográficas



Fonte: autoria própria

Como fase móvel utilizou-se uma mistura binária de hexano (Hex) e acetato de etila (AcOEt) ou de diclorometano (DCM) e metanol (MeOH). A eluição dessa fase móvel ocorreu por meio de um gradiente de polaridade, sendo obtidas frações de 125 - 150 mL cada, as quais foram concentradas e reunidas conforme semelhanças nos fatores de retenção (R_f) das manchas observadas nas placas de cromatografia em camada delgada (CCD). Os compostos obtidos foram purificados

por diferença de solubilidade e por recristalizações em solventes apropriados. Os dados referentes as colunas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados das colunas cromatográficas realizadas para *M. vulgare* L.

Fase estacionária um leito de sílica gel (70-230 MESH - Sigma Aldrich)			
Extratos/ Frações	Galhos	Folhas	Flores
Hexano	Não foi realizada	Não foi realizada	Não foi realizada
DCM Fase móvel DCM:MeOH	Altura = 16 cm Diâmetro = 6,5cm Pastilha = 0,37 g 56 frações obtidas	Não foi realizada	Altura = 24 cm Diâmetro = 2,5 cm Pastilha = 0,80 g 35 frações obtidas
AcOEt Fase móvel Hex:AcOEt	Não foi realizada	Altura = 15 cm Diâmetro = 5,5cm Pastilha = 1,51 g 86 frações obtidas	Altura = 16 cm Diâmetro = 5,5cm Pastilha = 5,32 g 145 frações obtidas
BuOH Fase móvel DCM:MeOH	Não foi realizada	Não foi realizada	Altura = 18 cm Diâmetro = 5,0 cm Pastilha = 2,0 g 91 frações obtidas

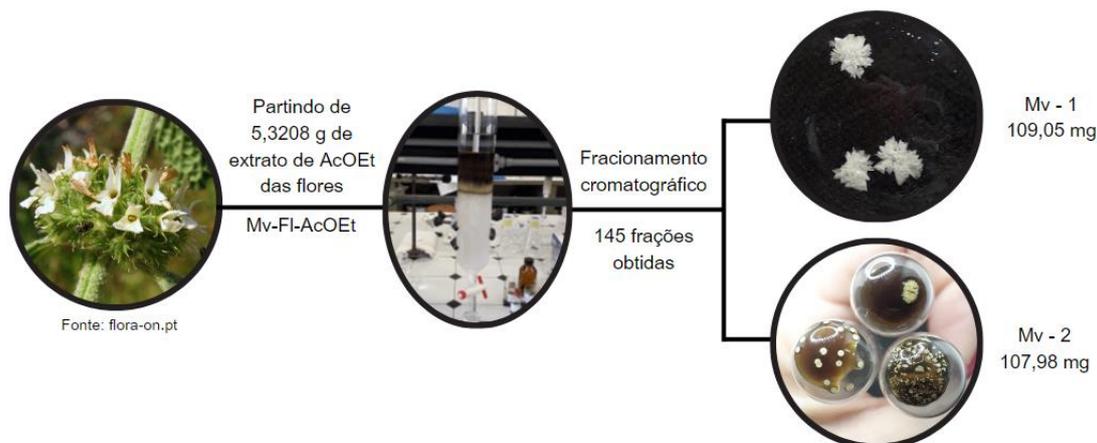
Fonte: elaborado pela autora

Nenhum extrato das frações hexânicas foram submetidos a cromatografia devido as pequenas quantidades obtidas de extrato 0,1607 g, 0,129 g, 0,288 g, nas respectivas frações de galhos, folhas e flores.

A partir de um estudo prévio de perfil químico, teve-se como objetivo o isolamento de compostos majoritários que puderam ser detectados por UPLC-ESI-MS. Dessa forma, se realizou uma análise fitoquímica preliminar dos doze extratos fracionados via CCD, para observar o extrato mais rico em metabólitos. A CCD comparativa dos compostos já isolados no estudo prévio indicou a presença dos compostos 1 e 2 na fração de acetato de etila das flores.

A partir disso, foi realizado a coluna cromatográfica do extrato de AcOEt das flores, obtendo dois compostos puros (Figura 9), o composto 1 conhecido como marrubiína (109,05 mg) foi obtido das frações 54-57 (eluídas com Hex/AcOEt 80:20), já o composto 2 conhecido como apigenina (107,98 mg) foi obtido das frações 97-102 (eluídas com Hex/AcOEt 60:40), recristalizado em isopropanol.

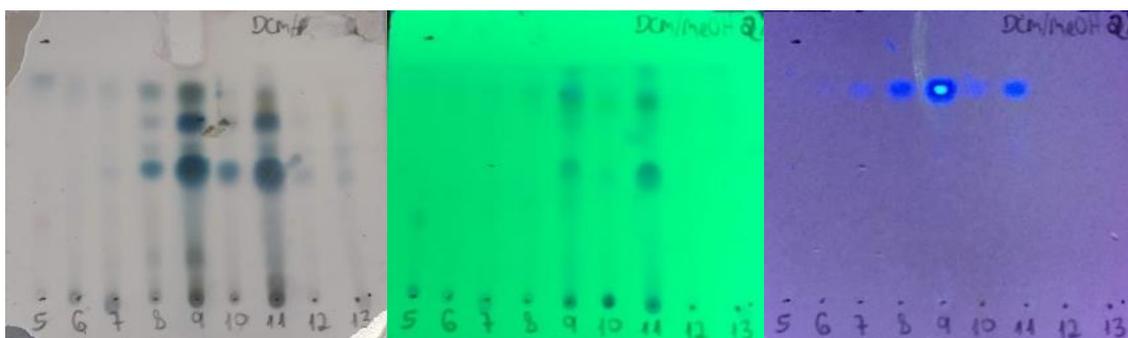
Figura 9 – Esquema de isolamento dos constituintes químicos da fração de AcOEt das flores



Fonte: elaborado pela autora

Nas outras frações submetidas a técnica de separação, obtiveram-se misturas que foram reagrupadas por similaridade de fator de Retenção (Rf). Conforme observado pela técnica de CCD, pode-se notar que os fatores de retenção (Rf) de cada substância são próximos entre si (Figura 10), desse modo, como já se partiu de quantidades pequenas para realizar as colunas cromatográficas, as subfrações obtidas tiveram quantidades ainda menores, dificultando uma nova purificação por outras colunas cromatográficas.

Figura 10 – Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de algumas frações



Fonte: autoria própria

Outras colunas foram realizadas a fim de se isolar mais compostos, entretanto como as massas dos extratos eram menores que a dos extratos de AcOEt das flores, não se isolou outros compostos.

4.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos foram realizados em parceria com o Professor Dr. Valfredo Schlemper da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Realeza, localizada no Paraná.

4.5.1. Princípios éticos na experimentação animal

Os seguintes experimentos foram realizados obedecendo aos princípios éticos básicos do bem-estar animal da Lei Arouca (Lei Federal n. 11.794/2008) que estabelece procedimentos para o uso científico de animais no Brasil (BRASIL, 2008). Também segue os princípios éticos de experimentação animal estabelecido pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal na Resolução CONCEA n. 66/2023, que trata sobre as condições de criação, manutenção e experimentação de suínos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, 2023).

A proposta deste trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o protocolo nº. 6088220221.

4.5.2. Preparação de amostras para administração oral

Para ser administrado oralmente aos suínos as partes aéreas da planta, previamente coletada, foi cortada em pequenos pedaços e extraído durante 20 minutos por infusão em água destilada na temperatura de 100 °C. A concentração utilizada foi de 500 mg de planta por 1000 mL de água. A fase aquosa marcada como MVI foi separada do resíduo vegetal por filtração e armazenada para uso posterior.

4.5.3. Administração oral do extrato bruto aquoso

O extrato fluído da fase aquosa de *M. vulgare* L. (MVI) foi administrado a trinta leitões machos de seis meses de idade, de linhagem branca e de grande

porte, recém-desmamados e com peso médio de 7,5 kg. Esses suínos foram distribuídos de forma aleatória em cinco grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) de seis animais cada.

Os animais foram imobilizados em dispositivo de contenção adaptado para aplicação do extrato fluido através de sonda orogástrica plástica conectada a um frasco plástico com capacidade de 100 mL (Figura 11).

Figura 11 – Administração do extrato aquoso de *M. vulgare* através de sonda orogástrica plástica



Legenda: autoria própria

O G1 foi o controle negativo e recebeu 5 mL de solução fisiológica. O G2, por sua vez, foi o controle positivo e recebeu uma solução de clenbuterol na dose de 0,08 mg/kg, 10 vezes superior a preconizada na bula do medicamento (PLEADIN et al., 2010). Os G3 a G5 receberam o extrato fluido de *M. vulgare* L. (MVI) em concentrações diferentes, ao G3 foi administrado 1% (MVI 1), ao G4 10% (MVI 10) e ao G5 20% (MVI 20).

Essa etapa durou 28 dias e a quantidade administrada foi definida em porcentagem com a massa da solução de infusão (MVI) dividida pelo peso do animal (7,5 kg).

O MVI foi administrado diariamente e a dose foi recalculada semanalmente à medida que os animais ganhavam peso. Nos dias zero, 7, 14, 21 e 28 os animais foram pesados individualmente e foi realizado uma coleta de sangue a fim de

realizar uma avaliação hematológica e bioquímica. A coleta de sangue foi realizada aproximadamente 30 minutos após a administração da infusão.

Além disso, teve-se a preocupação de pesar a ração fornecida aos animais para mensurar o ganho de peso. Já a água foi fornecida “*ad libitum*” (à vontade) e retirada 30 minutos antes da administração da infusão, para evitar sobrecarga gástrica.

4.5.4. Análise do Índice Global de Conversão Alimentar (GCA)

Para análise do índice de conversão alimentar, foi mensurado ao final dos experimentos a ração fornecida aos animais, sendo quantificados o consumo total de ração e o peso total dos suínos. O índice global de conversão alimentar (GCA) (NÉVOA et al., 2013) foi calculado pela Equação 1:

Equação 1:

$$GCA = \frac{\text{Consumo de ração}}{\text{Ganho de peso}}$$

4.5.5. Coleta de sangue

As amostras de sangue dos animais foram coletadas semanalmente por punção venosa da veia jugular externa por meio de tubos hipodérmicos com agulha 40 x 12 mm conectados a tubos de coleta a vácuo de 5 mL (Figura 12).

Foram utilizados tubos sem anticoagulantes para separar o soro do sangue para análises hematológicas e bioquímicas, e análises de UPLC-ESI-MS. Tubos contendo anticoagulante foram utilizados para obtenção de plasma sanguíneo, que serviram para análises bioquímicas.

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas à 3.000 rpm por 10 minutos a fim de obter a separação do soro ou do plasma, que foram pipetados com micropipeta automática e colocados em tubos eppendorf devidamente identificados e selados com parafilme. Estas amostras foram mantidas a uma temperatura de -80 °C, até o descongelamento natural, para o processamento e

testes.

Figura 12 – Coleta de sangue por punção venosa da veia jugular externa



Legenda: autoria própria

4.5.6. Análise hematimétrica e bioquímica do sangue

As amostras de sangue coletadas através de punção da veia jugular dos suínos foram submetidas a exames hematológicos e bioquímicos.

Uma parte dessa amostra (5 mL) foi coletada em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para realizar o exame de hemograma, já a outra parte (10 mL) foi coletada sem anticoagulante e centrifugada a 5.000 rpm por 10 minutos, a fim de se obter o soro para os exames bioquímicos (HARVEY, 2012).

As linhagens eritrocitárias e leucocitárias foram analisadas qualitativamente e quantitativamente, de forma a observar mudanças no perfil sanguíneo dos animais que receberam infusão de *M. vulgare*.

Com auxílio de um contador automático de células foi realizado a contagem de hemácias e a determinação da concentração de hemoglobina. O capilar contendo a amostra foi centrifugado a 12.500 rpm, por 5 minutos, a fim de obter o hematócrito.

O Volume Corpuscular Médio (VCM) foi calculado pela Equação 2:

Equação 2:

$$VCM = 10 \cdot \frac{\text{Hematócrito (\%)}}{\text{Número de hemácias (10}^6\text{/mm}^3\text{)}}$$

A contagem total de leucócitos também foi obtida por meio de contador automático de células e a contagem diferencial de leucócitos foi realizada por análise microscópica de esfregaços sanguíneos de sangue periférico corado com corante panóptico simples, em aumento de 1000 vezes.

Para a realização dos testes de atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gamaglutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP), as amostras de soro foram centrifugadas e analisadas por meio de método cinético em um analisador bioquímico semiautomático.

Além disso, para observar possíveis alterações hepáticas foram realizadas análises quantitativas dos níveis de proteínas plasmáticas (proteínas totais e albumina) em refratômetro e colesterol total. Já a análise da função renal se deu através do monitoramento de creatinina plasmática (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008; ROLAND; DRILLICH; IWERSEN, 2014).

4.5.7. Análise estatística

Os dados coletados de cada grupo foram ordenados como média \pm desvio padrão. A fim de verificar possíveis diferenças estatísticas, foi realizada análise de variância (ANOVA) bidirecional e, quando necessário, as análises foram confirmadas pelos pós-testes de Dunnett ou Neuman-Keuls considerando os dados que ultrapassaram a normalidade do teste. Os resultados foram

considerados estatisticamente significativos quando ultrapassaram o valor de $p < 0,05$.

4.6. ANÁLISES FITOQUÍMICAS E SANGUÍNEAS

4.6.1. Preparo de amostra para UPLC-ESI-MS

Uma parte das amostras de soro coletadas após a centrifugação foi misturada a 4 mL de acetonitrila (ACN), submetida à sonicação por 30 minutos, refrigeradas a 5 °C e centrifugadas. Com o auxílio de uma pipeta separou-se o sobrenadante da proteína. Este processo foi realizado por 3 vezes. Para a análise de UPLC-ESI-MS, o sobrenadante obtido de cada amostra foi reunido e filtrado com um filtro de 0,22 µm.

Já para a análise fitoquímica foi utilizado a infusão aquosa da planta preparada para administração oral nos animais.

4.6.2. Método de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa (UPLC-ESI-MS)

Para a fase móvel utilizou-se um sistema de gradiente combinando 0,1% de ácido fórmico aquoso (A) e acetonitrila (B) a uma vazão constante de 0,3 mL.min⁻¹ em uma corrida de 12 minutos, conforme relatado na Tabela 3. Ao final da análise foi realizado limpeza e equilíbrio da coluna por 5 minutos. O volume de injeção utilizado foi de 2 µL.

Tabela 3 – Condições da fase móvel da corrida cromatográfica

Tempo (min)	A %	B %
0 - 4	90	10
4 - 6,5	70	30
6,5 - 10	65	35
10 - 12	10	90

Fonte: elaborado pela autora

Os espectros de massa foram adquiridos no modo de ionização positivo (ESI +) e negativo (ESI -), com faixa de massa entre 100 e 1200 Da e tempo de varredura de 0,3 s.

Os parâmetros de ionização utilizados foram: tensão capilar 3 kV, tensão do cone de amostragem 40 V, tensão de deslocamento da fonte 80 V, temperatura de dessolvatação 300 °C, temperatura da fonte 80 °C, e gás de dessolvatação 800L/h.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PARÂMETROS BIOLÓGICOS

A administração oral da infusão de *M. vulgare* L. em leitões recém-desmamados durante 28 dias permitiu avaliar o crescimento dos animais, ganho de peso, índice de conversão alimentar e parâmetros sanguíneos que serão abordados nos tópicos abaixo.

5.1.1. Efeitos do extrato de infusão de *M. vulgare* (MVI) no ganho de peso dos animais

Durante os 28 dias, período do experimento, pode ser observado um aumento no peso dos animais conforme demonstrado na Figura 13. O grupo de suínos que foram tratados com doses do extrato de infusão de *M. vulgare* L. de MVI 1%, MVI 10% e MVI 20% apresentaram aumentos de $15,2 \pm 0,56\%$, $4 \pm 0,7\%$ e $11,4 \pm 0,35\%$, respectivamente, em comparação ao grupo controle negativo (C) tratado com solução fisiológica com significância ($P < 0,01$ Dunnett) no sétimo dia de tratamento. O grupo que apresentou aumento de peso com menor grau de significância ($P < 0,05$ Dunnett) em relação ao grupo controle negativo (C), foi o MVI 10%, porém após 14 dias foram observadas variações no peso dos animais.

Houve um aumento de $11,4 \pm 0,99\%$ com $P < 0,01$ Dunnett e $6,15 \pm 1,73\%$ do grupo que recebeu MVI 1% em comparação aos grupos controle negativo (C) e controle positivo (PC), respectivamente.

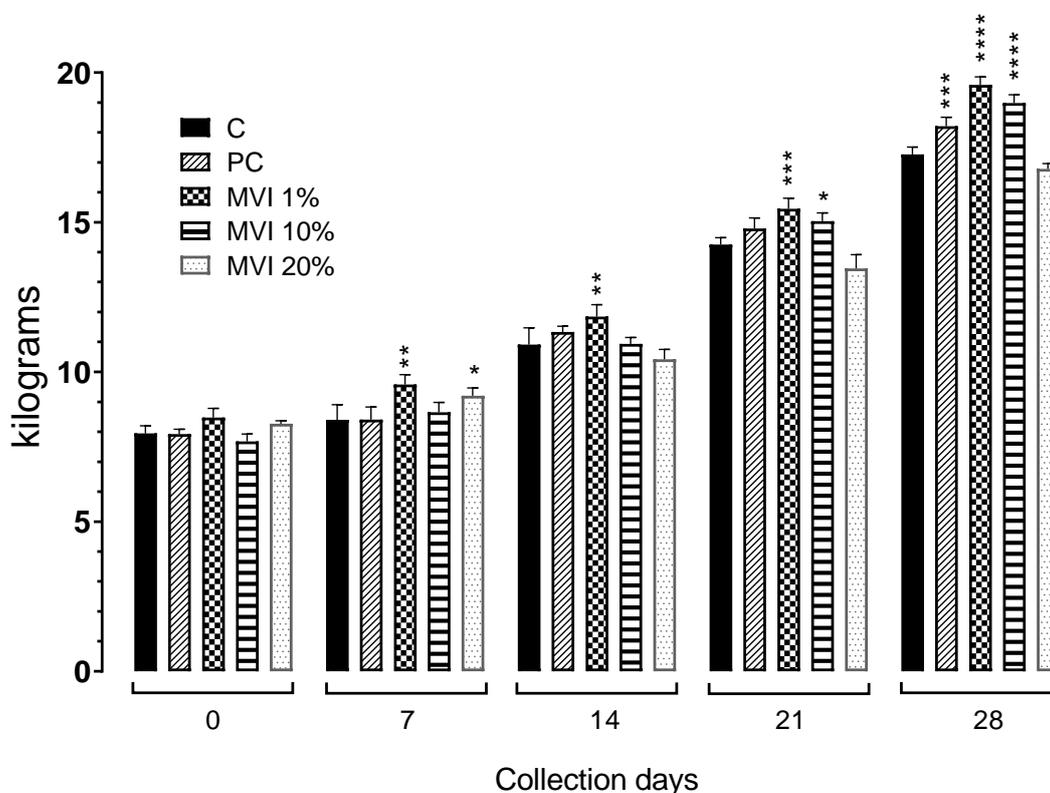
O grupo MVI 10% obteve um aumento de $3,15 \pm 0,03\%$ em comparação ao grupo controle negativo (C), mas seu peso diminuiu $2,0 \pm 0,92\%$ quando comparado ao grupo controle positivo (PC). Já o grupo que recebeu MVI 20% apresentou diminuição de $1,62 \pm 1,15\%$ e $6,54 \pm 2,03\%$ em relação aos grupos controle negativo (C) e controle positivo (PC), respectivamente.

Após 21 dias de experimento, o grupo MVI 1% apresentou aumento de $9,18 \pm 1,19\%$ quando comparado ao grupo controle negativo (C) e $6,3 \pm 0,36\%$ comparado ao grupo controle positivo (PC), com significância de $P < 0,001$ Dunnett. O peso do grupo MVI 10% aumentou $6,25 \pm 0,92\%$ ($P < 0,05$ Dunnett) e $3,45 \pm$

0,58% em relação aos grupos controle negativo (C) e controle positivo (PC), respectivamente. O grupo MVI 20%, por sua vez, perdeu $4,87 \pm 2,25\%$ e $7,41 \pm 0,86\%$ em comparação aos grupos controle negativo (C) e controle positivo (PC), respectivamente.

Os suínos que receberam 1% de MVI ganharam $42,95 \pm 5,35\%$ de peso, já os que receberam 10% da infusão ganharam $26,35 \pm 9,94\%$ de peso em comparação ao grupo controle ($P < 0,0001$ Dunnett). Os pesos destes dois grupos excederam os do controle positivo (CP) em $21,65 \pm 11,52\%$ e $17,35 \pm 8,17\%$, respectivamente. Entretanto, o grupo que recebeu a maior porcentagem de MVI (20%) apresentou uma diminuição de $3,06 \pm 0,26$ e $6,27 \pm 0,17\%$ em relação aos grupos controle negativo (C) e controle positivo (PC), respectivamente. Isso pode estar relacionado à presença de substâncias no extrato da planta que suprimem o metabolismo dos triglicerídeos e do açúcar, reduzindo assim seus níveis sanguíneos (LU et al., 2019).

Figura 13 – Efeitos da infusão de *M. vulgare* (MVI) no ganho de peso dos animais

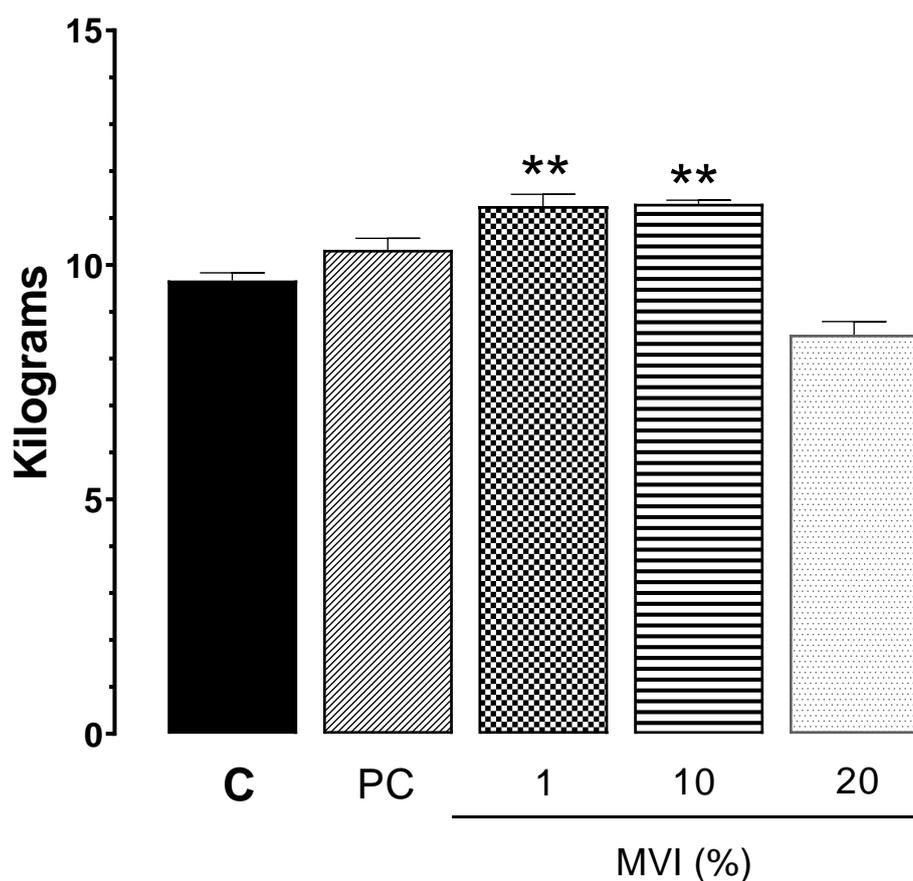


Fonte: autoria própria

Legenda: C: controle negativo; PC: Controle positivo. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais representam o E.P.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$; considerado estatisticamente significativo.

O ganho de peso global (diferença entre os pesos final e inicial) ao longo do experimento foi observado nos suínos que receberam MVI 1% e MVI 10% ($P < 0,01$) em comparação ao grupo controle (C), como pode ser observado na Figura 14. Os percentuais de ganho de peso para as concentrações de MVI 1% e MVI 10% foram $15,76 \pm 2,7\%$ e $13,86 \pm 1,39\%$, respectivamente. Já o grupo MVI 20% apresentou valores inferiores em relação ao grupo controle (C) de $14,25 \pm 1,31\%$.

Figura 14 – Ganho de peso global dos suínos tratados com infusão de *M. vulgare* (MVI)



Fonte: autoria própria

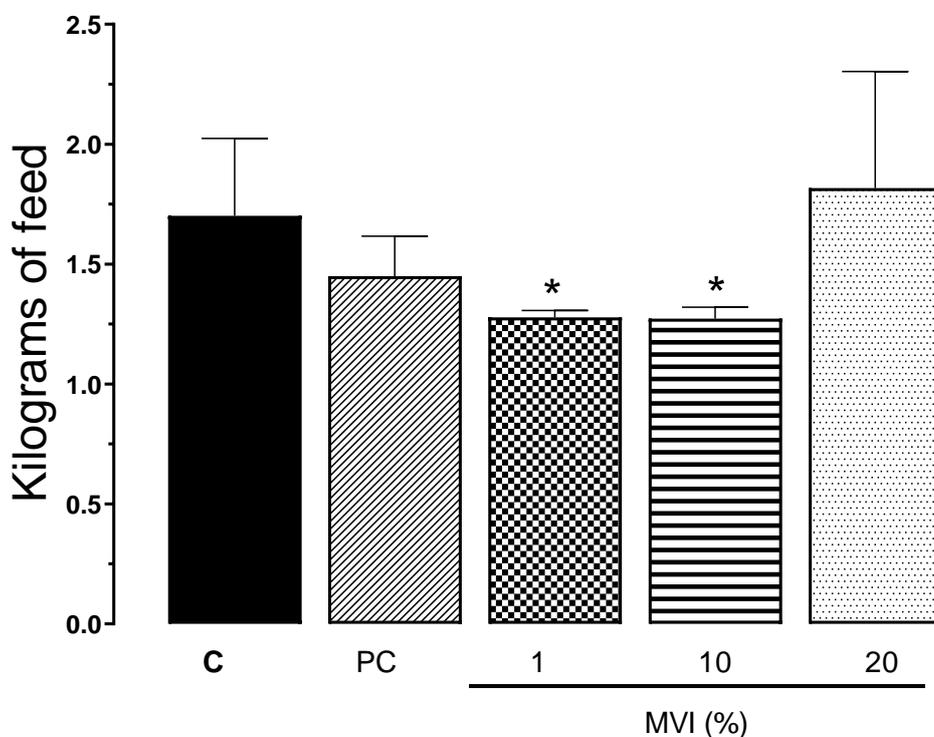
Legenda: C: controle negativo; PC: Controle positivo. Cada barra representa a média de 6 animais e as linhas verticais representam o E.P.M. ** $P < 0,01$ no teste de Dunnett, considerado estatisticamente significativo.

Através do Índice Global de Conversão Alimentar (GCA) (NÉVOA et al., 2013) (Figura 15) pode-se observar que houve uma diminuição não significativa na conversão alimentar relativa quanto aos grupos que receberam MVI 1% (GCA = 1,277) e MVI 10% (GCA = 1,273) em comparação com os controles negativo (C) e positivo (PC).

Em comparação com o controle positivo (PC), os dois grupos (MVI 1% e MVI 10%) apresentaram redução de $34,49 \pm 15,44\%$ e $35,09 \pm 14,68\%$, respectivamente. Já o grupo MVI 20% apresentou um aumento na conversão alimentar de $14,45 \pm 5,65\%$ (GCA = 1,817).

Observar esse índice de conversão alimentar é importante uma vez que está ligado diretamente na alimentação dos animais refletindo na redução de custos com alimentação e ganho de peso. Uma diminuição do índice de conversão alimentar pode causar um impacto econômico positivo para criadores de suínos, contribuindo para o empreendimento sustentável na suinocultura.

Figura 15 – Índice global de conversão alimentar (GCA) de suínos tratados com infusão de *M. vulgare* (MVI)



Fonte: autoria própria

Legenda: C: controle negativo; PC: Controle positivo. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M. *P < 0,05 no teste de Dunnett, considerado estatisticamente significativo.

5.1.2. Análise das células sanguíneas

Foi possível observar que durante o período do experimento os suínos não apresentaram anemia, icterícia ou hemoglobinúria. Para isso, foi avaliado o efeito da administração crônica de MVI através das contagens de eritrócitos (Figura 16A) e hemoglobina total (Figura 16B) que foram realizadas no dia 28.

A avaliação demonstrou que nos grupos MVI 1%, MVI 10% e MVI 20% houve uma diminuição nos eritrócitos (Figura 16A) de $10,78 \pm 1,86\%$, $6,68 \pm 0,87\%$ e $19,62 \pm 1,45\%$ em comparação com o grupo de controle negativo (C), respectivamente. Porém, quando comparados ao grupo controle positivo (PC), os mesmos grupos tiveram diminuição de $5,93 \pm 2,08\%$, $1,07 \pm 2,08\%$ e $15,22 \pm 1,98\%$, respectivamente.

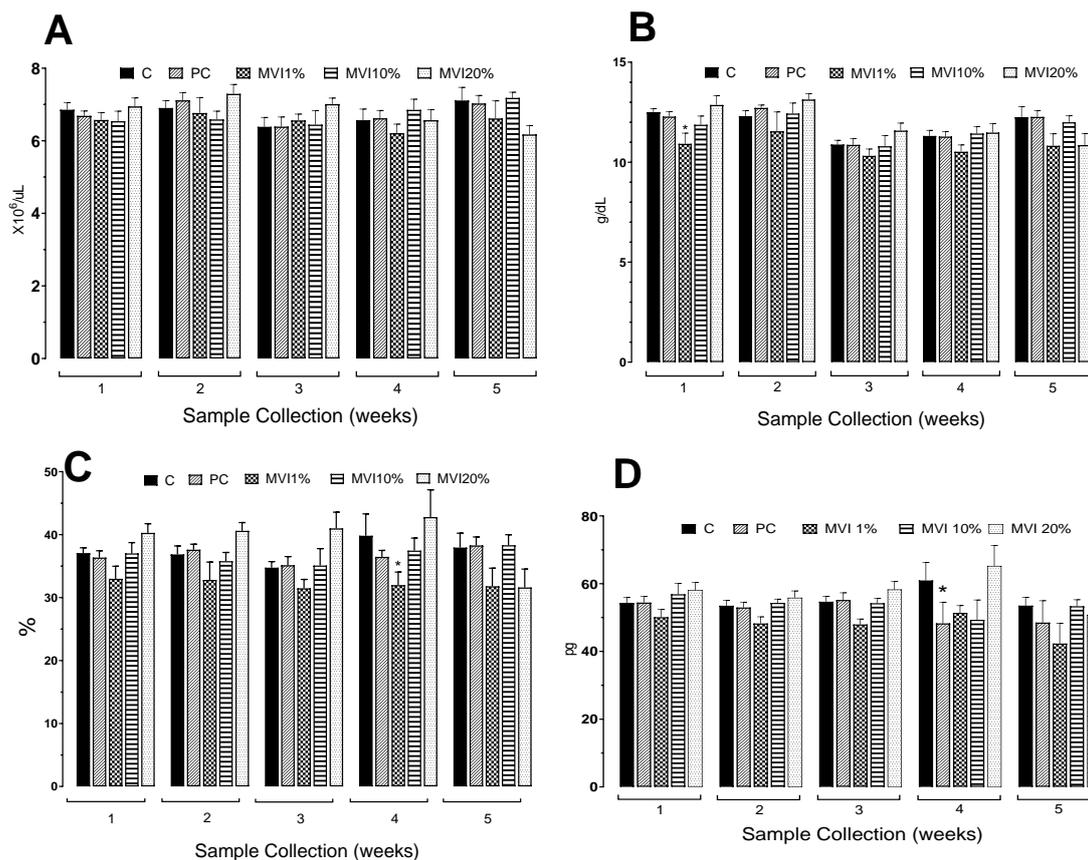
No 28º dia de experimento a hemoglobina dos grupos MVI 1%, MVI 10% e MVI 20% diminuiu em $-14,1 \pm 1,12\%$, $-6,79 \pm 0,97\%$ e $-14,63 \pm 1,66\%$, respectivamente, quando comparados ao grupo controle negativo (C).

Os valores dos hematócritos (Figura 16C) estiveram dentro da normalidade com exceção no grupo MVI 1%. Esse grupo obteve nos primeiros 7 dias valor médio igual a 32 %, valor inferior ao limite de referência (BROCKUS et al., 2005), já nos dias 14, 21 e 28 apresentou valor médio igual a 31 %, também abaixo do limite. O grupo MVI 1% apresentou reduções na contagem de hematócritos de $11,44 \pm 1,8\%$ e $8,8 \pm 2,8\%$ em comparação aos grupos controle negativo (C) e positivo (PC), respectivamente. Já o grupo MVI 10% apresentou reduções de $5,87 \pm 1,53\%$ quando comparado ao grupo controle negativo (C) e $3,17 \pm 0,5\%$ ao controle positivo (PC). O grupo MVI 20% também apresentou características semelhantes com reduções de $-12,41 \pm 2,41\%$ e $-10,08 \pm 3,67\%$, quando comparado aos controles negativo (C) e positivo (PC), respectivamente.

Em relação ao Volume Corpuscular Médio (VCM) apresentado na Figura 16D, observou-se que no dia 28 os grupos MVI 1%, 10% e 20% apresentaram valores inferiores aos do grupo controle negativo (C) com uma queda de $-10,78 \pm$

0,84%, $-5,02 \pm 0,19$ e $-0,77 \pm 1,45\%$, respectivamente. Também houve uma queda do VCM desses grupos quando comparados ao grupo do controle positivo (PC) de $9,5 \pm 1,35\%$, $3,64 \pm 1,26\%$ e $1,6 \pm 1,3\%$, respectivamente.

Figura 16 – Concentrações de eritrócitos (A), hemoglobina (B), hematócrito (C) e Volume Corpuscular Médio (D) dos suínos tratados com infusão de *M. vulgare* L. (MVI) em amostras de sangue periférico



Fonte: autoria própria

Legenda: C: controle negativo; PC: Controle positivo. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M. *P < 0,05; considerado estatisticamente significativo.

Durante todo o tempo do experimento, o grupo MVI 1% teve uma diminuição dos leucócitos totais (Figura 17A) de $12,03 \pm 3,57\%$ em comparação ao grupo controle negativo (C) e um aumento de $13,47 \pm 3,57\%$ em comparação ao grupo controle positivo (PC). Diferentemente, o efeito da administração crônica de MVI para os grupos MVI 10% e MVI 20% quando comparados ao grupo controle negativo (C) apresentaram aumento de leucócitos de $41,26 \pm 5,01\%$ e $28,24 \pm$

3,9%, respectivamente. O mesmo se deu em comparação com o grupo controle positivo (PC), no qual houve um aumento de leucócitos de $82,23 \pm 5,01$ e $65,38 \pm 3,9\%$, respectivamente. Além disso, é importante frisar que, especificamente, nos grupos MVI 10% e MVI 20% a contagem de leucócitos ultrapassou o limite máximo do valor de referência nos dias 21 e 28, e 14 a 28, respectivamente.

Os grupos tratados com MVI 1%, MVI 10% e MVI 20% aumentaram os neutrófilos (Figura 17B) em $39,22 \pm 4,24\%$, $52,18 \pm 7,6\%$ e $49,78 \pm 7,22\%$ (com significância $P < 0,05$ Dunnett) em comparação ao grupo de controle negativo (C), respectivamente. Já quando comparados ao controle positivo (PC) os neutrófilos desses grupos aumentaram $43,81 \pm 4,24\%$, $57,2 \pm 7,6\%$ e $54,72 \pm 7,22\%$, respectivamente. Observou-se que os grupos MVI 1%, 10% e 20% apresentaram contagem de neutrófilos superior ao valor de referência nos dias 21 e 28. Além disso, especificamente, o grupo MVI 1%, também ultrapassou o limite máximo do valor de referência no dia 7.

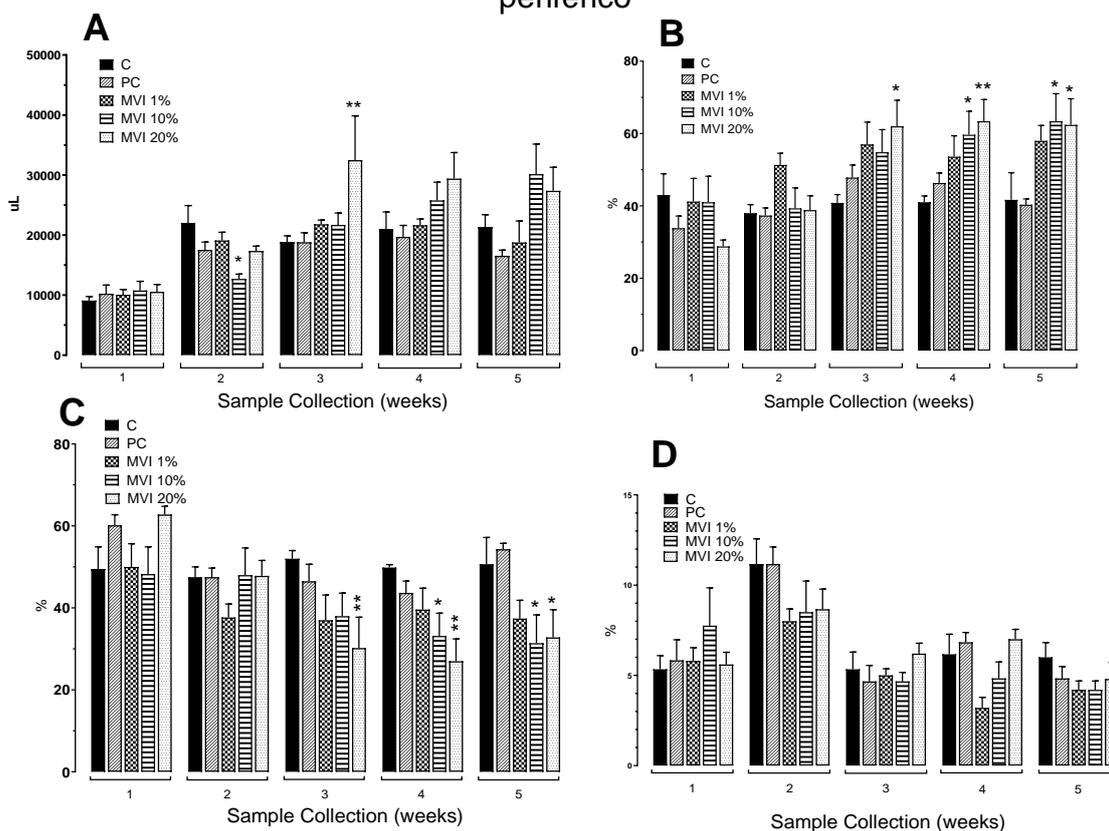
Os grupos MVI 1%, 10% e 20% apresentaram diminuição de linfócitos (Figura 17C) de $26,17 \pm 4,45\%$, $38,01 \pm 6,88\%$ e $35,25 \pm 6,77\%$ (com significância $P < 0,05$ Dunnett) quando comparados ao grupo controle negativo (C), respectivamente. Também houve uma diminuição dos linfócitos em $31,16 \pm 4,45\%$, $2,20 \pm 6,88\%$ e $39,62 \pm 6,77\%$, respectivamente, em comparação ao controle positivo (PC). Notou-se que o grupo MVI 1% apresentou quantidade de linfócitos abaixo do limite do valor de referência nos dias 7, 14 e 28, enquanto os grupos MVI 10% e MVI 20% apresentaram valores abaixo da referência nos dias 14, 21 e 28.

Por fim, observou-se que a quantidade de monócitos (Figura 17D) nos grupos MVI 1%, MVI 10% e MVI 20% diminuiu $30 \pm 0,49\%$, $30 \pm 0,49\%$ e $20 \pm 0,91\%$, respectivamente, quando comparados ao controle negativo (C). O mesmo se observou em comparação com o controle positivo (PC), porém com uma diminuição de $13 \pm 0,49\%$, $13 \pm 0,49\%$ e $23 \pm 0,91\%$, respectivamente.

Os intervalos de referência utilizados para esse tipo de estudo geralmente são problemáticos, já que se presume valores parâmetros a partir de certos grupos de animais, e dependem de vários fatores, como raça, sexo, idade, dieta, ambiente, localização, e até mesmo equipamentos e reagentes de laboratório, metodologia de ensaio, métodos de coleta e habilidade técnica. Para se obter resultados mais precisos e confiáveis, deve-se levar em consideração todos esses parâmetros que

são potencialmente limitantes pela falta de estudo, sendo necessário o desenvolvimento de intervalos de referência separados para a raça específica (BROCKUS et al., 2005).

Figura 17 – Leucócitos totais (A), neutrófilos (B), linfócitos (C) e monócitos (D) de suínos tratados com infusão de *M. vulgare* (MVI) em amostras de sangue periférico



Fonte: autoria própria

Legenda: C: controle negativo; PC: Controle positivo. Cada barra representa a média de seis animais e as linhas verticais representam o S.E.M. *P < 0,05; **P < 0,01 é considerado estatisticamente significativo.

5.1.3. Análise bioquímica e metabólica

Como pode ser observado na Tabela 4, não houve alterações estatisticamente significativas entre os grupos controle para aqueles tratados com MVI na atividade das enzimas hepáticas gamaglutamiltransferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP). Observou-se que também não houve variações significativas para metabólitos

sanguíneos, como colesterol e creatinina, bem como proteínas plasmáticas, proteínas totais e albumina sanguínea, indicando assim que a infusão de MVI nas concentrações testadas no estudo não prejudica o fígado ou rins dos animais.

Tabela 4 – Parâmetros de função hepática e renal dos animais após 28 dias de tratamento com *M. vulgare*

	C	PC	MVI 1%	MVI 10%	MVI 20%
GGT (UI/L)	37.33 ± 6.54	28.96 ± 11.68	41.94 ± 1.80	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
ALP (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 ± 4.65	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

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: Os números são os resultados da média ± média do desvio padrão N = 6. GGT - gamaglutamiltransferase; AST - Aspartato aminotransferase; ALT – Alanina aminotransferase; ALP - Fosfatase alcalina.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *M. VULGARE* L.

O estudo fitoquímico da espécie *M. vulgare* L. resultou no isolamento de dois compostos, sendo o composto 1 (Mv1) um diterpeno labdano e o composto 2 (Mv2) um flavonoide. Esses compostos foram isolados através de coluna cromatográfica e as estruturas foram confirmadas por IV e RMN de ¹H e de ¹³C, além de terem sido comparadas com dados já disponíveis na literatura.

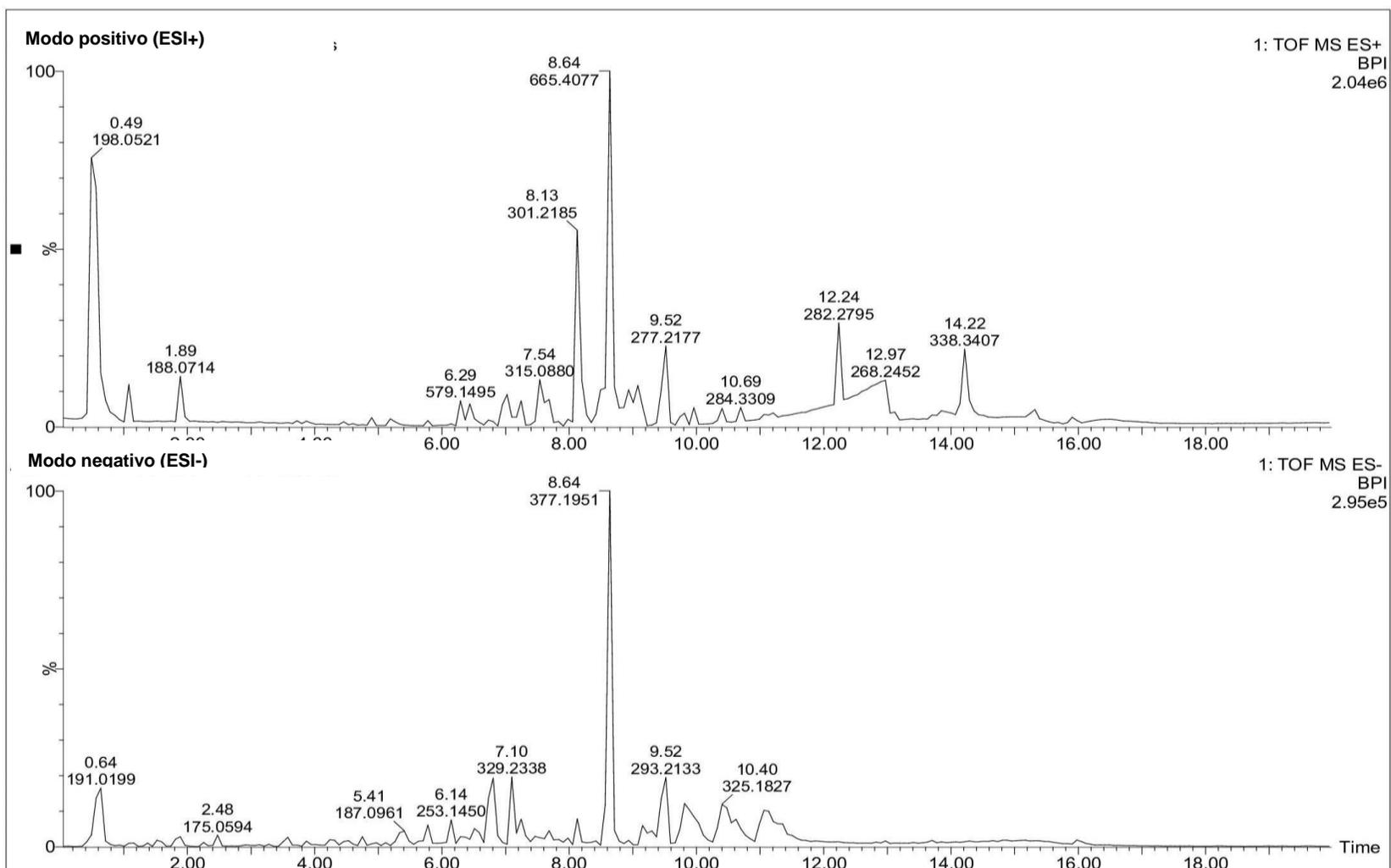
O perfil químico do extrato fluido de *Marrubium vulgare* L. foi caracterizado através da técnica de UPLC-ESI-MS, resultando na identificação de 33 metabólitos secundários presentes na planta (Figura 18). Entre os metabólitos identificados,

encontram-se marrubiína e apigenina (compostos isolados), além de diversos flavonóides, diterpenos, aminoácidos e derivados de ácidos graxos.

5.2.1. Caracterização dos constituintes químicos de *M. vulgare* L. através de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

O perfil químico do extrato da infusão de *M. vulgare* L., administrado via oral aos animais, foi caracterizado por UPLC-ESI-MS adquirido nos modos positivo e negativo do íon pico de base (BPI) conforme mostrado na Figura 18. Os dois modos mostraram a presença de 33 compostos pertencentes a diterpenos, aminoácidos e ácidos graxos polioxigenados (Tabela 5).

Para caracterizar o perfil químico de *M. vulgare* L. foram empregadas técnicas de desreplicação apoiadas em pesquisa bibliográfica e consideração quimiotaxonômica.

Figura 18 – Espectro de UPLC-ESI-MS do extrato de infusão de *M. vulgare* L.

Fonte: autoria própria

Cabe expor inicialmente que os dados de espectrometria de massas dos picos 1, 4 - 6, 8 e 16, descritos na Tabela 5, não permitiram a caracterização de sua estrutura. O pico 2 resultou no espectro de massa o íon precursor m/z 191,0199 ao lado dos íons fragmentados m/z 173,0069 e 111,0077. Sendo assim, é possível afirmar que uma molécula de H₂O (18 Da) foi eliminada do íon precursor para gerar m/z 173,0069. Além disso, para produzir m/z 111,0077 este fragmento iônico sofreu descarboxilação (-CO₂ equivalente a 44 Da) e depois perdeu H₂O (18 Da). Baseado nestes dados, foi atribuída a estrutura do ácido cítrico.

O pico 3, por sua vez, mostrou seu íon precursor em m/z 166,0870 com fragmento de m/z 120,0805, possivelmente ocorrido após perda de HCO₂H (46 Da). Uma estrutura consistente para esse pico é a da fenilalanina.

Ao pico 7, com tempo de retenção (t_R) de 1,89 min, foi atribuído a estrutura do triptofano, com base no íon precursor m/z 205,0980 e íon fragmento m/z 188,0714, advindo da perda de NH₃.

O pico 9 com tempo de retenção de 2,48 min apresenta em seu espectro de massa um íon precursor de m/z 175,0594 correspondendo à fórmula molecular C₇H₁₂O₅. Em m/z 157,0506 foi encontrado um íon fragmento produzido pela perda de H₂O (18 Da), com isso foi atribuído a estrutura do ácido diidroshiquímico a este composto.

Como o íon precursor dos picos 10 - 15 não gerou íons fragmentados, através de considerações quimiotaxonômicas e pesquisa bibliográfica foram deduzidas possíveis estruturas, uma vez que esses metabólitos secundários já haviam sido identificados em *M. vulgare* (AĆIMOVIĆ et al., 2020).

O pico 17 com t_R de 6,29 min possui um íon precursor de m/z 577,1349 que corresponde a fórmula molecular C₃₀H₂₆O₁₂. Foi observado no espectro de massa o íon fragmento m/z 269,0441 originado após a perda de uma hexose e uma porção cumaroil, que através de uma pesquisa bibliográfica, foi sugerido a estrutura do composto equinacina, já identificada em *M. vulgare* (SWEIDAN; ZARGA, 2016).

O pico 18 (t_R 6,51 min) mostrou seu precursor em m/z 365,1974 [C₂₀H₃₀O₆ - H]⁻ e produziu um único fragmento m/z 343,2158 após a perda de H₂O (18 Da), sendo atribuído a esse pico a estrutura da leonepetaefolina B (LI et al., 2012).

O pico 19 com t_R 6,64 min e íon precursor m/z 337,2395 [C₂₀H₃₂O₄ +H]⁺ mostrou no espectro de massa em tandem íons fragmentos em m/z 319,2286 e

301,2149, formados por perdas de H₂O (18 Da) e 2H₂O (36 Da), respectivamente. Levando à estrutura de desacetil-vitexilactona (PIOZZI et al., 2006).

O pico 20 (t_R 6,81 min) que possui íon precursor m/z 327,2162 [C₁₈H₃₂O₃ - H]⁻, gerou em seu espectro MS/MS um único íon de fragmento de m/z 211,1336, encontrado após a abertura do anel do ciclopentano por duas clivagens α (perda de malonaldeído, 72 Da) das funcionalidades do álcool, seguida pela perda de C₃H₈ (44 Da). De acordo com a literatura se considerou à estrutura do Ent-9F1d-fitoprostano para este pico (RUND et al., 2018).

O pico 21 com t_R 7,03 min mostrou seu íon precursor em m/z 351,2157 [C₂₀H₃₀O₅ +H]⁺, produzindo íons fragmentos em m/z 333,2071 após perda de H₂O (18 Da) e m/z 315,1969 após perda de 2H₂O (36 Da). O primeiro íon m/z 333,2071 sofreu abertura do anel lactona seguida de descarboxilação (HCO₂H, 46 Da) para produzir o fragmento de m/z 287,2001. Este íon, por sua vez, perdeu H₂O (18 Da), gerando o íon m/z 269,1905, que após eliminação de C₂H₂ (26 Da) gerou o íon fragmento m/z 243,1753. A estrutura atribuída a este pico foi cilenina A.

O pico 22 com m/z 329,2338 [C₁₈H₃₄O₃ -H]⁻ difere do pico 21 sugerindo um derivado reduzido. Uma pesquisa bibliográfica sugeriu a estrutura do Ent-16-epi-16-F1t-fitoprostano.

O pico 23 foi detectado no t_R 7,25 min com íon precursor m/z 335,2222 [C₂₀H₃₀O₄ +H]⁺, gerando um fragmento único de íon m/z 317,2114 após uma eliminação de H₂O. Através de pesquisa bibliográfica foi caracterizado a estrutura desta substância como leoheteronina E, já identificada na planta *Leonurus japonicus* (GIANG et al., 2005).

Os picos 24 e 26 nos tempos de retenção 7,25 e 7,69 min com m/z 327,2162 [C₁₈H₃₂O₅ -H]⁻ e 307,1910 [C₁₈H₂₈O₄ -H]⁻, respectivamente, foram deduzidos como sendo derivados de fitoprostanoídes. O pico 24 foi considerado um isômero do pico 20, caracterizado como Ent-9F1d-fitoprostano, enquanto o pico 26 corresponde a uma diferença de 20 unidades de massa, podendo estar relacionadas a diferença de 2 hidrogênios e a perda de água, sendo esses possivelmente associados a presença de insaturação e um processo de desidratação.

O pico 25 (t_R 7,57 min) com íon precursor em m/z 315,0880 [C₁₇H₁₄O₆ +H]⁺ não gerou fragmento em seu espectro de massa em tandem, porém, através de pesquisa bibliográfica de compostos previamente obtidos de *M. vulgare*, pode-se

observar que o composto relativo ao pico 25 é pectolinarigenina, um flavonóide acetilado (SWEIDAN; ZARGA, 2016).

O pico 27 com tempo de retenção em 8,13 min e íon precursor m/z 381,2295 $[C_{20}H_{32}O_4 + HCO_2]^-$ também não produziu íon fragmento, mas comparando o dado de massa com aqueles relatados pela literatura, foi atribuído a estrutura do marrubenol, composto já encontrado na planta em estudo (PIOZZI et al., 2006).

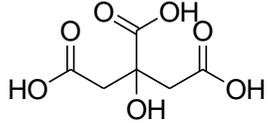
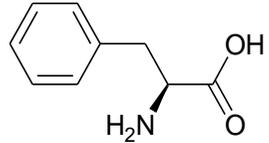
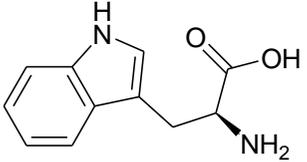
O pico 28 detectado no t_R 8,13 min com íon precursor m/z 319,2286 $[C_{20}H_{30}O_3 + H]^+$, gerou em seu espectro MS/MS quatro fragmentações, sendo elas: m/z 301,2185 obtida após a eliminação de H_2O (18 Da) do íon precursor, m/z 283,2079 após a perda de uma segunda molécula de H_2O , m/z 289,2170 correspondente a perda de CH_2O (30 Da), seguido da perda de H_2O (18 Da) gerando o último íon fragmento em questão m/z 271,2073. Com isso, chegou-se à conclusão da estrutura $3\alpha,18$ -dihidroxi-13-furil-ent-labd-8(17)-eno, previamente identificada na planta *Gutierrezia grandis* (GAO; LEIDIG; MABRY, 1985).

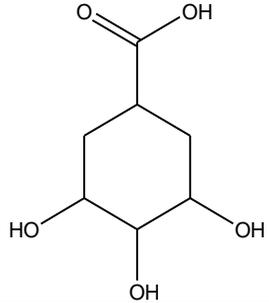
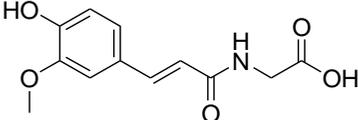
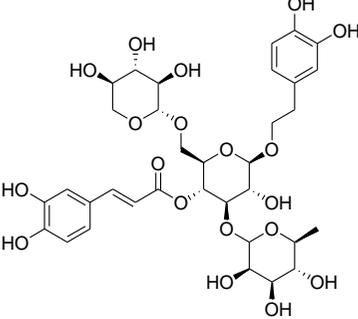
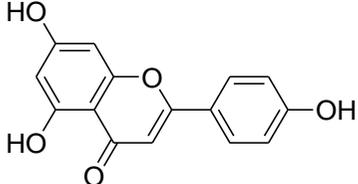
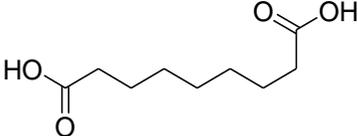
O pico 29 com tempo de retenção de 8,64 min e íon precursor de m/z 665.4077 Da $[2M+H]^+$ correspondendo a fórmula molecular $C_{20}H_{28}O_4$ (diterpeno), foi a substância observada com maior concentração no extrato bruto. O íon precursor gerou em seu espectro de massa em tandem, fragmentos em m/z 315,1969, 287,2000, 269,1905 e 221,1530. O íon fragmento m/z 315,1969 foi encontrado após a perda de H_2O (18 Da) do íon precursor, que por sua vez sofreu uma abertura do anel lactona seguida de descarboxilação (perda de HCO_2H , 46 Da) gerando o íon fragmento m/z 269,1900. O íon m/z 287,2000 foi produzido a partir do íon precursor pela abertura do anel lactona e uma clivagem de descarboxilação de HCO_2H . Ao pico 29 foi atribuída a estrutura da marrubiína, já relatada como um dos diterpenos majoritários em *M. vulgare* (PIOZZI et al., 2006).

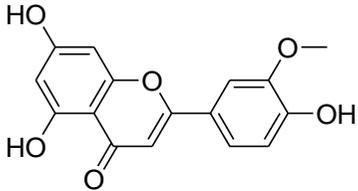
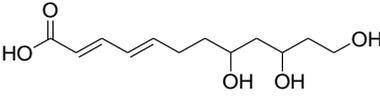
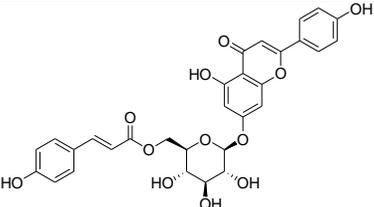
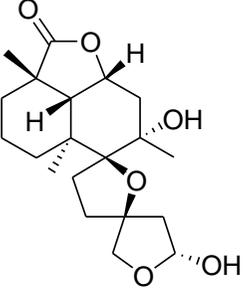
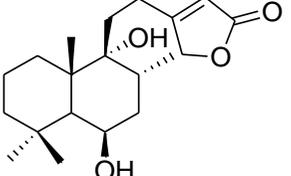
Pico 30 com tempo de retenção em 9,15 min mostrou seu íon precursor em m/z 369 $[M+HCO_2]^-$ com fórmula molecular $C_{20}H_{36}O_3$. Este íon, assim como os íons dos picos 26 e 28, não produziu fragmentos, entretanto, com uma pesquisa na literatura chegou-se à estrutura do Labd-13(14)-en-9 α ,15,16-triol, também já identificado em *M. vulgare* (SWEIDAN; ZARGA, 2016).

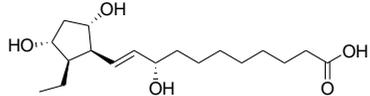
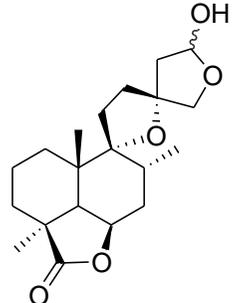
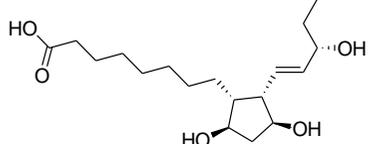
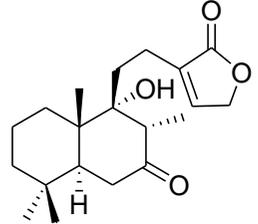
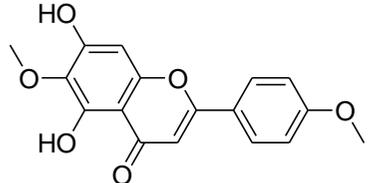
Os picos 31 - 33 foram considerados derivados de ácidos graxos C-18, os picos 32 e 33, especificamente, foram caracterizados como ácidos estearidônico e linolênico.

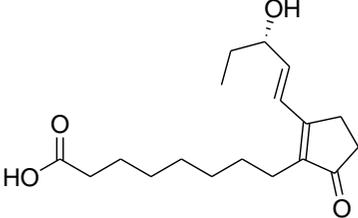
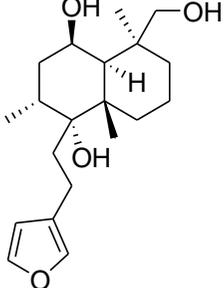
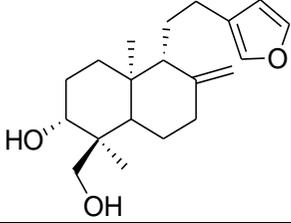
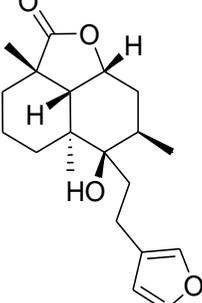
Tabela 5 – Perfil químico por UPLC-ESI-MS do extrato de infusão de *M. vulgare* L.

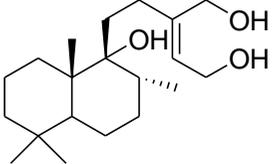
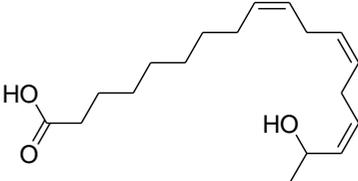
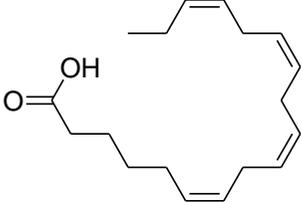
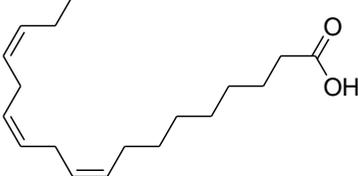
Número de pico	Tempo de Retenção - t _R (min)	ESI-MS(-) (m/z)	ESI-MS(+) (m/z)	ESI-MS/MS(-)	ESI-MS/MS(+)	Fórmula Molecular	Composto identificado	Estrutura
1	0.49		198.0521 [M+H] ⁺	-	-	C ₇ H ₇ N ₃ O ₄	-	-
2	0.64	191.0199 [M-H] ⁻	-	173.0069; 111.0077		C ₆ H ₈ O ₇	Ácido cítrico	
3	1.08	-	166.0870 [M+H] ⁺	-	120.0805	C ₉ H ₁₁ NO ₂	Fenilalanina	
4	1.15	382.0974 [M- HCO ₂] ⁻	-	222.0786; 164.0726	-	C ₁₂ H ₁₉ NO ₁₀	-	-
5	1.37	232.0824 [M- H] ⁻	-	214.0708; 196.0607	-	C ₉ H ₁₃ NO ₆	-	-
6	1.52	175.0621 [M-H] ⁻	-	-	-	-	-	-
7	1.89	203.0822 [M-H] ⁻	205.0980 [M+H] ⁺	-	188.0714	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	Triptofano	
8	2.26	232.0824 [M- H] ⁻		214.0708; 196.0607		C ₉ H ₁₅ NO ₆	-	-

9	2.48	175.0594 [M- H] ⁻	-	157.0506	-	C ₇ H ₁₂ O ₅	Ácido diidroshiquímico	
10	3.58	250.0731 [M- H] ⁻	-	-	-	C ₁₂ H ₁₃ NO ₅	Feruloilglicina	
11	4.75	755.2435 [M-H] ⁻	-	-	-	C ₃₄ H ₄₄ O ₁₉	Arenariosídeo ou forsitosídeo B	
12	5.30	269.0442 [M-H] ⁻	271.0585 [M+H] ⁺	-	-	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	Apigenina	
13	5.41	187.0961 [M-H] ⁻	-	-	-	C ₉ H ₁₆ O ₄	Ácido azeláico (ácido nonanodióico)	

14	5.45	-	301.0695 [M+H] ⁺	-	-	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	Crisoeriol	
15	5.78	243.1230 [M-H] ⁻	-	-	-	C ₁₂ H ₂₀ O ₅	Diácido graxo (Ácido (2E, 4E)-8,10,12-trihydroxidodeca-2,4-dienóico)	
16	6.14	253.1450 [M-H] ⁻	-	-	-	C ₁₄ H ₂₂ O ₄	-	-
17	6.29	577.1349 [M-H] ⁻	579.1495 [M+H] ⁺	269.0441	271.0625	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	Equinacina ou equinaticina	
18	6.51	365.1974 [M-H] ⁻	-	343.2158	-	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	Desidrovelutina A ou leonepetaefolina B	
19	6.64	-	337.2395 [M+H] ⁺	-	319.2286; 301.2149	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	Desacetil-vitexilactona (PIOZZI et al., 2006)	

20	6.81	327.2162 [M-H] ⁻	-	211.1336	-	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	Fitoprostanóide (ent-9-F1t-PhytoP) (RUND et al., 2018)	
21	7.03	-	351.2157 [M+H] ⁺	-	333.2071; 315.1969; 287.2001; 269.1905; 243.1753	C ₂₀ H ₃₀ O ₅	Cilenina A (PIOZZI et al., 2006)	
22	7.10	329.2338 [M-H] ⁻	-	-	-	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	Fitoprostanóide (Ent-16-epi-16-F1t-PhytoP)	
23	7.25	-	335.2222 [M+H] ⁺	-	317.2114	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	Leoheteronina E (GIANG et al., 2005)	
24	7.25	327.2162 [M-H] ⁻	-	-	-	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	Fitoprostanóide (ent-9-F1t-PhytoP) (RUND et al., 2018)	Isômero de 20
25	7.54	-	315.0880 [M+H] ⁺	-	-	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Pectolarigenina (SWEIDAN; ZARGA, 2016)	

26	7.69	307.1910 [M-H] ⁻	-	-	-	C ₁₈ H ₂₈ O ₄	Fitoprostanóide (16-B1-PhytoP) (TKACZ et al., 2022)	
27	8.13	381.2295 [M-HCO ₂] ⁻	-	-	-	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	Marrubenol	
28	8.13	-	319.2286 [M+H] ⁺	-	301.2185; 289.2170; 283.2079; 271.2073;	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	3α,18-dihidroxi-13-furil-ent-labd-8(17)-eno (GAO; LEIDIG; MABRY, 1985)	
29	8.64	377.1951 [M+HCO ₂] ⁻	665.4077 [2M+H] ⁺	-	315.1969; 287.2000; 269.1905	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	Marrubiína	

30	9.15	369.2656 [M+HCO ₂] ⁻	-	-	-	C ₂₀ H ₃₆ O ₃	Labd-13(14)-en-9α,15,16-triol (SWEIDAN; ZARGA, 2016)	
31	9.52	293.2133 [M-H] ⁻	-	-	-	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	Ácido 17-hidroxilinolênico	
32	9.52	-	277.2177 [M+H] ⁺	-	-	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	Ácido estearidônico	
33	9.96	-	279.2335 [M+H] ⁺	-	-	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Ácido linolênico	

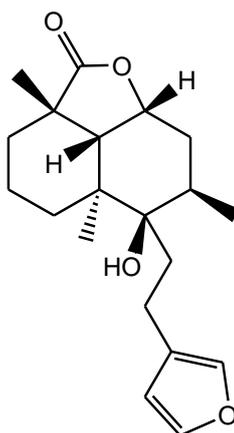
Fonte: elaborado pela autora

5.2.2. Purificação fitoquímica

5.2.2.1. Composto 1 - Marrubiína (Mv1)

O composto 1 (Mv1) foi isolado da fração de AcOEt das flores da planta e, após realizar a cromatografia em coluna de sílica gel, observou-se a formação de um sólido branco. A sua estrutura (Figura 19) foi confirmada através de IV e RMN ^1H e ^{13}C e comparada com dados disponíveis na literatura para marrubiína, composto abundante na planta trabalhada, que possui uma massa molar de 332,4 g/mol e fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$.

Figura 19 – Estrutura química elucidada do composto 1 (Mv1)



Fonte: elaborado pela autora

No espectro de infravermelho (APÊNDICE A), obtido em pastilha de KBr, observaram-se bandas de deformação axial de O-H em 3464 cm^{-1} , deformação axial de C-H sp^2 em 2942 cm^{-1} , deformação axial de C-H sp^3 em 2866 cm^{-1} , deformação axial em 1738 cm^{-1} referente à carbonila C=O do éster.

Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C (APÊNDICES B e C), apresentados na Tabela 6, indicam que o composto 1 (Mv1) trata-se de um diterpeno labdano em comparação com a literatura (HUSSEIN; MEYER; RODRÍGUEZ, 2003). Pelo espectro de RMN ^1H observam-se hidrogênios olefínicos de um anel furano em 6,27, 7,23 e 7,36 ppm, referentes as posições 14, 15 e 16, respectivamente. Os sinais das metilas C-17, C-20 e C-18 encontram-se na região de 0,95, 1,06 e 1,29 ppm. Já no espectro de RMN ^{13}C , pode-se observar um grupo

carbonila do éster na posição C-19 com deslocamento químico de 183,98 ppm e um grupo hidroxila na posição C-9 na região de 75,95 ppm.

Tabela 6 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3) de Mv1 em comparação com a literatura para marrubiína

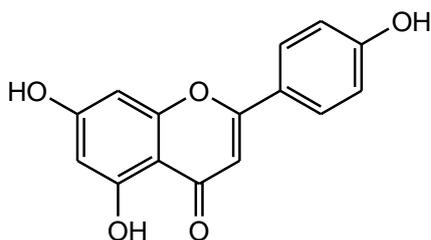
Posição	^1H NMR (200 MHz, CDCl_3)				^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3)	
	δ ppm	J Hz	H	Lit ^1H	δ ppm	Lit ^{13}C
1	1.63		2H, s	1.66; 1.30	28.79	28.63
2	1.76 – 1.67		m	1.71; 1.49	18.31	18.15
3	2.11			1.44; 2.10	28.51	28.35
4	-	-	-	-	43.95	43.79
5	2.23	4.6 Hz	d	2.22	45.02	45.86
6	4.78 – 4.70		1H, m	4.73	76.34	76.17
7	2.07 – 2.03		m	1.67; 2.15	31.67	31.51
8	2.11			2.1	32.50	32.34
9	-	-	-	-	75.95	75.79
10	-	-	-	-	39.89	39.73
11	1.76 – 1.67		m	1.75; 1.89	35.30	35.13
12	2.53	8.4 Hz	3H, t	2.52; 2.52	21.15	20.99
13	-	-	-	-	125.20	125.04
14	6.27	0.8 Hz	1H, d	6.26	110.86	110.7
15	7.36	1.6 Hz	1H, t	7.35	143.25	143.09
16	7.23		1H, s	7.22	138.74	138.58
17	0.96	6.3 Hz	d	0.96	16.74	16.58
18	1.29		3H, s	1.28	23.13	22.97
19	-	-	-	-	183.98	183.81
20	1.06		3H, s	1.05	22.40	22.24
Solvente	200 MHz CDCl_3			400 MHz CDCl_3	50 MHz CDCl_3	100 MHz CDCl_3

Fonte: elaborado pela autora. Dados da literatura para marrubiína adaptado (HUSSEIN; MEYER; RODRÍGUEZ, 2003)

5.2.2.2. Composto 2 - Apigenina (Mv2)

O segundo composto caracterizado foi a Apigenina (Mv2), um sólido amorfo amarelo, que possui uma massa molar de 270,24 g/mol e fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$. A sua estrutura (Figura 20) foi confirmada através de IV e RMN ^1H e ^{13}C e comparada com dados disponíveis na literatura para apigenina.

Figura 20 – Estrutura química elucidada do composto 2 (Mv2)



Fonte: elaborado pela autora

No espectro de infravermelho (APÊNDICE D), obtido em pastilha de KBr, observaram-se bandas em 3406 – 3250 cm^{-1} (banda larga) relativa à deformação axial de O-H, deformação axial de C-H sp^2 em 2923 cm^{-1} , deformação axial em 1657 cm^{-1} referente à carbonila C=O, e deformação axial de C=C em 1609 -1504 cm^{-1} .

Os valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H e ^{13}C (APÊNDICES E e F), apresentados na Tabela 7, indicam que o composto 1 (Mv2) trata-se de um flavonóide em comparação com a literatura (NAWAL; ATTA, 2013). Pelo espectro de RMN ^1H observam-se hidrogênios aromáticos em 6,76, 6,19, 6,48, 7,91 e 6,92 ppm, referentes as posições 3, 6, 8, 12 e 16, e 13 e 15, respectivamente, e uma das 3 hidroxilas com deslocamento químico em 12,94 ppm. Já no espectro de RMN ^{13}C , pode-se observar uma carbonila na região de 181,73 ppm na posição C-4, três grupos hidroxilas nas posições C-5, C-7 e C-14 com deslocamento químico visível em 161,55, 164,18 e 161,82 ppm, respectivamente. Além disso é possível observar um grupo éter entre as posições C-2 e C-9 com deslocamento químico em 164,60 e 157,73 ppm, respectivamente.

Tabela 7 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (DMSO) de Mv2 em comparação com a literatura para Apigenina

Posição	^1H NMR (200 MHz, DMSO)				^{13}C NMR (50 MHz, DMSO)	
	δ ppm	J Hz	H	Lit ^1H	δ ppm	Lit ^{13}C
2	-	-	-	-	164.60	163.71
3	6.76	-	1H, s	6.75 (s)	103.22	102.81
4	-	-	-	-	182.13	181.73
5	-	-	-	-	161.55	161.25
6	6.19	2.1 Hz	1H, d	6.15 (d, 1H)	99.28	98.96
7	-	-	-	-	164.18	164.57
8	6.48	2.1 Hz	1H, d	6.44 (d, 1H)	94.42	94.06

9	-	-	-	-	157.73	157.37
10	-	-	-	-	104.06	103.56
11	-	-	-	-	121.57	121.17
12	7.91	8.8 Hz	2H, d	7.91 (d, 2H)	128.88	128.51
13	6.92	8.8 Hz	2H, d	6.90 (d, 2H)	116.4	116.01
14	-	-	-	-	161.81	161.46
15	6.92	8.8 Hz	2H, d	6.90 (d, 2H)	116.4	116.01
16	7.91	8.8 Hz	2H, d	7.91 (d, 2H)	128.88	128.51
OH	12.94	-	1H, s	12.94 (-OH)	164.18	163.71
Solvente	200 MHz DMSO-d ₆			500 MHz DMSO-d ₆	50 MHz DMSO-d ₆	125 MHz DMSO-d ₆

Fonte: elaborado pela autora. Dados da literatura para apigenina adaptado (NAWAL; ATTA, 2013)

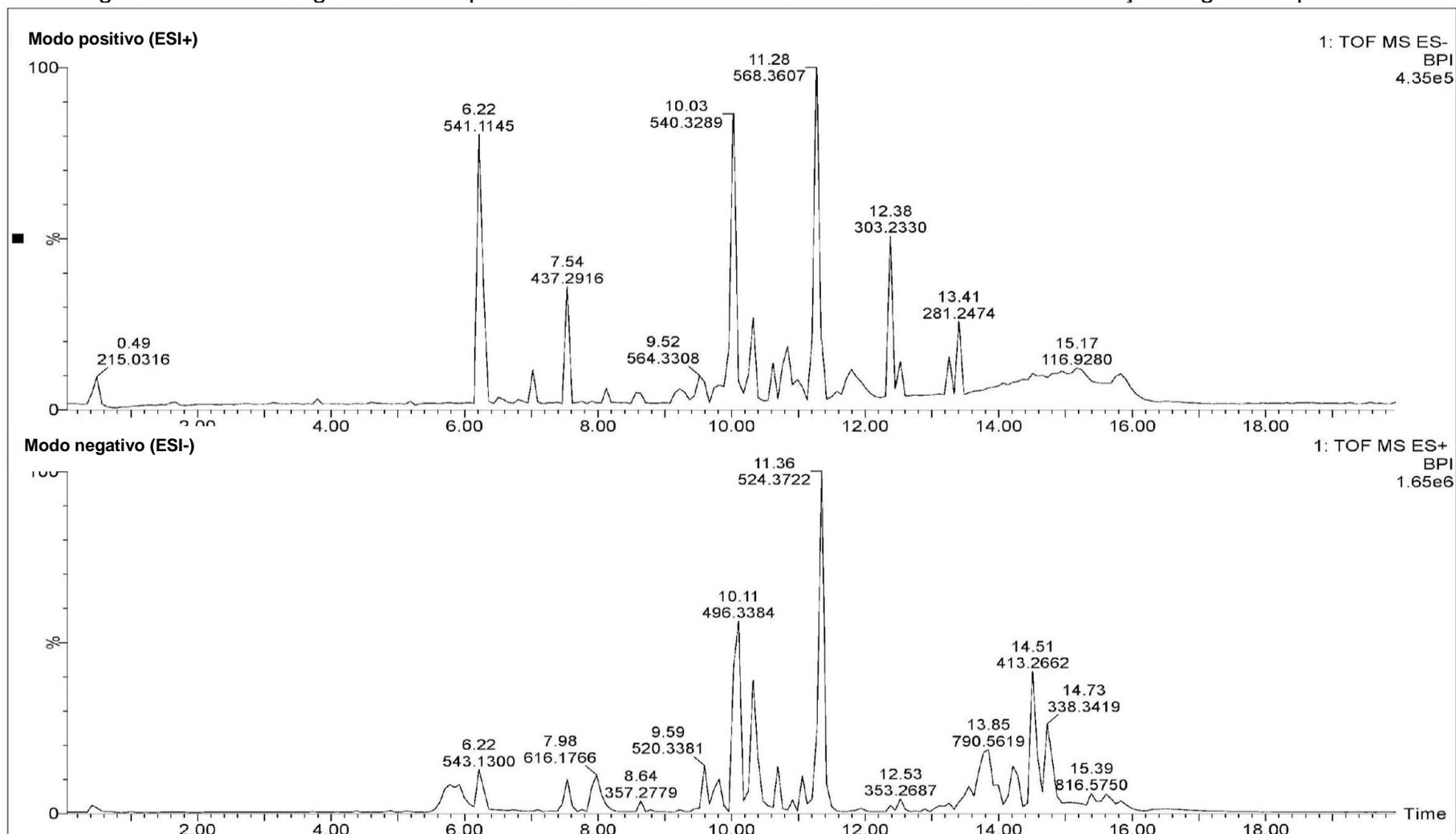
5.3. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS NO SORO ANIMAL

5.3.1. Análise por UPLC-ESI-MS do soro animal

A fim de acompanhar possíveis mudanças no metabolismo dos suínos, como identificar metabólitos vegetais e substâncias derivadas do metabolismo animal, foi realizada análise por UPLC-ESI-MS do extrato orgânico do sangue animal. Foi colhido o sangue de todos os animais que receberam a dose mais concentrada da infusão de *Marrubium vulgare* (20% MVI), nos tempos de 5 (G1), 10 (G2) e 15 (G3) minutos após a administração da MVI, resultando em 18 cromatogramas. Foi observado uma similaridade no perfil químico sanguíneo desses animais, dessa forma foi escolhido um cromatograma para representar todos os grupos e animais.

O soro do sangue dos animais foi utilizada para gerar dados de UPLC-ESI-MS nos modos de ionização negativo e positivo (Figura 21), utilizando íons de pico de base (BPI) para a aquisição. Foram caracterizados 15 compostos.

Figura 21 – Cromatograma obtido por UPLC-MS do soro animal obtido nos modos de ionização negativo e positivo



Fonte: autoria própria

Conforme apresentado na Tabela 8, a maioria dos íons precursores detectados não apresentaram fragmentação. Dessa forma, o perfil químico foi estabelecido com base na literatura.

Os compostos detectados foram caracterizados como: 1 hexose (pico 34), 7 derivados de colesterol e 5 derivados de ácidos graxos, incluindo um monoglicerídeo e um oligossacarídeo. Esses compostos foram encontrados ao lado de 2 compostos naturais.

Tabela 8 – Perfil químico por UPLC-ESI-MS do soro do sangue animal

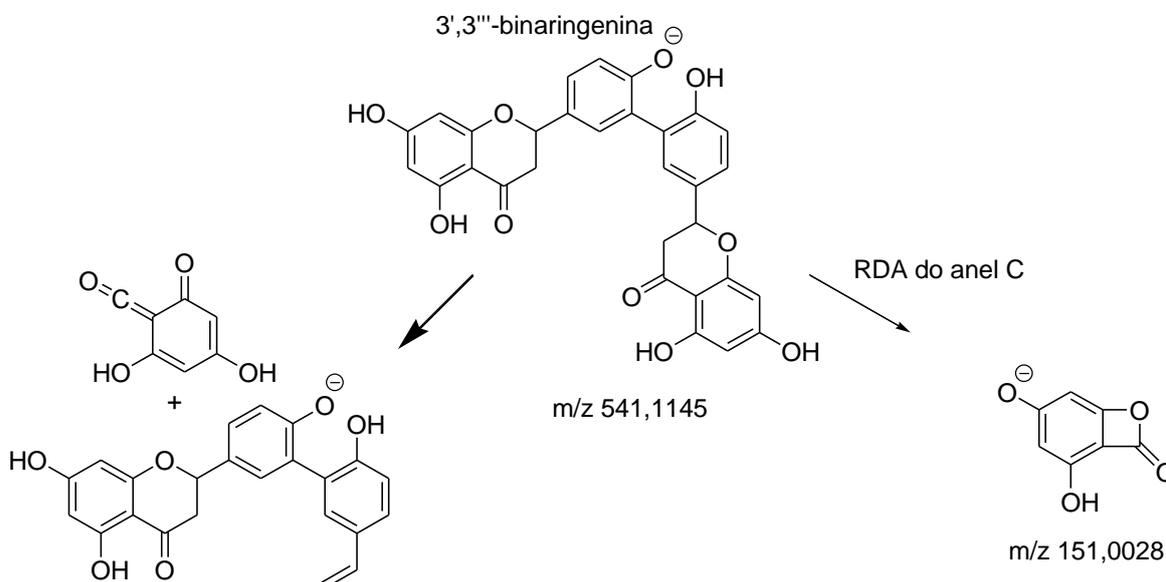
Número do pico	Tempo de Retenção - t _R (min)	ESI+ (m/z)	ESI- (m/z)	Fragmentação (m/z)	Fórmula Molecular	Composto identificado	Encontrado no grupo
34	0.42	203.0523 [M+Na] ⁺	-	-	C ₆ H ₁₂ O ₆	Hexose	G1, G2
35	6.22	543.1300 [M+H] ⁺	541.1145 [M-H] ⁻	389.1011; 151.0028	C ₃₀ H ₂₂ O ₁₀	3',3''bisnaringenina ou tetrahydroamentoflavona	G1, G2
36	7.03	-	453.2867 [M+HCO ₂] ⁻ 407.2783 [M-H] ⁻	389.2708	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	Ácido cólico	G1, G3
37	7.54	357.2779 [M+H] ⁺	-	-	C ₂₄ H ₃₆ O ₂	Ácido 5-cola-8(14)11-dien-24-óico (LÓPEZ-BASCÓN et al., 2019)	G1, G2, G3
38	7.54	-	437.2916 [M+HCO ₂] ⁻ 391.2852 [M-H] ⁻	-	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	Ácido desoxicólico	G1, G2, G3
39	8.13	-	471.0612 [M-H] ⁻	-	C ₁₅ H ₂₀ O ₁₇	Oligossacarídeo	G1, G2, G3
40	8.57	-	437.2916 [M+HCO ₂] ⁻	--	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	Isômero do 38	
41	8.64	357.2779 [M+H] ⁺	-	-	C ₂₄ H ₃₆ O ₂	Isômero do 37	G1, G3
42	12.38	-	303.2330 [M-H] ⁻	259.2411	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Metabólito diterpênico (ácido copálico)	G2
43	12.53	353.2687 [M+H] ⁺	-	-	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	mono-linoleoil glicerol	G1
44	12.53	-	279.2319 [M-H] ⁻	-	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Ácido linoleico	G1
45	13.26	-	255.2313 [M-H] ⁻	-	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ácido palmítico	G1
46	13.41	-	281.2474 [M-H] ⁻	-	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Ácido oleico	G1
47	14.22	401.3418 [M+H] ⁺	-	-	C ₂₇ H ₄₄ O ₂	(5 α)-Colestano-3,6-diona	G1
48	14.51	413.2662 [M+Na] ⁺	-	-	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ácido nutracólico (LÓPEZ-BASCÓN et al., 2019)	G1, G2

Fonte: elaborado pela autora

Legenda: G1: 5 min, G2: 10 min e G3: 15 min.

O pico 35 com tempo de retenção de 6,22 min e íon precursor de m/z 543,1300 $[C_{30}H_{22}O_{10}+H]^+$ gerou um fragmento de m/z 389,1011 após a abertura e clivagem do anel C em uma das unidades de flavanona (Figura 22). Além desse, foi detectado outro fragmento iônico m/z 151,0028 formado pela abertura Retro-Diels-Alder do anel C, que pode ser referente à benzo- β -lactona. A partir destas informações, foram consideradas duas estruturas compatíveis para o pico 35, a tetrahydroamentoflavona e a 3',3''-binaringenina.

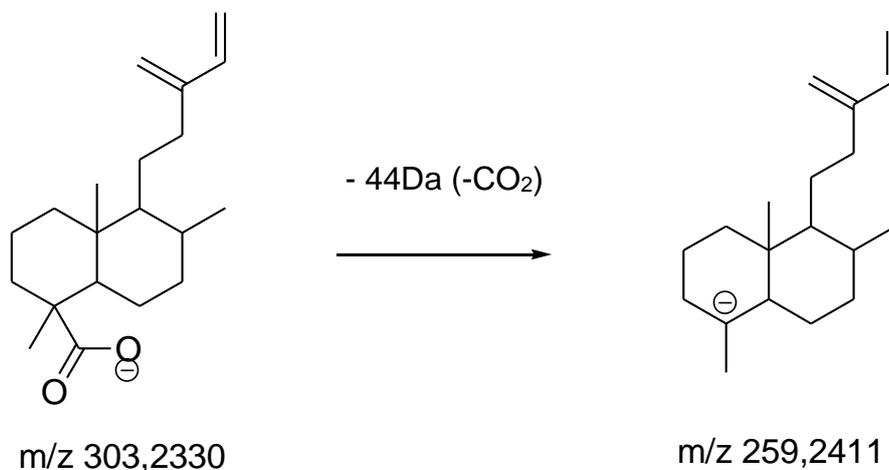
Figura 22 – Esquema de padrão de fragmentação para caracterização do metabólito sanguíneo m/z 541,1145 no pico 35



Fonte: elaborado pela autora

O pico 42 com t_R 12,38 min e com íon precursor de m/z 303,2330 $[C_{20}H_{32}O_2-H]^-$ gerou um fragmento único de íon m/z 259,2411 após uma perda de CO_2 (44 Da), conforme demonstrado na Figura 23. Com essa composição elementar e íon fragmento obtido, é possível dizer que se refere a estrutura de um diterpeno. Quando pesquisado na literatura, a fórmula molecular foi consistente com a estrutura do ácido copálico, porém com a estabilidade do ânion pode-se sugerir um diterpeno labdano próximo à estrutura da marrubiína.

Figura 23 - Esquema de padrão de fragmentação para caracterização do metabólito sanguíneo m/z 303,2330 no pico 42



Fonte: elaborado pela autora

De acordo com a literatura a apigenina, possui atividade anti-inflamatória, uma vez que suprime a fosforilação de moléculas sinalizadoras (ERK e JNK) e a expressão de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucinas 4, 5, 6 e 13 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13) e a enzima ciclooxygenase do tipo 2 (COX-2) (PARK et al., 2020). Também possui propriedades anticancerígenas (HUANG et al., 2023; TURKTEKIN et al., 2011), e imunomoduladora (LIU et al., 2017). Além disso, apresenta efeitos significativos na redução da glicemia e regulação dos lipídios sanguíneos (JIANG et al., 2022), podendo justificar os efeitos observados nas análises sanguíneas.

Estudos biológicos prévios demonstraram que a planta *M. vulgare* L. possui várias propriedades, como propriedades antioxidantes e de cicatrização de feridas, ensaio baseado em células de fibroblastos dérmicos humanos. Para este ensaio foi utilizado extrato hidroalcoólico da planta que obtiveram efeitos promissores independentes da dose da marrubiína, composto majoritário na planta (AMRI et al., 2017). O extrato etanólico da planta também foi utilizado para atividade anti-helmíntica contra estrôngilos digestivos bovinos (MOUSSOUNI; BENHANIFIA; AYAD, 2018). Já o extrato metanólico e a marrubiína em outros ensaios apresentaram efeitos gastroprotetores significativos em camundongos *Swiss* com úlceras gástricas (OLIVEIRA et al., 2011). A extração de *M. vulgare* por micro-ondas gerou um extrato bruto com alta atividade antimicrobiana contra *Bacillus*

cereus e *Saccharomyces cerevisiae* (GAVARIĆ et al., 2022). Atividades antimicrobianas também foram relatadas para extratos hidroetanólicos e hidroacetônicos contra bactérias gram-positivas e negativas e fungos (MSSILLOU et al., 2021). Além disso, estudos farmacológicos demonstraram que a marrubiína demonstra propriedades antinociceptivas, antioxidantes, antígenotóxicas, cardioprotetoras, vasorelaxantes, gastroprotetoras, antiespasmódicas, imunomoduladoras, antiedematogênicas, analgésicas e antidiabéticas (POPOOLA et al., 2013).

O efeito fitogênico observado pode estar relacionado às propriedades antimicrobianas (ZARAI et al., 2011), antioxidantes (MATKOWSKI; PIOTROWSKA, 2006; WEEL et al., 1999), protetoras da mucosa (OLIVEIRA et al., 2011), anti-inflamatórias (STULZER et al., 2006) e imunomoduladoras da planta (DAOUDI; AARAB; ABDEL-SATTAR, 2013). Desse modo, tendo em vista os compostos caracterizados e sabendo de suas funções e atividades, é possível dizer que a infusão do extrato da planta não prejudicou a saúde animal.

A conversão alimentar global e o ganho de peso e dos animais podem estar relacionados às ações dessas substâncias no metabolismo animal, porém ainda são necessários mais estudos para esclarecimento, uma vez que os mecanismos de ação dos principais componentes (marrubiína e apigenina) ainda não foram elucidados. Apesar disso, se tem conhecimento dos benefícios farmacológicos desses compostos, conforme exposto anteriormente, sendo possível dizer que não só contribuíram para o crescimento do animal, mas também para o seu bem-estar.

6. CONCLUSÃO

O perfil químico do extrato fluido obtido por infusão das partes aéreas de *Marrubium vulgare* L. foi caracterizado através da técnica de UPLC-ESI-MS e resultou na identificação de 33 metabólitos secundários presentes na planta de diferentes classes químicas, como flavonóides, diterpenos, aminoácidos e derivados de ácidos graxos.

Através de coluna cromatográfica com extrato de AcOEt das flores de *M. vulgare* foi isolado e caracterizado dois compostos já identificados na espécie, um diterpeno labdano conhecido como marrubiína, marcador químico do gênero *Marrubium*, e um flavonóide conhecido como apigenina. Os dois compostos também foram caracterizados através da técnica de UPLC-ESI-MS.

Nas análises bioquímicas, foi possível observar os efeitos do extrato fluido nos animais. Os suínos que receberam MVI 1% e MVI 10% obtiveram um maior ganho de peso global ao longo do experimento em comparação ao grupo do controle negativo (C), diferentemente, o grupo que recebeu maior concentração de infusão (MVI 20%) apresentou valores inferiores de ganho de peso em relação ao grupo C, isso pode ser associado à presença de substâncias no extrato da planta que suprimem o metabolismo dos triglicerídeos e do açúcar. O crescimento dos animais, o ganho de peso e a conversão alimentar global observadas podem estar relacionadas às ações de substâncias presentes na infusão aquosa que aumentaram o metabolismo animal.

Em vista disso, é possível afirmar que a administração da infusão do extrato aquoso de *M. vulgare* em suínos recém-desmamados resultou em um aumento significativo no ganho de peso dos animais, demonstrando-se potencialmente promissor como promotor de crescimento devido às propriedades fitobióticas da planta, uma vez que a presença de metabólitos secundários, como flavonoides, diterpenos e ácidos fenólicos, podem ter contribuído para os efeitos observados nos animais, devido suas atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antiparasitárias e antioxidantes. A presença dos compostos isolados e caracterizados na planta podem ter contribuído para esse crescimento dos suínos e também para seu bem-estar geral.

Através das contagens de eritrócitos e hemoglobina total o efeito da administração de MVI após 30 dias indicou que os suínos não desenvolveram anemia, icterícia ou hemoglobinúria durante o experimento. Os grupos que receberam a infusão do extrato (MVI 1%, 10% e 20%) apresentaram uma diminuição nos eritrócitos em comparação com o grupo de controle negativo (C) e positivo (PC). A hemoglobina nesses grupos diminuiu quando comparados ao grupo controle negativo (C), porém os valores dos hematócitos estiveram dentro da normalidade, assim como uma queda do VCM desses grupos, quando comparados ao grupo do controle positivo (PC), com contagem de neutrófilos superior ao valor de referência nos dias 21 e 28. Em dias específicos, os grupos MVI 1%, 10% e 20% apresentaram quantidade de linfócitos abaixo do limite do valor de referência. O aumento de neutrófilos e as diminuições observadas para linfócitos e eosinófilos, podem estar relacionados à ação imunomoduladora da planta, sugerindo uma interferência na mobilidade dos leucócitos, e na desgranulação dos eosinófilos.

Nas análises bioquímicas também foi possível observar que não houve variações significativas para metabólitos sanguíneos, como colesterol e creatinina, bem como proteínas plasmáticas, proteínas totais e albumina sanguínea, indicando assim que a infusão de *M. vulgare* nas concentrações testadas no estudo é inócua em termos de toxicidade sistêmica e orgânica, para o fígado ou rins dos animais.

Para observar essas mudanças no metabolismo dos suínos, identificar metabólitos vegetais e substâncias derivadas do metabolismo animal, foi realizado também análise por UPLC-ESI-MS do extrato orgânico em acetonitrila do soro animal, no qual foram caracterizados 15 compostos, sendo eles hexose, lipídeos, derivados de colesterol e ácidos graxos. A análise dos parâmetros bioquímicos, do perfil químico do extrato da infusão e do soro sanguíneo dos animais revelou que a infusão não apresentou efeitos adversos dentro dos parâmetros avaliados.

Como as variações observadas nas análises não foram significativas e nem houve efeitos negativos na saúde dos animais que receberam a administração crônica em doses crescentes da infusão de *M. vulgare*, e foi possível observar melhora no estado geral dos animais e crescimento dos suínos, pode-se dizer que o efeito fitogênico está relacionado às propriedades imunomoduladoras da planta.

Portanto, com base nos estudos realizados, é possível afirmar que a infusão de *Marrubium vulgare* nas concentrações de 1 e 10% podem ser uma alternativa viável e segura como promotor natural de crescimento em suínos e que a infusão aquosa de *M. vulgare* é desprovida de toxicidade quando utilizada na totalidade de seus compostos fitoquímicos. Apesar dos resultados promissores, é importante ressaltar a necessidade de investigações mais abrangentes para compreender completamente os efeitos e possíveis limitações do uso da planta como alternativa de antibióticos e promotor de crescimento na produção animal, uma vez que os mecanismos de ação dos principais componentes (marrubiína e apigenina) e do próprio extrato aquoso ainda não foram esclarecidos.

O modelo de estudo aplicado serve de base metodológica para a pesquisa de compostos fitoquímicos e de moléculas sintéticas em animais de interesse agrícola. Além disso, estudos futuros podem se concentrar na identificação dos mecanismos específicos de ação dos compostos presentes em *Marrubium vulgare* e em avaliações mais detalhadas dos efeitos a longo prazo da infusão da planta na saúde e no desempenho do crescimento dos animais.

REFERÊNCIAS

AĆIMOVIĆ, M. et al. Marrubium vulgare L.: A Phytochemical and Pharmacological Overview. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2898, 24 jun. 2020.

AGOSTINI-COSTA, T. DA S. et al. Secondary Metabolites. Em: DHANARASU, S. (Ed.). **Chromatography and Its Applications**. IntechOpen ed. [s.l.] InTech, 2012. p. 212.

ALNOMASY, S. et al. Systematic review on medicinal plants used for the treatment of Giardia infection. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 9, p. 5391–5402, set. 2021.

AL-ZABAN, M.; NAGHMOUCHI, S.; ALHARBI, N. K. HPLC-analysis, biological activities and characterization of action mode of saudi marrubium vulgare against foodborne diseases bacteria. **Molecules**, v. 26, n. 17, 1 set. 2021.

AMOABENG, B. W.; JOHNSON, A. C.; GURR, G. M. Natural enemy enhancement and botanical insecticide source: a review of dual use companion plants. **Applied Entomology and Zoology**, v. 54, n. 1, p. 1–19, 18 fev. 2019.

AMRI, B. et al. Marrubium vulgare L. leave extract: Phytochemical composition, antioxidant and wound healing properties. **Molecules**, v. 22, n. 11, 1 nov. 2017.

ASADI-SAMANI, M. et al. Traditional uses of medicinal plants to prevent and treat diabetes; an updated review of ethnobotanical studies in Iran. **Journal of Nephropathology**, v. 6, n. 3, p. 118–125, 15 jan. 2017.

AVILA, M. DEL V. et al. Insecticidal Activity of Essential Oils against Mealybug Pests (Hemiptera: Pseudococcidae): A Systematic Review and Meta-Analysis. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 109, 26 dez. 2022.

BARREIRO, E. J. et al. Modelagem Molecular: Uma Ferramenta para o Planejamento Racional de Fármacos em Química Medicinal. **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 300–310, jun. 1997.

BEKUT, M. et al. Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. **Pharmacological Research**, v. 133, p. 301–314, jul. 2018.

BITTENCOURT, C. M. DA S. **Análise fitoquímica e farmacológica de plantas medicinais selecionadas da flora catarinense: Aleurites moluccana, Bauhinia microstachya e Marrubium vulgare**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

BRASIL. **Lei Nº11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências**. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 14 abr. 2024.

BROCKUS, C. W. et al. Hematologic and serum biochemical reference intervals for Vietnamese potbellied pigs (*Sus scrofa*). **Comparative Clinical Pathology**, v. 13, n. 4, p. 162–165, jul. 2005.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUCK, F. Antimicrobial Growth Promoters Used in Animal Feed: Effects of Less Well Known Antibiotics on Gram-Positive Bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 175–188, abr. 2003.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 680–685, out. 2000.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, fev. 1998.

CHAN, R. et al. Occurrence of antibiotics in typical pig farming and its wastewater treatment in Thailand. **Emerging Contaminants**, v. 8, p. 21–29, 2022.

CONSELHO DE CURADORES DO ROYAL BOTANIC GARDENS, K. **Marrubium vulgare** L. Disponível em: <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:449990-1/images>>. Acesso em: 9 nov. 2023.

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, 2 abr. 2013.

DE ALMEIDA OLLÉ, M. et al. Uso de antibióticos na alimentação de suínos - Revisão de literatura. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, p. 1–18, 2017.

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

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. ed. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd, 2009.

ERB, M.; KLIEBENSTEIN, D. J. **Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy**¹[OPEN]. **Plant Physiology** American Society of Plant Biologists, , 1 set. 2020.

EUROPEAN COMMISSION. **Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect (IP/05/1687)**. Disponível em: <https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_05_1687>. Acesso em: 28 abr. 2024.

FOTSING YANNICK STÉPHANE, F. et al. Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs. Em: **Natural Medicinal Plants**. [s.l.] IntechOpen, 2022.

GAO, F.; LEIDIG, M.; MABRY, T. J. Ent-labdane derivatives from *gutierrezia grandis*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1541–1543, jan. 1985.

GAVARIĆ, A. et al. The Application of Ultrasonic Waves and Microwaves to Improve Antihyperglycaemic and Antimicrobial Activities of *Marrubium vulgare* Extracts. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1475, 25 out. 2022.

GIANG, P. M. et al. New Labdane-Type Diterpenoids from *Leonurus heterophyllus* SW. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 8, p. 938–941, 2005.

HAILE, A. A. et al. A Review on Medicinal Plants Used in the Management of Respiratory Problems in Ethiopia over a Twenty-Year Period (2000–2021). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 1–14, 27 jun. 2022.

HAO, Y. et al. Unraveling the Biosynthesis of Carvacrol in Different Tissues of *Origanum vulgare*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 21, p. 13231, 30 out. 2022.

HARVEY, J. W. Introduction to Veterinary Hematology. Em: **Veterinary Hematology**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 1–10.

HASHEMI, S. R.; DAVOODI, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. **Veterinary Research Communications**, v. 35, n. 3, p. 169–180, 8 mar. 2011.

HERNÁNDEZ-CARLOS, B.; GAMBOA-ANGULO, M. Insecticidal and Nematicidal Contributions of Mexican Flora in the Search for Safer Biopesticides. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 897, 4 mar. 2019.

HUANG, J. et al. Boosting Anti-tumour Immunity Using Adjuvant Apigenin. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 266–277, fev. 2023.

HUSSEIN, A. A.; MEYER, M. J. J.; RODRÍGUEZ, B. Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of three labdane diterpenoids isolated from *Leonotis ocyimifolia* and six

other related compounds. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, n. 2, p. 147–151, 7 fev. 2003.

IVANOVA, S. et al. **Medicinal plants: A source of phytobiotics for the feed additives**. **Journal of Agriculture and Food Research** Elsevier B.V., 1 jun. 2024.

JIANG, J. et al. **Research progress on antidiabetic activity of apigenin derivatives**. **Medicinal Chemistry Research** Springer, 1 nov. 2022.

JOLY, A. B. **Botânica: Chaves de identificação das famílias de plantas vasculares que ocorrem no Brasil**. 3^a ed. [s.l.] Nacional, 1977.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. [s.l.] Elsevier, 2008.

KHARE, S. et al. **Plant secondary metabolites synthesis and their regulations under biotic and abiotic constraints**. **Journal of Plant Biology** Springer, 1 jun. 2020.

KUBITZK, K. **THE FAMILIES AND GENERA OF VASCULAR PLANTS: Flowering Plants. Dicotyledons: Lamiales**. Berlin: Springer Verlag, 2004. v. VII

KUMAR, A. et al. **Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method**. **Molecules** MDPI, 1 jan. 2023.

LEE, S. H. et al. Cinnamaldehyde enhances in vitro parameters of immunity and reduces in vivo infection against avian coccidiosis. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. 6, p. 862–869, 28 set. 2011.

LI, J. et al. Bis-spirolabdane Diterpenoids from *Leonotis nepetaefolia*. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 4, p. 728–734, 27 abr. 2012.

LIU, Y. et al. Effect of apigenin on dendritic cells maturation and function in murine splenocytes. **Acta Pharmaceutica Sinica**, v. 52, p. 397–402, 2017.

LÓPEZ-BASCÓN, M. A. et al. Comprehensive analysis of pig feces metabolome by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry in high resolution mode: Influence of sample preparation on the identification coverage. **Talanta**, v. 199, p. 303–309, jul. 2019.

LU, J. et al. Apigenin reduces the excessive accumulation of lipids induced by palmitic acid via the AMPK signaling pathway in HepG2 cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 16 ago. 2019.

MANUELIAN, C. L. et al. Plant Feed Additives as Natural Alternatives to the Use of Synthetic Antioxidant Vitamins on Livestock Mammals' Performances, Health, and Oxidative Status: A Review of the Literature in the Last 20 Years. **Antioxidants**, v. 10, n. 9, p. 1461, 14 set. 2021.

MARINI-BETTÒLO, G. B. et al. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 213, n. 1, p. 113–127, ago. 1981.

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, jul. 2006.

MEYRE-SILVA, C.; CECHINEL-FILHO, V. **A Review of the Chemical and Pharmacological Aspects of the Genus Marrubium** *Current Pharmaceutical Design*, 2010.

MICHEL, J.; ABD RANI, N. Z.; HUSAIN, K. A Review on the Potential Use of Medicinal Plants From Asteraceae and Lamiaceae Plant Family in Cardiovascular Diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 5 jun. 2020.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E. I. N. D. C. D. E. A. **Resolução CONCEA nº 66, de 2 de maio de 2023. Dispõe sobre as condições que deverão ser observadas para a criação, a manutenção e a experimentação de suínos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica.** Disponível em:

<<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-concea-n-66-de-2-de-maio-de-2023-480854156>>. Acesso em: 14 abr. 2024.

MONTANARI, C. A. Química medicinal: contribuição e perspectiva no desenvolvimento da farmacoterapia. **Química nova**, v. 18, p. 56–64, 1995.

MOTA, M. C. DE A. et al. Lamiaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 68, n. 1, p. 143–157, mar. 2017.

MOUSSOUNI, L.; BENHANIFIA, M.; AYAD, A. In-vitro Anthelmintic Effects of Aqueous and Ethanolic Extracts of Marrubium vulgare Leaves Against Bovine Digestive Strongyles. **Turkish Journal of Parasitology**, v. 42, n. 4, p. 262–267, 28 dez. 2018.

MSSILLOU, I. et al. Chemical Composition and In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Marrubium vulgare L. **The Scientific World Journal**, v. 2021, p. 1–8, 31 out. 2021.

NAWAL, H. M.; ATTA, E. M. Cytotoxic and antioxidant activity of Marrubium vulgare and its flavonoid constituents. **2nd International Conference on Chemical, Environmental and Biological Sciences**, p. 40- 42., 2013.

NÉVOA, M. L. et al. Desempenho e características bioquímicas de leitões submetidos a dietas com aditivos probióticos, prebióticos, simbióticos e antibióticos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 2, p. 447–454, abr. 2013.

OLIVEIRA, A. P. DE 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, 9 ago. 2011.

PARK, C.-H. et al. Effects of Apigenin on RBL-2H3, RAW264.7, and HaCaT Cells: Anti-Allergic, Anti-Inflammatory, and Skin-Protective Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4620, 29 jun. 2020.

PIOZZI, F. et al. The Diterpenoids of the Genus *Marrubium* (Lamiaceae). **Natural Product Communications**, v. 1, n. 7, p. 1934578X0600100, 25 jul. 2006.

PLACHA, I.; GAI, F.; POGÁNY SIMONOVÁ, M. Editorial: Natural feed additives in animal nutrition—Their potential as functional feed. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, 9 nov. 2022.

PLEADIN, J. et al. Clenbuterol residues in pig muscle after repeat administration in a growth-promoting dose. **Meat Science**, v. 86, n. 3, p. 733–737, nov. 2010.

POKHAREL, S.; SHRESTHA, P.; ADHIKARI, B. Antimicrobial use in food animals and human health: time to implement 'One Health' approach. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 181, 7 dez. 2020.

POPOOLA, O. K. et al. **Marrubiin. Molecules**, ago. 2013.

REZGUI, M. et al. Antioxidant and antifungal activities of marrubiin, extracts and essential oil from *Marrubium vulgare* L. against pathogenic dermatophyte strains. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 30, n. 1, p. 100927, abr. 2020.

ROLAND, L.; DRILLICH, M.; IWERSEN, M. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 26, n. 5, p. 592–598, 13 set. 2014.

RUND, K. M. et al. Development of an LC-ESI(-)-MS/MS method for the simultaneous quantification of 35 isoprostanes and isofurans derived from the major n3- and n6-PUFAs. **Analytica Chimica Acta**, v. 1037, p. 63–74, dez. 2018.

SALEM, M. A. et al. **Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. Metabolites**. 1 jan. 2020.

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

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1. ed. [s.l.] Artmed Editora, 2016.

SKENDI, A.; IRAKLI, M.; CHATZOPOULOU, P. Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 6, p. 62–69, set. 2017.

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

SWEIDAN, N. I.; ZARGA, M. H. A. Acylated Flavonoid Glucoside from *Marrubium vulgare*. **Letters in Organic Chemistry**, v. 13, p. 277–282, 2016.

TKACZ, K. et al. Phytoprostanes, phytofurans, tocopherols, tocotrienols, carotenoids and free amino acids and biological potential of sea buckthorn juices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 1, p. 185–197, 15 jan. 2022.

TURKTEKIN, M. et al. Evaluation of the Effects of the Flavonoid Apigenin on Apoptotic Pathway Gene Expression on the Colon Cancer Cell Line (HT29). **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1107–1117, out. 2011.

WATANABE, H.; SHIBUYA, T. **Pharmacological Research on Traditional Herbal Medicines**. Taylor & Francis ed. London: [s.n.].

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, out. 1999.

WINDISCH, W. et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry¹. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. suppl_14, p. E140–E148, 1 abr. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance**. Disponível em:

<<https://www.who.int/news/item/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>>. Acesso em: 28 abr. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance** . Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 28 abr. 2024.

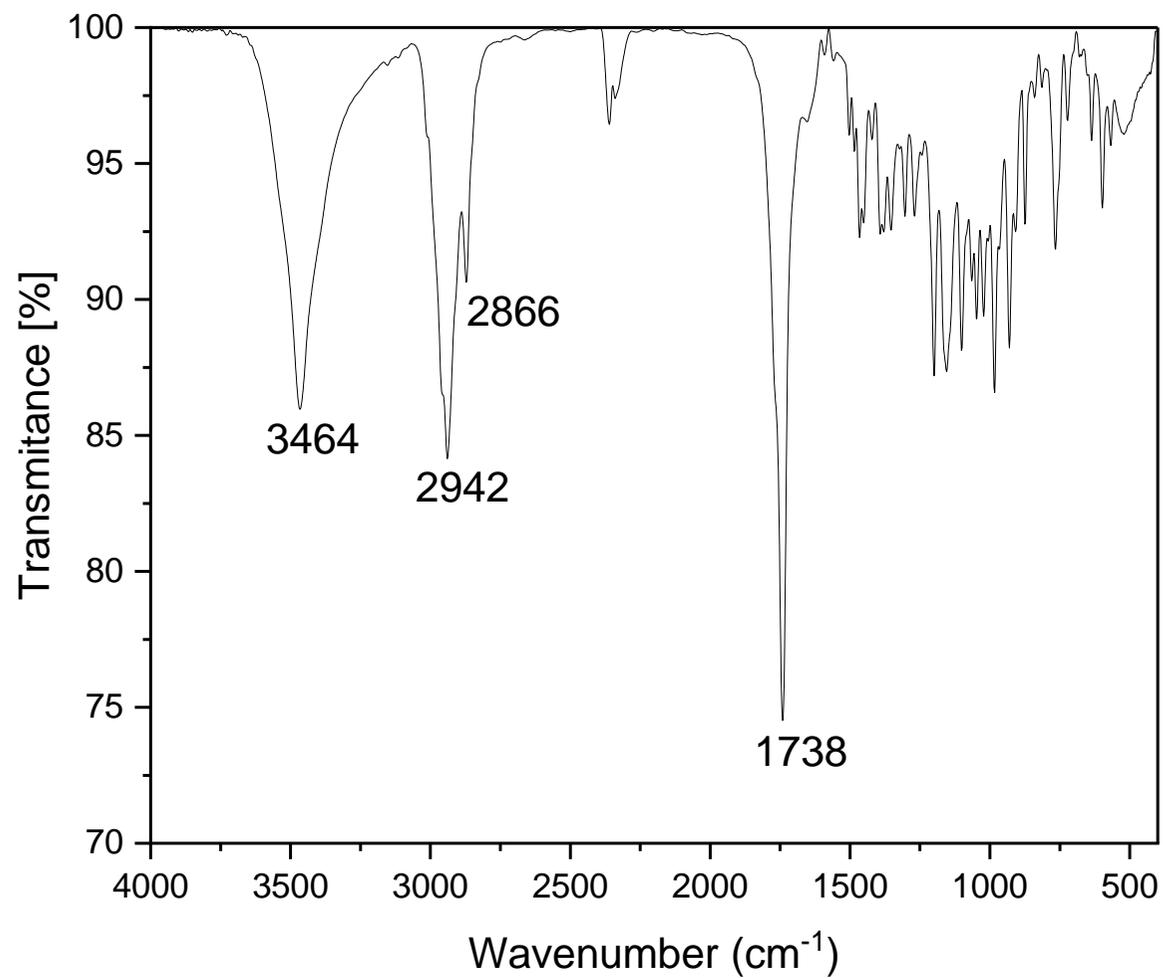
YABRIR, B. Essential Oil of Marrubium vulgare: Chemical Composition and Biological Activities. A Review. **Natural Product Sciences**, v. 25, n. 2, p. 81, 2019.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de Produtos Naturais: Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. 5. ed. Itajaí: Univali, 2016.

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, 2011.

APÊNDICES

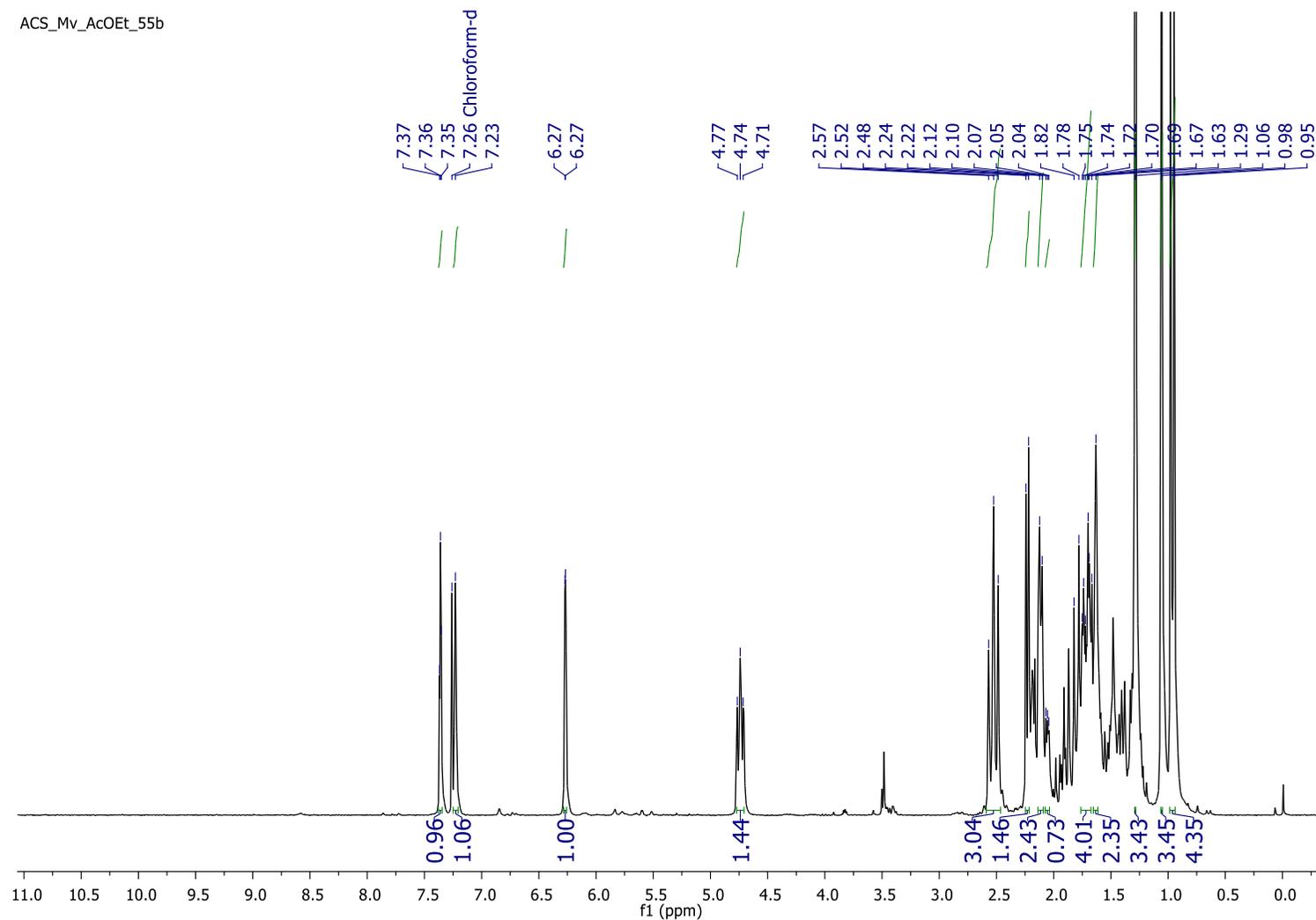
APÊNDICE A – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 1 (MV1) - MARRUBÍINA



Legenda: IV λ_{\max} (cm-1): 3464, 2942, 2866, 1738.

APÊNDICE B – ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200 MHz, CDCl_3) DO COMPOSTO 1 (MV1)

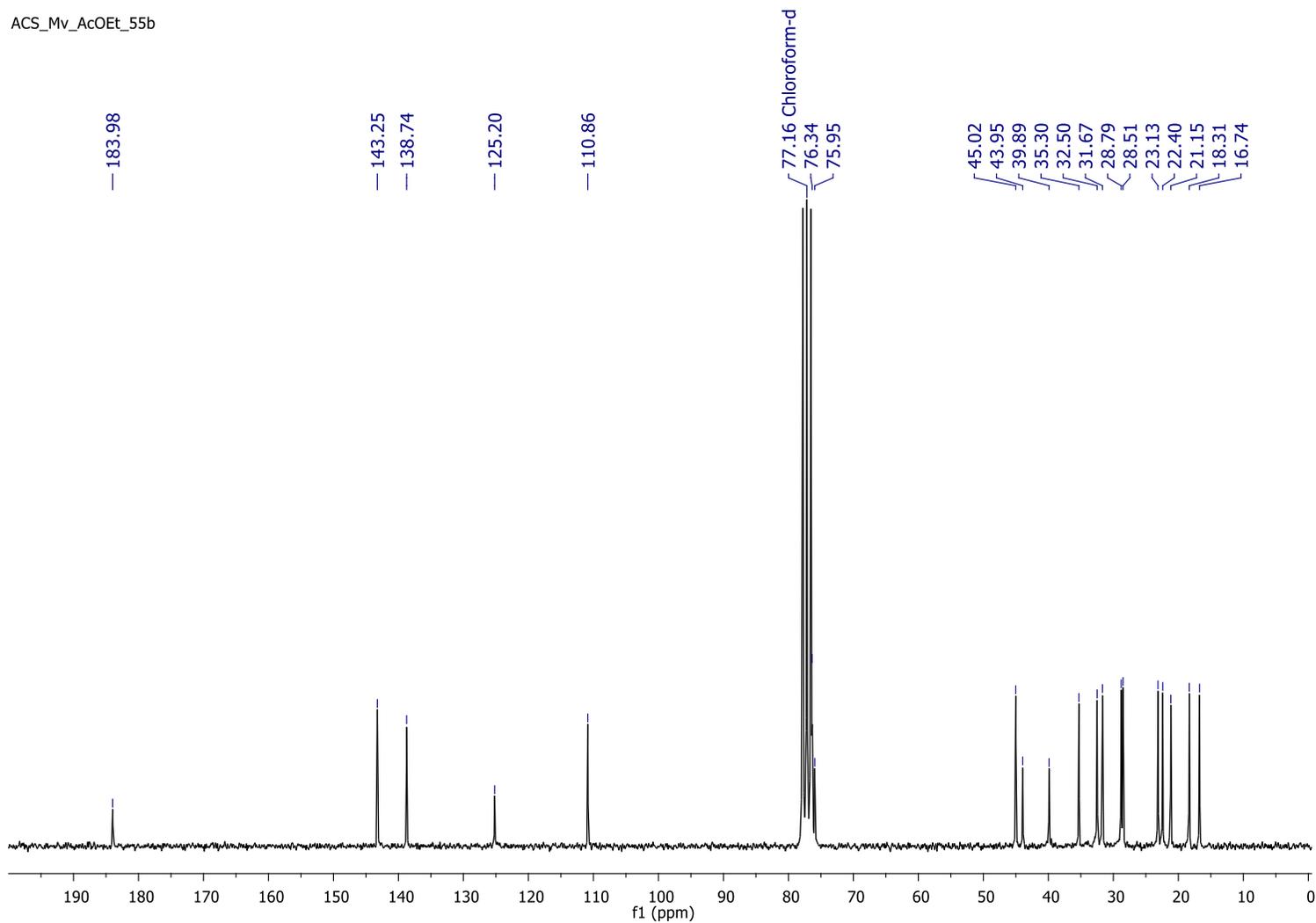
ACS_Mv_AcOEt_55b



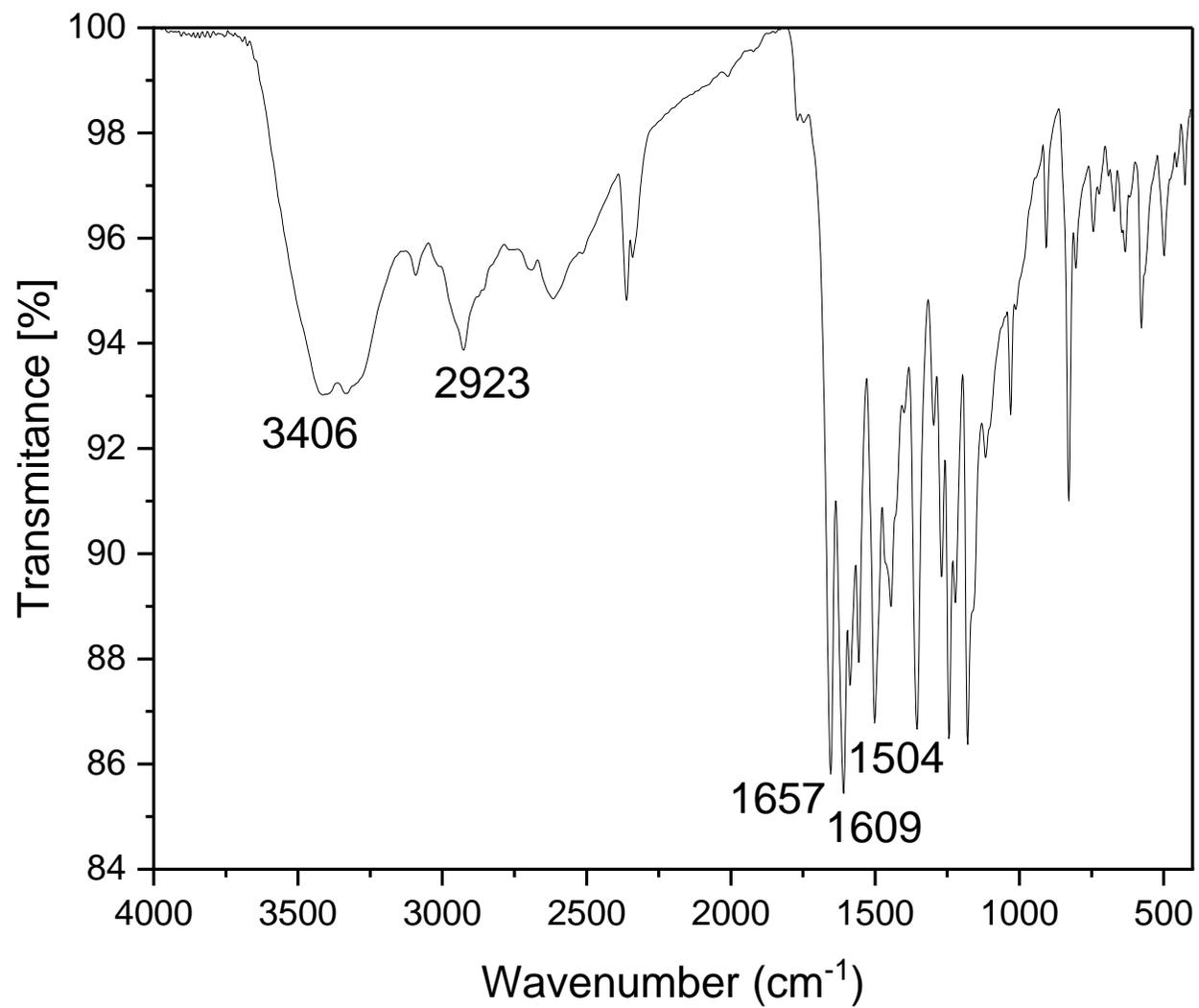
Legenda: ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 7.36 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.27 (d, $J = 0.8$ Hz, 1H), 4.78 – 4.70 (m, 1H), 2.53 (t, $J = 8.4$ Hz, 3H), 2.23 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 2.11 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H), 2.07 – 2.03 (m, 1H), 1.76 – 1.67 (m, 4H), 1.63 (s, 2H), 1.29 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.96 (d, $J = 6.3$ Hz, 4H).

APÊNDICE C – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) DO COMPOSTO 1 (MV1)

ACS_Mv_AcOEt_55b



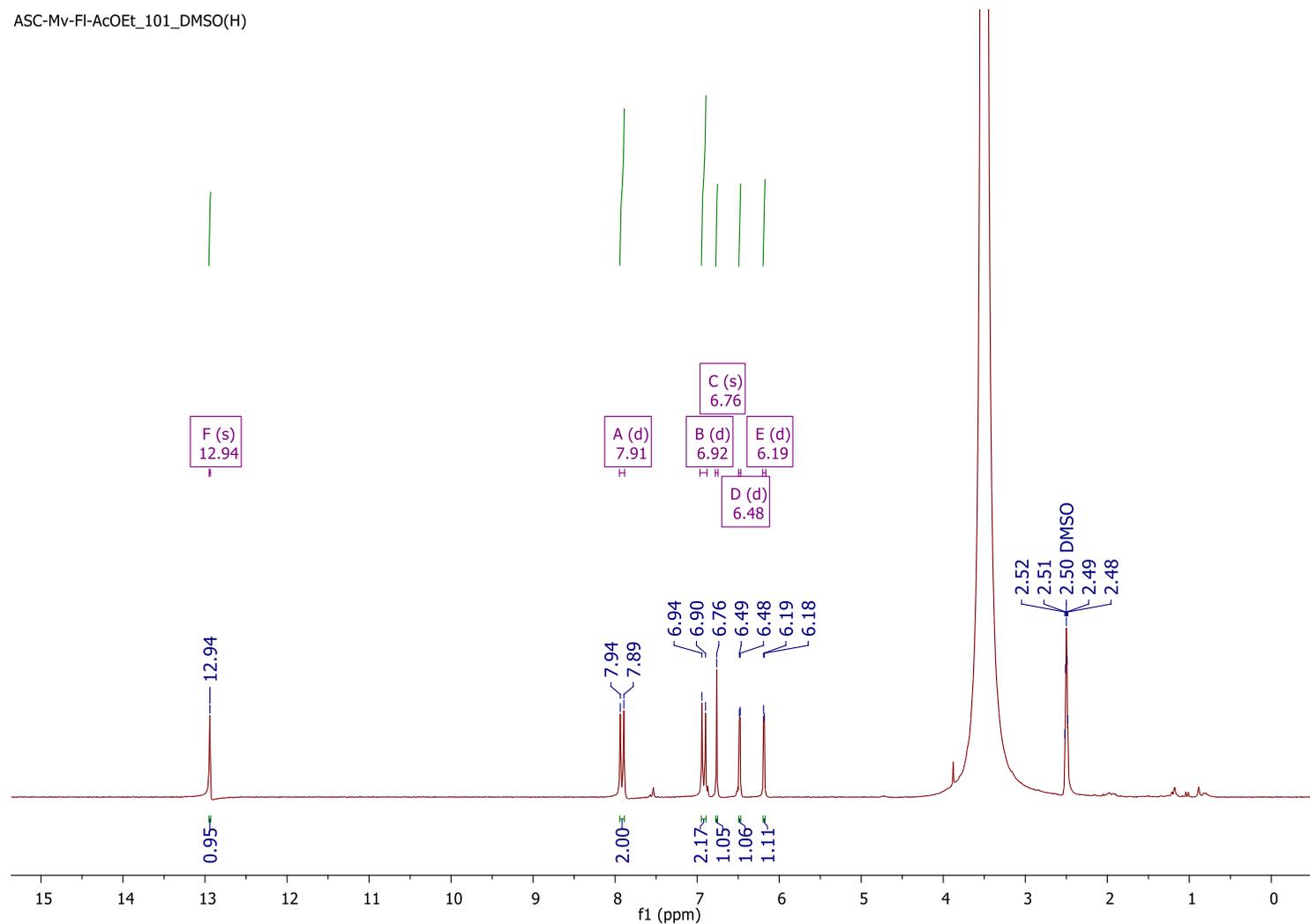
Legenda: ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3) δ 183.98, 143.25, 138.74, 125.20, 110.86, 76.34, 75.95, 45.02, 43.95, 39.89, 35.30, 32.50, 31.67, 28.79, 28.51, 23.13, 22.40, 21.15, 18.31, 16.74.

APÊNDICE D – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DO COMPOSTO 2 (MV2) - APIGENINA

Legenda: IV λ_{\max} (cm⁻¹): 3406 – 3250 (banda larga), 2923, 1657, 1609 - 1504.

APÊNDICE E – ESPECTRO DE RMN DE ^1H (200 MHz, DMSO) DO COMPOSTO 2 (MV2)

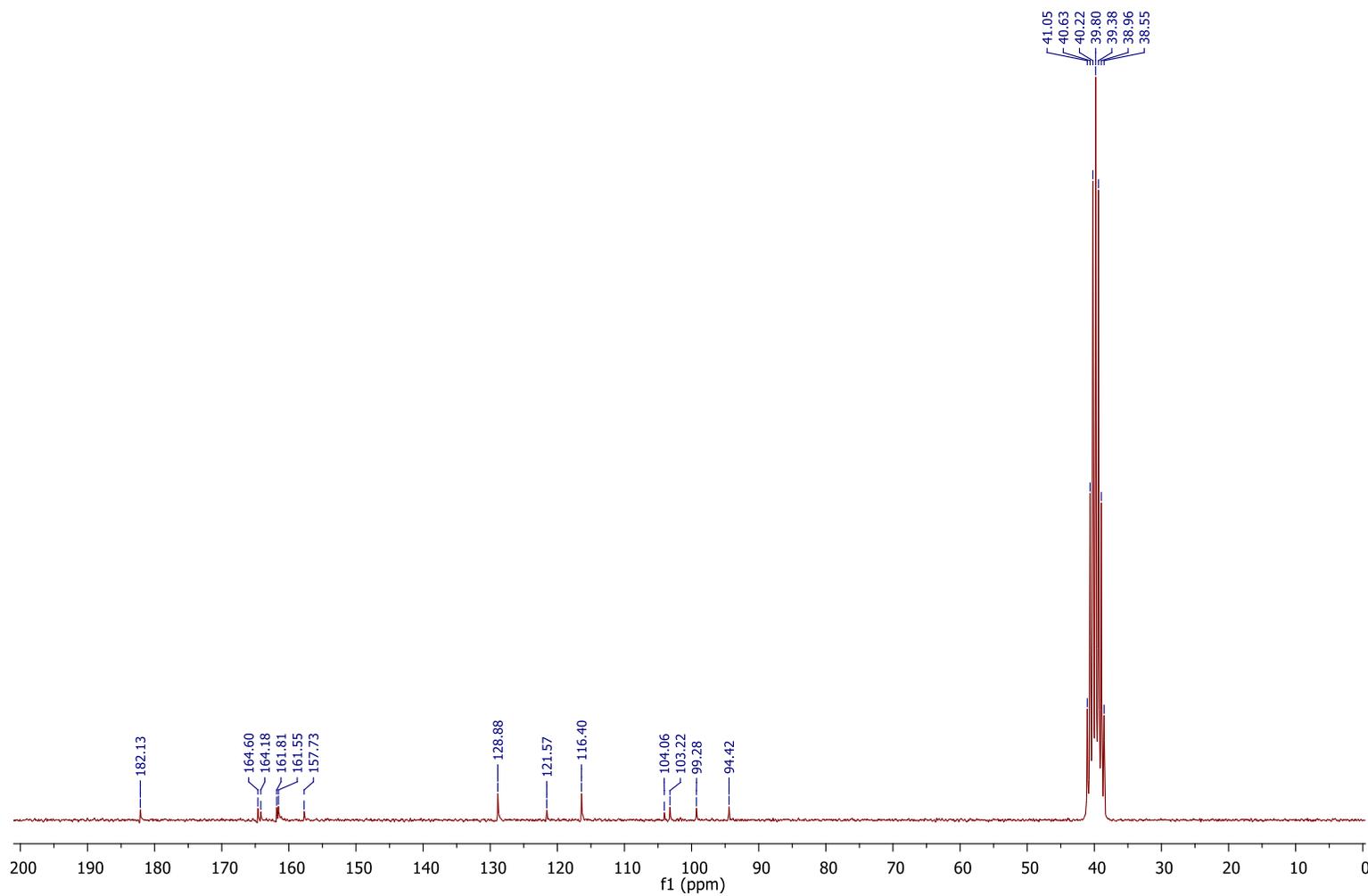
ASC-Mv-FI-AcOEt_101_DMSO(H)



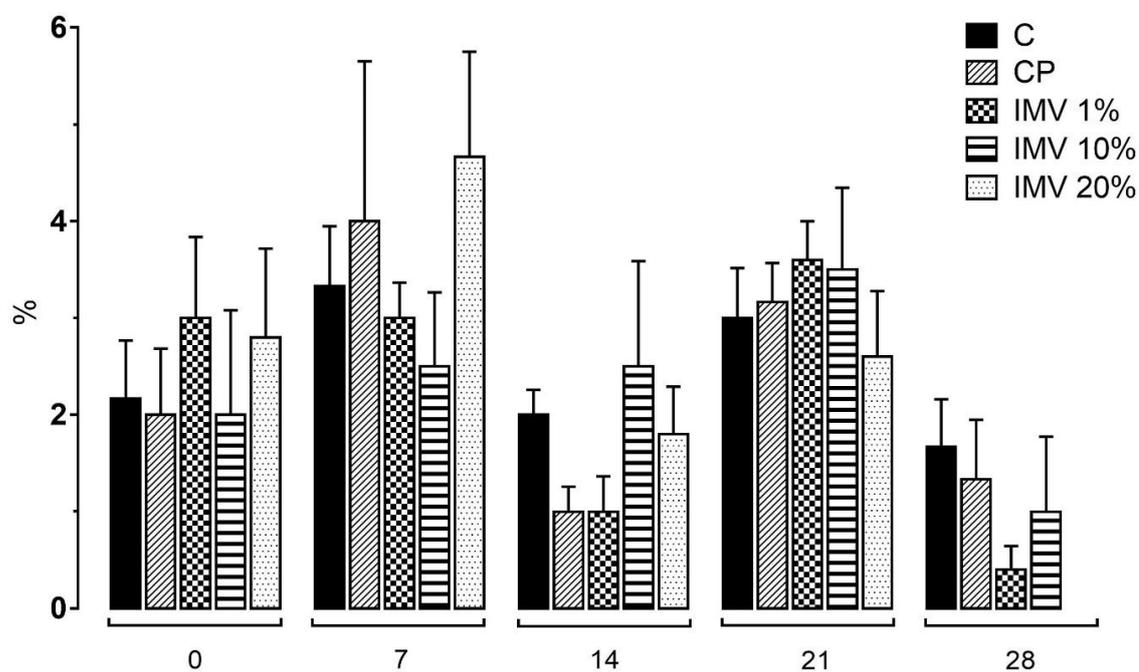
Legenda: ^1H NMR (200 MHz, DMSO) δ 12.94 (s, 1H), 7.91 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.76 (s, 1H), 6.48 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.19 (d, J = 2.1 Hz, 1H).

APÊNDICE F – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (50 MHz, DMSO) DO COMPOSTO 2 (MV2)

ACS_MV-FL-ACoEt_101_DMSO (H e C)

Legenda: ^{13}C (50 MHz, DMSO) δ 182.13, 164.60, 164.18, 161.81, 161.55, 157.73, 128.88, 121.57, 116.40, 104.06, 103.22, 99.28, 94.42

**APÊNDICE G – EOSINÓFILOS DE SUÍNOS RECÉM-DESMAMADOS TRATADOS
COM INFUSÃO DE *M. VULGARE* (MVI)**



Fonte: autoria própria

Legenda: Legenda: C: controle negativo; PC: Controle positivo. Cada barra representa uma média de seis animais e as linhas verticais representam o E.P.M.